

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Trastuzumabe e Lapatinibe no Coriocarcinoma. Um estudo *in vitro*

Leticia Viçosa Pires

Porto Alegre, julho 2018.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Ginecologia e Obstetrícia

Trastuzumabe e Lapatinibe no Coriocarcinoma. Um estudo *in vitro*

Leticia Viçosa Pires

Orientadora: Prof Dra Ilma Simoni Brum da Silva

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Pires, Leticia Viçosa

Trastuzumabe e Lapatinibe no Coriocarcinoma. Um estudo in vitro / Leticia Viçosa Pires. -- 2018. 118 f.

Orientadora: Ilma Simone Brum da Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. HER2. 2. Coriocarcinoma. 3. Trastuzumabe. 4. Lapatinibe. 5. Neoplasia Trofoblástica Gestacional. I. da Silva, Ilma Simone Brum, orient. II. Título.

Todos os dias quando acordo,
Não tenho mais o tempo que
passou

Mas tenho muito tempo
Temos todo o tempo do mundo
...Não temos tempo a perder...
...temos nosso próprio tempo...
...Somos tão jovens...

-Renato Russo

DEDICATÓRIA

Dedico o meu trabalho aos meus filhos Gabriela, Manuela e Guilherme Viçosa Pires, que são o amor, a motivação e o motivo de tudo o que sou e busco na vida. Dedico ao meu marido, Fabian Silva Pires, meu companheiro, amigo e parceiro há mais de 25 anos, por todo o amor, cumplicidade e confiança durante toda a nossa trajetória. Dedico aos que não consigo enxergar com meus olhos, mas vejo diariamente com meu coração, meus avós Emma Bittencourth Viçosa, Emma Soares Ramos, Hermes Maria Viçosa, Otto Ramos, e minhas amadas Dulce da Silva Costa e Tia Lygia Becker Carpena.

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer em primeiríssimo lugar à Prof. Dra. Elza Maria Hartmann Uberti, que me apresentou à Doença e à Neoplasia Trofoblástica Gestacional, e me ensinou uma maneira apaixonada de trabalhar, estudar e publicar, sem esquecer que em primeiro lugar está a ética e o respeito às pacientes. Tenho muito orgulho e honra de trabalhar com a Dra. Elza, e espero sempre poder estar perto dela e do Centro de Doenças Trofoblásticas. Um dia talvez eu consiga retribuir toda a importância que ela teve na minha formação.

Desejo agradecer ao Prof. Dr. Edison Capp, por ser este modelo de pessoa maravilhosa, estudiosa, curiosa, criativa, aberta e ativa que é. Foi uma das mais gratificantes experiências ter conhecido o Prof. Edison, e agradeço imensamente a ele por sempre ter tido seu crédito, confiança, estímulo e crítica.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Ilma Simoni da Silva Brum, por ter aceitado o desafio de orientar uma médica e cirurgiã em um trabalho totalmente novo, no qual ela sabia que eu não tinha experiência nenhuma: um Experimento em Biologia Molecular. A Prof Ilma é uma dessas raras pessoas, que consegue administrar com competência, afeto e pulso firme todo um Departamento (ela é Chefe do Departamento de Fisiologia da UFRGS), seus alunos de pós-graduação, graduação, bolsistas, etc, sua família linda, e ainda estar sempre com um sorriso maravilhoso no rosto, retrato de quem é cheia de amor, ternura e vida.

Aos meus colegas do LABIMET (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral), especialmente à Prof. Dra. Lolita Pizzolato Schneider, incansável, me supervisionando e me ensinando, sempre com muita paciência, tolerância e carinho. À Prof. Dra. Elvira Cordero, por suas pontuais sugestões e críticas. À Prof Dra. Vanessa Shein, por ter me chamado a atenção para as minhas obrigações e possibilidades. Também à Ms Ana Caroline Hillebrand, MD Matheus Rech, Dra Gabriela Sant'anna, Ms Bruna Pasqualotto, Ms Vania dos Reis, por fazerem do nosso ambiente de trabalho, um grupo de amigos, que se ajudam e crescem juntos. À Prof Gisele Branchini, da UFCSPA, que também faz parte desta família.

Aos demais professores do nosso grupo de pesquisa em reprodução, o LAGOM (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular), Prof. Dra Helena Corletta, Prof. Dra. Lucia Kliemann, e Prof. Dra. Helena Schmid, pelo modelo de respeito, assiduidade e compromisso com as funções acadêmicas.

À CAPES pela oportunidade de fazer o PDSE, que foi uma experiência maravilhosa. Sem isso eu não conseguiria fazer a imersão que fiz na minha pesquisa, e não conheceria um serviço tão maravilhoso como o que conheci no Canadá.

Ao Prof. Dr. Peter C.K. Leung e equipe do seu laboratório sediado no British Columbia Children's Hospital Research Institute (BCCHRI) e à University of British Columbia (UBC) em Vancouver, BC, Canadá, pela oportunidade de aprendizado e convívio com muitas culturas diferentes. Foi uma vivência maravilhosa! Fui extremamente bem recebida em 100% do tempo, em todos os locais que frequentei. Fui considerada parte integrante do time desde o primeiro mês, e recebi todo o suporte físico e afetivo necessário para que eu pudesse finalizar o último ano de doutorado com paz e tranquilidade.

A minha querida amiga Maria Aparecida Andreaza Leopoldino, que foi o primeiro sorriso amigo que me recebeu no anfiteatro, e ajudou a diminuir a minha ansiedade. Certas pessoas marcam momentos da nossa vida para sempre. E esta minha superquerida amiga, agitada, hiperativa, trabalhadora, ambiciosa e de um valor extraordinário, sempre me ajudou em tudo. Nas madrugadas de pesquisa, na preparação das aulas, sempre me estimulou e enalteceu meu lado bom.

Agradeço ao grupo "TROFOS", grupo de Whatsapp, onde diariamente tive ajuda especializadíssima de Professores e Doutores conhecidos nacional e internacionalmente por suas publicações na área da Patologia Trofoblástica.

Professores do quilate de Dr. Antônio Braga, Dr. Maurício Viggiano, Dr. José Mauro Madi, Dr. Bruno Grillo (Cirurgiões, Ginecologistas e Obstetras), Dr. Gabriel Oliveira dos Santos (Patologista), Dr. Eduardo Silveira (Oncologista Clínico) e, obviamente, Dra. Elza Maria Hartmann Uberti.

Agradeço aos meus pais, Hemes Maria Viçosa Júnior e Maria Geraldina Ramos Viçosa, por terem garantido um ambiente de conforto e segurança para que eu pudesse crescer e me independizar. Aos meus irmãos Clarissa e João Ramos Viçosa, por trazerem ternura a minha vida.

Aos meus tios, primos, amigos, e pacientes, por torcerem por mim.

E, finalmente, mas principalmente, ao meu esposo e meus filhos, simplesmente por existirem. Com vocês, e por vocês, é que tudo vale a pena!!!!

Sumário

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
2. LISTA DE FIGURAS	13
3. RESUMO	14
4. ABSTRACT	15
5. INTRODUÇÃO	16
6. REVISÃO DA LITERATURA	18
6.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR AS INFORMAÇÕES (SITES CONSULTADOS, ESTRATÉGIAS DE BUSCA, NÚMERO DE ARTIGOS SELECIONADOS).....	18
6.2 MARCO CONCEITUAL:	21
6.3. DOENÇA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL E NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL	22
6.3.1. HISTÓRICO, DEFINIÇÃO E PATOGÊNESE DA DTG E NTG:	22
6.3.2 EPIDEMIOLOGIA DA DTG E NTG:.....	24
6.3.3. QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO DA DTG E NTG:.....	25
6.4 FAMÍLIA DOS RECEPTORES DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO	34
6.4.1. EGFR: OS GENES E AS PROTEÍNAS:.....	34
6.4.2 OS LIGANTES:.....	36
6.5. O HER 2:.....	38
6.5.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HER2:.....	40
6.5.2. HER2 NA DTG E NTG:.....	43
6.5.3. AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO HER2 E AS REPERCUSSÕES:	44
6.5.4. AS CASPASES:	45
6.6. AS DROGAS-ALVO ANTI-HER2:	47
6.6.1. TRASTUZUMABE:.....	49
6.6.2. LAPATINIBE: INIBIDOR DAS TIROSINA- QUINASES (<i>TKI-TYROSINE KINASE INHIBITOR</i>)	50
6.7. AS CULTURAS DE CÉLULAS:	52
7. JUSTIFICATIVA:	54
8. HIPÓTESES:	56
9. OBJETIVOS:	57
9.1 PRINCIPAL:.....	57
9.2 SECUNDÁRIOS:	57
10. REFERÊNCIAS:.....	58
11. ARTIGOS EM INGLÊS:.....	71

Artigo 1.....	72
Artigo 2.....	99
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	117
13. PERSPECTIVAS:	118

1.LISTA DE ABREVIATURAS

AcM: Anticorpo Monoclonal

Act-D: Actinomicina-D

AKT: *Protein-kinase B*

AREG: Anfiregulina (*Amphiregulin*)

C: Ciclofosfamida

Casp: Caspases

CC: Coriocarcinoma

CEC: carcinoma espino-celular

CISH: *Chromogenic In Vitro Hybridization*

DEC: Domínio Extra-Celular

DTG: Doença Trofoblástica Gestacional

E: Etoposide

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

FDA: *Food and Drug Administration*

FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FISH: *Fluorescence In Vitro Hybridization*

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HER1: *EGFR Human Epidermal Growth Factor Receptor*

HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

HER3: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 3*

HER4: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 4*

hLP: Hormônio lactogênio-placentário

HT: Histerectomia

IHQ: Imuno-histoquímica

MAPK=ERKs: Extracellular signal-regulated kinases or Classical MAP kinases, sinônimo de MAPK)

MAPKs: *Mutagen-Activated-Protein Kinases*

MEK: MAP kinase-kinase, ou MAPKK é a kinase que fosforila a MAPK. É um acrônimo de **MAPK-ERK Kinase.K=MAPKK**) (RAFkinases=MAPKKK)

MH: Mola Hidatiforme

MHC: Mola Hidatiforme Completa

MHI: Mola Hidatiforme Invasora

MHP: Mola Hidatiforme Parcial

MTX: Metotrexato

NTG: Neoplasia Trofoblástica Gestacional

O: Oncovirin

OMS: Organização Mundial da Saúde

PI3K: *Phosphatidylinositol-3-kinase*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

QT: Quimioterapia

RAF kinases: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; fosforila a MAP kinase - kinase(MAPKK) em MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)

RAS: proteína oncogênica **RA**t **S**arcoma vírus; RAS ativa a RAF

RNM: Ressonância Nuclear Magnética

RT: Radioterapia

SG: Sobrevida Global

SLD: Sobrevida Livre de Doença

SNC: Sistema Nervoso Central

TC: Tomografia Computadorizada

TKI: *Tyrosine Kinase Inhibitor*

TM: Domínio Transmembrana

TQ: Tirosina-Quinase

TTE: Tumor Trofoblástico Epitelióide

TTSP: Tumor Trofoblástico do Sítio Placentário

US: Ultrassonografia

2.LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de Regressão do hCG

Quadro 1: Critérios da FIGO para diagnóstico da NTG

Quadro 2: Exames de estadiamento da NTG

Quadro 3: Estadiamento Anatômico da FIGO

Quadro 4: Sistema de escores prognósticos da OMS adaptados pela FIGO

Figura 2: Conformação do HER2

Figura 3: Vias de Sinalização do HER2

Quadro 5: IHQ para o HER2 na mama

Figura 4: Mecanismos de ação das drogas anti-HER2

3.RESUMO

A Família dos Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR*) exerce um papel-chave na iniciação e manutenção de diversos tumores sólidos. Isso tem levado ao desenvolvimento e implementação de terapias para o câncer. Drogas inibidor-específicas destes receptores, em especial do HER2, já estão consagradas no tratamento do câncer de mama e de pulmão. A Neoplasia Trofoblástica Gestacional, embora rara em alguns países, tem incidência de até 1:200 gravidezes em algumas regiões. É uma doença da gravidez, portanto acomete mulheres jovens, em idade fértil. A quimioterapia atinge níveis de cura em torno de 90 a 95%, portanto 5-10% das pacientes morrem por complicações da doença ou do próprio tratamento. Alguns trabalhos já têm mostrado a positividade dos *EGFR* na Neoplasia Trofoblástica Gestacional. Com vistas a desenvolver rotas alternativas e de resgate para pacientes com doença resistente e/ou recorrente, avaliaremos HER2 quanto a sua expressão protéica, vias de sinalização, em linhagens de coriocarcinoma JEG3 e BeWo. Investigaremos o efeito das drogas-alvo Trastuzumabe e Lapatinibe no que diz respeito ao crescimento celular, e indução à apoptose.

Palavras-Chave: Coriocarcinoma; Proteína HER2, Anticorpo Monoclonal Humano; Inibidores das Tirosina-quinases; Trastuzumabe; Lapatinibe; Mola Hidatiforme; Neoplasia Trofoblástica Gestacional.

4. ABSTRACT

The epidermal growth factor receptor EGFR family has a key role in the induction and maintenance of several solid tumors. This has led to the development and implementation of anticancer therapies. Drugs that specifically inhibit these receptors, especially human epidermal growth factor receptor HER2, has already been well established in the treatment of breast and lung cancer. Although being rare in some countries, Gestational Trophoblastic Neoplasia has an incidence of up to 1:200 pregnancies in some regions. It is a gestational disease, thus affecting young women of child-bearing age. Chemotherapy can cure nearly 90 to 95% of patients, which means that 5-10% of patients die from complications resulting from the disease or the treatment. Some studies have demonstrated EGFR-positive results in Gestational Trophoblastic Neoplasia. In order to develop alternative rescue therapies for patients with resistant and/or recurrent disease, we evaluated HER2 protein expression and signaling pathways in choriocarcinoma cell lines. We investigated the effect of the target drugs Trastuzumab and Lapatinib in terms of cell growth, and apoptosis induction.

Keywords: Choriocarcinoma; HER2 Protein; Human Monoclonal Antibodies; Protein Kinase Inhibitors; Trastuzumab; Lapatinib; Hydatidiform Mole; Gestational Trophoblastic Neoplasia.

;

5.INTRODUÇÃO

A doença trofoblástica gestacional (DTG) é uma complicação rara e potencialmente grave da gravidez. Compreende um espectro de formas benignas e malignas que provêm da proliferação exagerada do trofoblasto, originada em uma fertilização anormal (Lybol *et al.*, 2012; Eysbouts *et al.*, 2016).

A incidência da DTG é bastante variada, mas parece haver um aumento em países sócioeconômico menos desenvolvidos. As pacientes nos extremos da idade reprodutiva (próximo à menarca e à menopausa) também são as mais acometidas. Este aspecto, associado a um evento anterior de DTG, parecem ser os fatores de risco mais importantes para o seu desenvolvimento (Stevens *et al.*, 2015).

Como é uma doença da gravidez, a DTG ocorre em mulheres jovens, em plena fase reprodutiva, e no auge da sua capacidade de produzir econômica, social, política e culturalmente. Tem repercussão física e emocional bastante impactante, pois traz o risco e, às vezes, a própria malignidade. Influencia intensamente na vida reprodutiva da mulher, muitas vezes definitivamente, o que confere a esta doença um potencial de sofrimento muito grande, não só para a paciente, como para seu companheiro e familiares (Di Mattei *et al.*, 2015).

A forma maligna da DTG é chamada neoplasia trofoblástica gestacional (NTG) e é representada pelas entidades mola hidatiforme invasora (MHI), tumor trofoblástico do sítio placentário (TTSP) e tumor trofoblástico epitelióide (TTE) (Stanculescu *et al.*, 2016).

A NTG é uma das neoplasias sólidas mais responsivas à Quimioterapia (QT), que atualmente é o tratamento de escolha com vistas à preservação da fertilidade (Pires *et al.*, 2012; Hasanzadeh, Vahid Roodsari, *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017).

A literatura é muito limitada no que diz respeito ao registro de casos fatais em NTG (Lybol *et al.*, 2012), mas pode chegar a mais de 20% conforme a gravidade da doença (Neubauer *et al.*, 2015). A falha ao tratamento em geral se relaciona com o diagnóstico e

atendimento tardios, e à resistência aos quimioterápicos (Xiao *et al.*, 2015; Gueye *et al.*, 2016). Novos tratamentos são necessários para diminuir a transformação maligna, aumentar as taxas de cura, diminuir a resistência e a recorrência da doença, e, muito importante, diminuir a toxicidade associada aos tratamentos atuais (Alazzam *et al.*, 2010).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, que envolve inúmeros eventos genéticos, como ativação de oncogenes e inativação de genes supressores. Nas últimas décadas, encontramos um certo número de oncogenes envolvidos na NTG e um representante bastante estudado é o *HER2*, que faz parte da família dos Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptors- EGFR*) (Li *et al.*, 2002; Alazzam *et al.*, 2010). Muitos autores têm mostrado que a DTG que evolui para NTG, e a própria NTG, apresenta aumento na expressão de *HER2* (Yazaki-Sun *et al.*, 2006; Hasanzadeh, Sharifi, *et al.*, 2016).

O tratamento com drogas-alvo anti-*HER2* revolucionaram o tratamento de alguns de tumores como tipos especiais de tumores de mama, de estômago, de pulmão, colorretal e ginecológicos (Parakh *et al.*, 2017), atualmente sendo utilizados tanto na adjuvância como na neoadjuvância, com menos toxicidade que o tratamento convencional com QT. Além disso, as drogas-alvo têm mostrado resultados melhores que a QT nos casos avançados e metastáticos (Richard *et al.*, 2016).

O presente trabalho é um estudo experimental em linhagens celulares de coriocarcinoma JEG3 e BeWo. Cientes das dificuldades do atendimento médico num país em desenvolvimento como o Brasil, nós procuramos lançar um novo olhar para o tratamento da NTG avançada, resistente e recorrente. Avaliamos a expressão gênica e protéica do *HER2* nestas células, e confirmamos o aumento de sua expressão. Submetemos as células a tratamento com as drogas-alvo Trastuzumabe e Lapatinibe, experimento sem registro na literatura atual, e observamos diminuição considerável da proliferação celular de acordo com o escalonamento de doses ao longo do tempo do experimento.

6.REVISÃO DA LITERATURA

6.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR AS INFORMAÇÕES (SITES CONSULTADOS, ESTRATÉGIAS DE BUSCA, NÚMERO DE ARTIGOS SELECIONADOS)

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada nas bases de dados MEDLINE site PUBMED, LILACS, COCHRANE, e SciELO. A estratégia centrou-se nas seguintes palavras 1) Trophoblastic Neoplasia; 2) Gestational Trophoblastic Disease; 3) Hydatidiform Mole; 4) Choriocarcinoma; 5) gene *erbB2*; 6) Trastuzumab; 7) HER2 Protein human; 8) Lapatinib; 9) Protein kinase inibitor; 10) Monoclonal Antibodies; 11) Amphiregulin; 12) Caspases.

A busca foi feita procurando artigos em inglês, nos últimos 5 a 15 anos, *free full text*.

Em relação ao termo *Trophoblastic Neoplasia* foi encontrado um total de 288 artigos. *Gestational Trophoblastic Disease*, 273; em relação a *Choriocarcinoma*, 337; *gene erbB2*, 4612; *Trastuzumab*,1719; *HER2 Protein human*, 2211; *Lapatinib*, 542; *Protein kinase inhibitors*, 1068; *Monoclonal Antibodies*, 12518. Quanto aos termos *Amphireguline*, 240, e *Caspases*, 6964.

Quando cruzadas as palavras-chave *Choriocarcinoma* e *HER2 Protein human*, foram encontrados 5 artigos. *Choriocarcinoma eTrastuzumab*, ZERO; com *Lapatinib*, 1; *gene erbB2*, 15, e com *Monoclonal Antobodies*, 143, respectivamente.

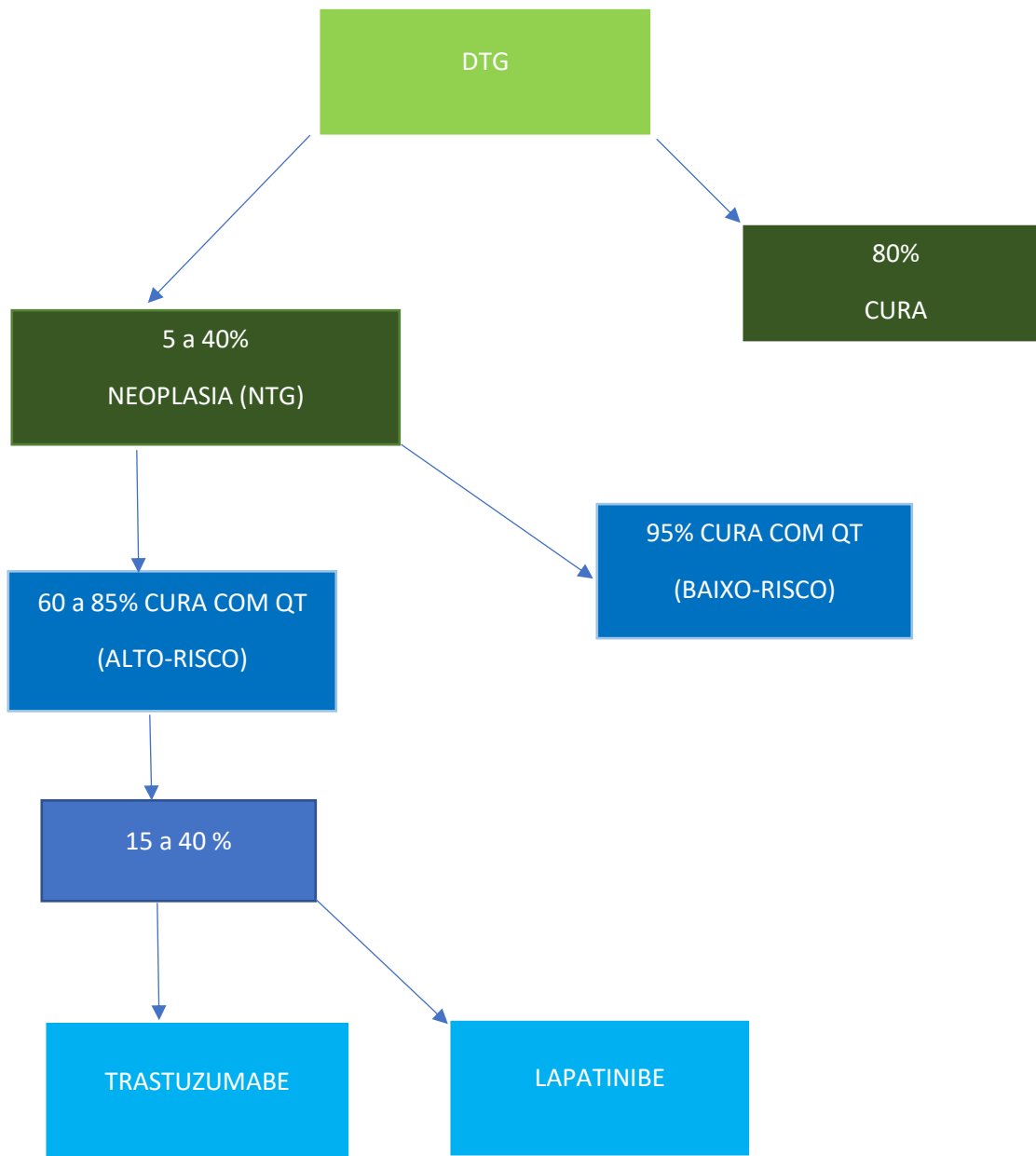
Amphiregulin cruzada com *pregnancy*, 362. *Caspases* e *Hydatidiform Mole*,3; e, finalmente, *Caspases* e *Choriocarcinoma*, 9 artigos.

O Quadro 1 sumariza a estratégia de busca das referências bibliográficas empregada para fundamentar as bases do estudo:

MESCH	PUBMED	LILACS	COCHRANE	SciELO	TOTAL
Trophoblastic Neoplasia	193	15	6	14	228
Gestational Trophoblastic Disease	213	23	20	17	273
Hydatidiform Mole	147	34	10	34	225
Choriocarcinoma	259	26	14	38	337
Gene <i>erbB2</i>	4595	9	4	4	4612
Trastuzumab	1630	22	29	38	1719
HER2 Protein Human	2202	2	3	5	2212
Lapatinib	529	3	3	7	542
Protein kinase-Inhibitors	927	16	116	7	1068
Monoclonal Antibodies	11750	26	279	20	12518
Choriocarcinoma and Her2 Protein	1	2	0	2	5
Choriocarcinoma and Trastuzumab	0	0	0	0	0
Choriocarcinoma and Lapatinib	0	1	0	0	1
Choriocarcinoma and Gene <i>erbB2</i>	1	2	0	1	4

Amphiregulin	240	-	-	-	240
Choriocarcinoma and Monoclonal Antibodies	138	5	0	0	143
Caspases	6964	-	-	-	6964
Amphiregulin and Pregnancy	362	-	-	-	362
Caspases and Hydatidiform Mole	3	-	-	-	3
Caspases and Choriocarcinoma	9	-	-	-	9

6.2 MARCO CONCEITUAL:



A DTG em geral evolui para NTG em 5 a 40% dos casos. Nos países em desenvolvimento e /ou subdesenvolvidos, as pacientes são muitas vezes atendidas em estágio avançado da doença, e sua cura pode falhar em até mais que 38%. Precisamos encontrar um tratamento alternativo à QT para essas pacientes. O Marco Conceitual do nosso trabalho mostra as alternativas por nós sugeridas: as drogas-alvo Trastuzumabe e Lapatinibe.

6.3. DOENÇA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL E NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

6.3.1. HISTÓRICO, DEFINIÇÃO E PATOGÊNESE DA DTG E NTG:

Hipócrates, há 400 anos A.C., foi o primeiro a descrever a DTG-NTG como hidropsia do útero, e só em 1872, Netzel fez a descrição mais antiga de um coriocarcinoma (CC) (Grillo, Bruno Maurizio., 2007). Marchand, revisando 28 casos da literatura até 1898, mostrou que as alterações do blastoma residiam principalmente nas vilosidades, e não no estroma. Mostrou também que havia proliferação irregular e abundante do sincício e do citotrofoblasto através da decídua e, ocasionalmente, da musculatura uterina. Em 1910, Ewing apresentou as três formas distintas da doença: mola hidatiforme (MH), mola hidatiforme invasora (MI) e coriocarcinoma (CC). Já o tumor trofoblástico do sítio placentário (TTSP), forma rara de DTG, só foi incluída no grupo desta patologia em 1981, após a publicação de Scully e Young, embora já tivesse sido descrito em 1895 (Belfort, 2007; Giuliano e Bianconi, 2007).

A DTG se constitui de uma doença rara e potencialmente maligna da gravidez. Se origina de uma fecundação bizarra que desencadeia uma proliferação anormal e exagerada do trofoblasto, levando o mesmo a apresentar características patognomônicas como a dilatação dos vilos em forma de hidátides, o que dá origem ao nome: mola hidatiforme (do latim, mola: massa; e do grego: hydatide: cisto, vesícula) (Grillo, Bruno Maurizio, 2007).

Duas formas clínico-patológicas distintas são identificadas: as benignas e as malignas. As formas benignas são as MH, que podem ser mola hidatiforme completa (MHC) e mola hidatiforme parcial (MHP). Na maioria das séries, 70% são MHC e 30% são MHP (Stevens *et al.*, 2015). As MHC têm uma origem androgenética, isto é, apresentam 46 cromossomas de origem paterna (Kajii e Ohama, 1977). Um óvulo que, por motivos desconhecidos, perde sua carga genética e é fecundado por um espermatozoide que se duplica (monospermia), ou por dois espermatozoides (dispermia), dará origem à MHC, a qual, sem carga genética materna, não apresentará embrião. Um óvulo normal, com núcleo e carga genética completa fecundado por dois

espermatozoides, dará origem à MHP. A MHP será sempre fruto de uma dispermia, resultando numa célula triploide, ou seja, um embrião inviável, com 69XXX, 69XXY, ou 69XYY (Szulman e Surti, 1978a; b).

Existe um tipo de mola hidatiforme familiar de repetição, que parece ser uma herança autossômica recessiva. Há mutação missense no gene NLRP7 no cromossoma 19 que se associa a um tipo de mola hidatiforme completa biparental, onde as famílias tendem a apresentar molas de repetição (Lurain, 2010).

A DTG tem como característica comum a produção elevada da gonadotrofina coriônica humana, o β hCG, que será utilizado como marcador tumoral tanto no diagnóstico, como no acompanhamento da evolução da doença (regressão, progressão, recorrência). As molas hidatiformes têm 5 a 40% de chance de evoluir para as suas formas neoplásicas que são a mola hidatiforme invasora, o CC, o TTSP e o TTE. Este grupo de tumores formam as Neoplasias Trofoblásticas Gestacionais (NTG) (Uberti *et al.*, 2009; Lurain, 2010; 2011; Maesta *et al.*, 2013; Ngan *et al.*, 2015).

As MHC têm maior propensão a evoluir para NTG (20 a 40%), e em 85% dos casos evoluem para mola hidatiforme invasora, metastatizando para pulmões e vagina em 10 a 17 % das vezes. Em 2 a 3%, as MHC evoluirão para CC. As molas hidatiformes parciais evoluem para NTG em menor proporção (1 a 5%). O CC é um tumor raro (1:50.000 gestações), altamente agressivo e invasivo, que costuma dar metástases para pulmões, cérebro, fígado, pelve, vagina, rins, intestino e baço. Em 25% das vezes, o CC sucede um aborto ou uma gestação tubária; 20% são associados a gestação a termo ou pré-termo e 50% provêm de uma gestação molar, embora apenas 2 a 3% das MH progridam para CC (Lurain, 2010). O TTSP é um tumor bem mais raro, que se dissemina pela via linfática primordialmente. Todos os TTSP correspondem a 0,2% das NTG. O TTE é uma rara variante do TTSP que simula um carcinoma. A maioria dos TTE surgem muitos anos após uma gestação normal a termo (Lurain, 2010; Seckl *et al.*, 2010; Ngan *et al.*, 2015).

Embora haja bastante interesse em se descobrir a patogênese destes tumores, o preciso mecanismo ainda não foi bem esclarecido, em parte pela raridade deles, em parte porque o tratamento prescinde de um diagnóstico anatomopatológico específico. A

transformação maligna das molas, como os cânceres, é um processo de múltiplas etapas, que envolve inúmeras alterações genéticas, tais como: ativação de oncogenes e inibição de genes supressores, além de aberrações tanto no controle “interno” do DNA quanto alterações epigenéticas. Nos últimos anos, graças aos avanços da Biologia Molecular, temos feito alguns avanços na identificação de genes e proteínas envolvidas na patogênese da NTG, mas ainda há muito a se fazer (Halperin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Alazzam *et al.*, 2010).

6.3.2 EPIDEMIOLOGIA DA DTG E NTG:

A incidência de DTG é muito variada no mundo inteiro, e parece sofrer influência do *status* econômico, etnicidade (Tarney *et al.*, 2018), estado nutricional e hábitos alimentares (Brown *et al.*, 2017). Aparentemente é maior em países menos desenvolvidos, e nos extremos da idade reprodutiva. Parece ter uma apresentação mais resistente ao tratamento nas pacientes de origem asiática, quando comparada às caucasianas e às afro-americanas (Tempfer *et al.*, 2016). Aproximadamente 1-3 casos em 1000 gravidezes na Europa, Oceania e América do Norte (Stevens *et al.*, 2015); no Brasil, como não há notificação compulsória para a DTG, estima-se uma prevalência que varia de 1:200 a 1:800 gestações. (Braga *et al.*, 2014), 1 em 400 no Senegal (Gueye *et al.*, 2016), 1 em 238 nascimentos na Ásia (Jagtap *et al.*, 2017), assim como incidência bem aumentada na Indonésia, que chega a 12 casos em 1000 gravidezes (Steigrad, 2003).

Há uma taxa global de cura em torno de 90%. A morte pela NTG é atualmente um evento raro, e não há muitos registros completos na literatura (Lybol *et al.*, 2012).

Autores mostram taxas de óbito de seus Serviços de Referência, no atendimento a pacientes com DTG e NTG. Alguns estudaram a mortalidade geral, e outros, apenas pacientes com doença avançada (Lybol *et al.*, 2012); Bolze e cols, na França, apresentou uma taxa de 2% na mortalidade global em NTG, 12% em pacientes com doença avançada, e 38,4% nos casos de altíssimo risco (Bolze *et al.*, 2016). Kong, na China,

mostrou uma mortalidade de mais de 35% nas pacientes com doença ultra-avançada (Kong *et al.*, 2017). Xiao e cols, em pacientes com doença avançada, e metástases cerebrais, tiveram uma mortalidade de 29,7% (Xiao *et al.*, 2015), e Gueye, no Senegal, 12,8% de mortalidade nas pacientes de alto-risco (Gueye *et al.*, 2016). Nas casuísticas mais abrangentes, com pacientes de estágios diferentes da doença, Dreyfus, na França, refere uma mortalidade de 3,3% (Dreyfus, 2017); Lybol, na Holanda, 1,6%; Neubauer, em Chicago, EUA, 4% (Neubauer *et al.*, 2015); Xiao, em Pequim, 3,5% para pacientes de baixo-risco (Xiao *et al.*, 2015); Braga, no Brasil, mostra uma mortalidade de 2,3% no total das pacientes que chegam aos Centros de Referência, sendo que NTG de alto-risco e TTSP correspondem a 10,3% (Braga *et al.*, 2014).

Virtualmente todas as pacientes com doença não metastática ficarão curadas, enquanto 20% das pacientes com doença metastática poderão morrer. Fatores envolvidos no desfecho fatal são o diagnóstico histológico de CC, altos níveis de hCG inicial, doença de longa duração, crescentes e múltiplas metástases, e duração do tratamento anterior (Neubauer *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2015).

O óbito está relacionado em geral ao diagnóstico da doença em estágio avançado, longa evolução, e à resistência à QT. O tratamento falha quando o diagnóstico não é feito no momento oportuno, quando não são instituídas as drogas adequadas (escolha equivocada de QT de primeira linha) no momento certo (desde o início do diagnóstico), ou quando não se aplica agressividade suficiente nos casos mais avançados. As pacientes com doença avançada morrem não só pela quimiorresistência, mas pelas complicações gravíssimas da doença como hemorragia uterina, hemorragia pelas metástases, infecção, falência de múltiplos órgãos, e síndrome de lise tumoral. Por isso é fundamental que as pacientes com DTG e NGT sejam atendidas em Centros de Referência, onde existem especialistas e equipes multidisciplinares habituados com o manejo de pacientes portadoras dessa doença.(Lybol *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2012; Neubauer *et al.*, 2015; Bolze *et al.*, 2016; Dreyfus, 2017).

6.3.3. QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO DA DTG E NTG:

A MHC e a MHP têm como sintoma mais prevalente o sangramento anormal no primeiro trimestre da gravidez, usualmente entre 6 e 16 semanas. O quadro clínico clássico das MH com anemia, aumento de volume uterino desproporcional para a idade gestacional (28%), hiperemese gravídica (8%), pré-eclâmpsia antes das 20 semanas de gestação (1%), hipertireoidismo e disfunção respiratória tem sido cada vez menos frequente com o advento da ultrassonografia de primeiro trimestre, onde o diagnóstico passou a ser precoce, antes dos sintomas de gestação molar com mais tempo de evolução (2º trimestre). A imagem ultrassonográfica típica, de “tempestade de neve”, pode não estar presente no primeiro trimestre, mas a ausência de partes fetais, a aparência cística da placenta, e a deformidade do saco gestacional, podem indicar doença molar inicial (Seckl *et al.*, 2010; Ngan *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017).

Quando o hCG está acima de 100.000, a MHC pode estar associada a aumento de cistos tecaluteínicos, bilateralmente, em 15% dos casos, e a complicações médicas como pré-eclâmpsia, hiperemese, e disfunção da tireóide (hipertireoidismo clínico ou subclínico). A MHP geralmente se manifesta como uma gestação interrompida, na qual o diagnóstico é feito muitas vezes apenas pela análise histopatológica do material da curetagem uterina (Lurain, 2010; Zhao *et al.*, 2017).

Além do quadro clínico e do ultrassom, um exame essencial tanto no diagnóstico como no acompanhamento da evolução da DTG para a remissão espontânea (cura) ou para a evolução neoplásica (NTG), é a aferição periódica dos níveis séricos de hCG. Ele é facilmente dosado no sangue ou na urina, e se correlaciona com o volume (gravidade) da doença. O hCG é uma glicoproteína composta por duas subunidades: uma subunidade α , que é comum a vários hormônios pituitários como o LH e o TSH, e uma subunidade β , que é produzida pela placenta. Nas dosagens quantitativas do hCG total é importante se utilizar um *kit* comercial amplo mas específico que dose também a fração β do hCG, para não se ter resultados falso-positivos ou falso-negativos (Stevens *et al.*, 2015).

O tratamento inicial da DTG consiste no esvaziamento uterino (vácuo-aspiração, curetagem uterina, ou raramente histerectomia quando houver indicação precisa), onde o material será analisado histologicamente. A MHC, além das características

anatomopatológicas próprias, que são apresentar vilos anormais com estrutura “*grape-like*”, hiperplasia difusa do trofoblasto, hiper celularidade estromal e vasos vilosos colapsados, pode ser diferenciada da MHP através da imuno-histoquímica, pois sendo diploide e androgenética, a MHC não expressa o p57KIP2 (*imprinting* do gene materno) ao passo que a MHP expressa o p57KIP2 porque tem o gene materno e é triploide. As características da MHP são apresentar hiperplasia hidrópica vilosa irregular, com vilos irregulares anormalmente dispersos intercalados por pseudoinclusões sem vilos e áreas de placenta normal (Pires *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2017; Santaballa *et al.*, 2018).

Após o esvaziamento uterino e confirmação histopatológica de DTG, os dois primeiros meses de acompanhamento se constituirão de revisões semanais ou quinzenais para avaliação clínica e laboratorial, com dosagem quantitativa do β hCG sérico, até serem alcançados e mantidos por três semanas consecutivas, níveis inferiores a 5mUI/ml (nível consensual de remissão da doença). A paciente passa então para controle mensal até a alta, após um seguimento de 6 a 8 meses se houver remissão espontânea. O comportamento dos níveis da gonadotrofina coriônica humana pode ser acompanhado por uma a curva exponencial semilogarítmica, conforme proposta por Schlaerth (Uberti *et al.*, 1998; Uberti *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2017). Após a alta, a paciente está liberada para engravidar e assim desejar (Cavaliere *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2016) (Figura 1)

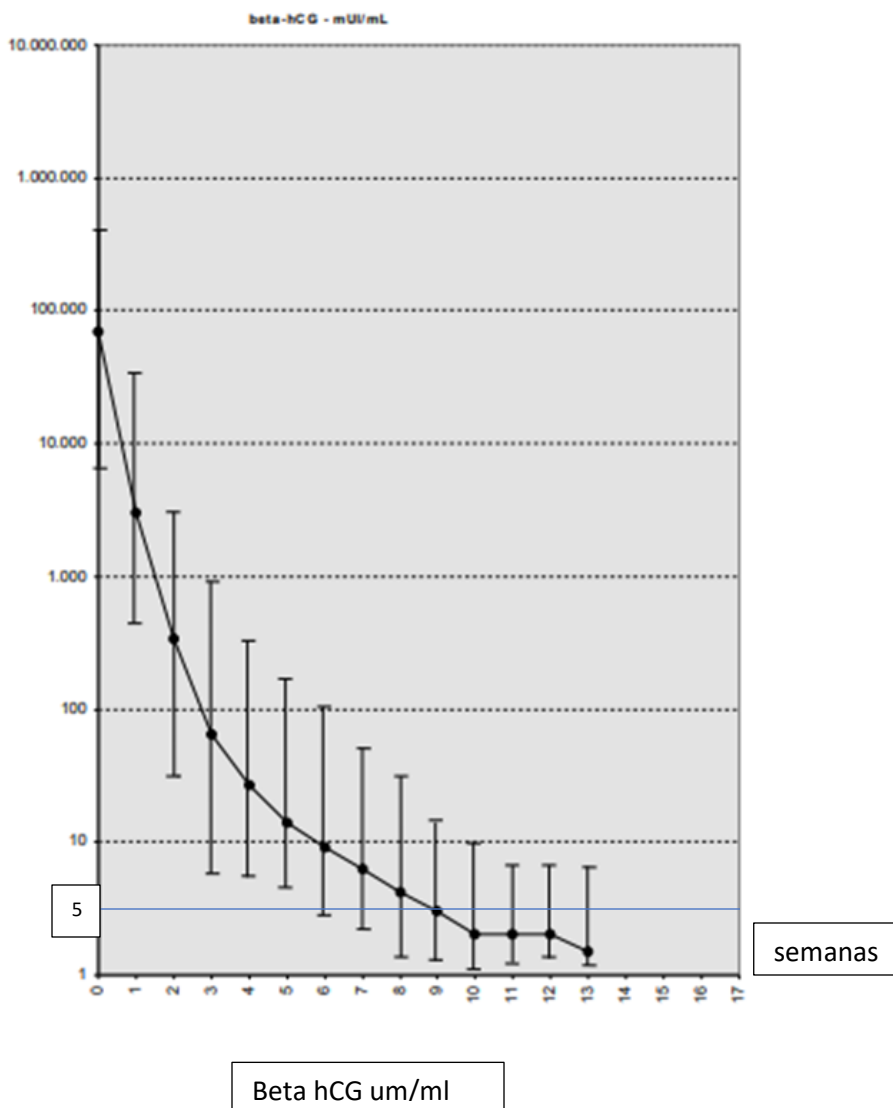


Figura 1. Curva de regressão normal do hCG pós-esvaziamento molar, idealizada por Schlaerth e cols, 1981 (Uberti *et al.*, 1998).

A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) define o diagnóstico da NTG baseado na evolução do nível sérico de hCG (Ngan *et al.*, 2015). A NTG tem uma apresentação clínica variada na dependência dos antecedentes gestacionais, extensão da doença e tipo histológico (Santaballa *et al.*, 2018). (Quadro 1)

Quadro 1. Critérios da FIGO para diagnóstico da NTG

- Plateau de níveis de hCG por 4 medidas seguidas ou por um período de 3 semanas. Dias 1,7,14 e 21.
- Aumento nos níveis de hCG por 3 semanas consecutivas pelo menos por 2 semanas ou mais. Dias 1,7 e 14
- Quando os níveis de hCG permanecem elevados por 6 meses ou mais

A NTG mais frequente é a mola hidatiforme invasora, e esta se caracteriza histologicamente por apresentar vilos edemaciados e trofoblasto hiperplásico invadindo o miométrio, ou por metástases extrauterinas que ocorrem por extensão direta ou contiguidade. As metástases ocorrem preferencialmente por via hematogênica para os pulmões (80%), vagina (30%), pelve (20%), fígado (10%), cérebro (10%), e outros (<5%) (Shen *et al.*, 2017).

O coriocarcinoma é a forma mais grave e maligna da NTG; mais comumente sucede uma MHC, em mulheres com idade acima dos 40 anos, e pode ocorrer muitos anos após um evento gestacional. A apresentação típica se consiste numa massa hemorrágica com áreas de necrose e bordos irregulares. Diferentemente da mola hidatiforme invasora, o CC não apresenta vesículas. Exibe uma área central de citotrofoblasto, com faixas de sinciciotrofoblasto distribuídas alternadamente. À microscopia, possui intensa atipia nuclear com mitose profusa, e focos de hemorragia e necrose, além de inúmeros focos de invasão vascular. O diagnóstico específico é complementado pela dosagem do β hCG (o CC produz 100 vezes mais hCG que a placenta de uma gravidez normal), e da imuno-histoquímica, com a pesquisa de marcadores como a inibina, o antígeno leucocitário humano -G e Mel-CAM (CD146) (Mitrovic *et al.*, 2014)

O TTSP é uma forma extremamente rara de NTG, com cerca de 500 casos publicados na literatura. Se caracteriza histologicamente por apresentar uma população de células neoplásicas derivadas do trofoblasto intermediário no sítio de implantação, dispostas em camadas, que infiltram o miométrio extensivamente. Produz níveis baixos de hCG, apresenta progressão indolente, e é pouco responsivo à QT. Em geral, o TTSP é uma massa circunscrita, e fica restrito ao útero. As metástases são raras, comumente via linfática para os pulmões, mas eventualmente pode se estender para o peritônio, fígado, pâncreas e cérebro. A imuno-histoquímica auxilia no diagnóstico diferencial através da pesquisa da citoqueratina e do hPL (Gari, 2015; Behnamfar *et al.*, 2017; Nagamine *et al.*, 2017).

O TTE é outra forma ainda mais rara de NTG, com cerca de 34 casos descritos, que se apresenta como uma massa de trofoblasto intermediário crescendo isoladamente no miométrio, na cavidade uterina (40%), na cérvix uterina (31%), ou em um sítio extrauterino como os pulmões (19%). Menos frequentemente, pode se localizar na vagina, ligamento redondo, trompas de Falópio, ou outros órgãos pélvicos. A produção de hCG é variável. Não apresenta vilos, nem invasão vascular. O intervalo entre uma gestação e o aparecimento deste tumor pode ser tão longo quanto 18 anos, a às vezes, o diagnóstico é feito somente pela identificação de uma metástase pulmonar. Não é incomum que ocorra em pacientes pós-menopáusicas, e o diagnóstico diferencial com Carcinoma Escamoso da Cérvix (CEC) uterina deve cogitado (Stanculescu *et al.*, 2016).

Nesses tumores raros, a imuno-histoquímica vai ser definitiva na maioria das vezes. O TTE apresenta expressão aumentada de p63 e Ki67, ao contrário do TTSP. O TTSP apresenta positividade para o hPL e níveis baixos de hCG, e o CEC, quando comparado com o TTE, não apresenta a mesma positividade que este para a citoqueratina-18 e anticorpo anti-inibina- α (Gari, 2015; Stanculescu *et al.*, 2016).

6.3.4. PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DA NTG:

Quanto ao prognóstico e tratamento, a NTG apresentou muito avanço nos últimos 70 anos. Antes da introdução da QT, as pacientes com CC restrito ao útero tinham uma

taxa de cura de 41% com a histerectomia (HT) e mortalidade de 100% quando a doença era metastática (Lurain, 2010). A taxa de mortalidade na MHI era cerca de 15%, e a taxa de sobrevida das pacientes com doença metastática era de 5%. Em 1955, as pesquisas realizadas pelo Dr Roy Hertz e colegas, em seu laboratório em Bethesda, Maryland, levaram os mesmos a testarem o Metotrexato (MTX) em pacientes com doença metastática. Em 1956, publicaram seus resultados, com algumas dessas pacientes apresentando remissão completa após o tratamento. A partir de então, a evolução do tratamento e a cura da NTG apresentou um crescimento exponencial. A introdução de novas drogas quimioterápicas, e um sem número de combinações entre as mesmas conforme as diferentes situações clínicas (estádios da doença das pacientes), culminaram com taxas de cura e sobrevida das pacientes na ordem de 90 a 98% (Lewis, 1998; Seckl *et al.*, 2010).

A NTG foi a primeira neoplasia sólida curável com a QT, contudo uma parcela de pacientes ainda morre por falha ao tratamento, especialmente aquelas com metástases cerebrais e hepáticas (Neubauer *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2015; Gueye *et al.*, 2016).

Após o diagnóstico da NTG, as pacientes são avaliadas clinicamente e, através de exames de imagem, estadiadas anatomicamente em estádios de I a IV pela classificação anatômica da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) 2002. Realizarão raio-X de tórax, que é apropriado para a contagem de metástases e eventualmente tomografia computadorizada (TC) de tórax, ultrassonografia (US) de abdômen ou TC de abdômen para avaliar o fígado, e ressonância nuclear magnética (RNM) ou TC de crânio para avaliar a presença de metástases cerebrais (Quadros 2 e 3).

Quadro 2. Exames de Estadiamento anatômico da NTG

- Raio-X de campos pulmonares é suficiente para o diagnóstico das metástases e para a sua contagem (calcular o escore de risco). TC também pode ser utilizada
- US ou TC de abdômen podem ser utilizados para avaliar a presença de metástases hepáticas
- RNM ou TC de crânio serão utilizadas para avaliar as metástases cerebrais

Quadro 3. Estadiamento Anatômico da FIGO

Estádio I	Doença restrita ao útero
Estádio II	Doença se estende aos anexos e vagina, mas ainda se limita aos órgãos genitais
Estádio III	Doença se estende aos pulmões, com ou sem comprometimento dos genitais
Estádio IV	Metástases para sítios diversos

Posteriormente serão classificadas como de baixo ou alto-risco (baixo ou alto risco para resistência à QT) pelo sistema de escores de risco da FIGO e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Alguns autores consideram que o TTSP e o TTE deveriam ter uma classificação especial pelas suas características, e nesses casos são considerados apenas o estadiamento anatômico (Kohorn, 2007; Seckl *et al.*, 2013; Ngan *et al.*, 2015; Stevens *et al.*, 2015; Tempfer *et al.*, 2016; Essel *et al.*, 2017) (Quadro 4).

Quadro 4. Sistema de escore prognóstico da OMS adaptado pela FIGO.

Escores	0	1	2	4
Idade	<40	≥40		
Antecedente Obstétrico	Mola	Aborto	Gestação a termo	
Número de eventos gestacionais	<4	4 a 6	7 a 12	≥13
βhCG pré-tratamento (mU/ml)	<10 ³	>10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴ -10 ⁵	≥10 ⁵
Maior extensão tumoral, incluindo Útero (cm)		3<5cm	≥5cm	
Sítio das Metástases	Pulmões	Baço Rins	Trato gastrointestinal	Fígado Cérebro

Número de Metástases	0	1-4	5-8	>8
Falha à QT Prévia			Droga única	2 ou mais drogas

Pacientes com NTG e escore de risco ≤ 6 serão consideradas de baixo-risco, e terão tratamento inicial com quimioterapia por agente único, MTX ou Actinomicina D (Act-D). Escore de risco ≥ 7 a 11 serão consideradas como de alto-risco, deverão iniciar o tratamento com múltiplas drogas quimioterápicas, a poliquimioterapia, conhecida com EMA-CO (Etoposide, MTX, Act-D, Ciclofosfamida e Vincristina). A remissão completa esperada é de 85%, e a sobrevida em 5 anos é de 75 a 90%. Pacientes com escores de risco ≥ 12 são consideradas como de ultra-alto-risco, e farão *salvage therapy*. Se for iniciado o tratamento convencional, pela volumosa massa tumoral, essas pacientes correm o risco de apresentar sangramentos, supressão medular, septicemia e falência de múltiplos órgãos. Elas terão um esquema de QT adaptado com baixas doses de etoposide e platina (Seckel *et al*, 2013) e, se tiverem metástases cerebrais, poderão fazer radioterapia (RT) de todo o crânio ou estereotáxica. Nas pacientes de alto e ultra-alto-risco sempre será considerada a cirurgia para a diminuição da massa tumoral, ressecção de metástases, e, nas urgências, para controle de sangramento intra-abdominal ou intracraniano (Kohorn, 2007; Seckl *et al.*, 2010; Seckl *et al.*, 2013; Bolze *et al.*, 2015; Ngan *et al.*, 2015; Stevens *et al.*, 2015; Bolze *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2017; Essel *et al.*, 2017; Santaballa *et al.*, 2018).

Após o término do tratamento, as pacientes ficam em controle rigoroso do hCG pelo menos por 12 meses com anticoncepção confiável para o diagnóstico de eventuais recidivas. O futuro gestacional das pacientes tratadas para NTG de baixo-risco não é afetado com QT por agente único. A poliquimioterapia pode antecipar a menopausa em 3 anos (Seckl *et al.*, 2013), e muitas precisarão de acompanhamento psicológico especializado (Di Mattei *et al.*, 2015; Ngan *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2016).

6.4 FAMÍLIA DOS RECEPTORES DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR- EGFR

6.4.1. EGFR: OS GENES E AS PROTEÍNAS:

Em 1959, o vencedor do Prêmio Nobel, Stanley Cohen, juntamente com Rita Levi-Montalcini, no Instituto de Tecnologia de Massachusetts, Rockfeller, na Universidade de Harvard, estava examinando os efeitos de um novo fator de crescimento, o Fator de Crescimento do Nervo (*Nerve Growth Factor-NGF*) em ratos recém-nascidos. A fonte de NGF era extrato bruto de glândulas salivares de ratos. Dra. Levi-Montalcini percebeu um efeito colateral inesperado na prole de ratos que era a erupção e a abertura precoces dos dentes e das fendas palpebrais. Cohen isolou o responsável e chamou-o de Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor-EGF*). A seguir, se voltou à pesquisa do mecanismo de ação do EGF, e descobriu que o EGF se ligava a uma proteína de membrana de 170 kDa, presumivelmente, o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR*). Essa ligação fazia com que os dois elementos fossem internalizados à célula, e degradados nos lisossomas. Usando uma célula de carcinoma epidermóide, rica em EGFR, ele descobriu que a adição do EGF causava a fosforilação do EGFR e mais tarde também identificou o EGFR como uma proteína da família das Tirosina Quinases (TQ). Os EGFR foram finalmente descobertos por Carpenter e colaboradores na Universidade Vanderbilt, nos Estados Unidos, em 1978 (Iqbal e Iqbal, 2014).

A relação dos EGFR com o câncer foi primeiramente reconhecida quando se descobriu que o oncogene ativado do vírus da eritroblastose aviária era um mutante homólogo ao EGFR. Viu-se que o oncogene v-erbB apresentava as recombinações nos domínios citoplasmáticos e de membrana do EGFR, ou seja, ambos apresentavam aberrações semelhantes. Além das mutações, a superexpressão do EGFR começou a ser observada como promotora do câncer, primeiramente em carcinomas, e logo depois,

em sarcomas, câncer de pulmão não pequenas células e em gliomas malignos (Iqbal e Iqbal, 2014; Wee e Wang, 2017).

A família dos genes *ERBB* se expressa nas células epiteliais, mesenquimais, neuronais, e nas suas progenitoras. O símbolo de gene *ERBB* é geralmente italizado, mas não obrigatoriamente, e todo com letras maiúsculas. As proteínas seguem a nomenclatura do gene respectivo, não em itálico, mas geralmente com a primeira letra maiúscula e as demais minúsculas (*Egfr*). Os genes possuem sinônimos; por exemplo: o *EGFR* pode ser também *ERBB*, *ERBB1*. e/ou *HER1*; O *ERBB2*, pode ser *HER2* ou *NEU*; o *ERBB3*, *HER3* e o *ERBB4*, pode ser denominado *HER4*. A designação HER é comumente utilizada nos artigos científicos tanto para genes como para proteínas e o sufixo NEU é utilizado na nomenclatura do gene humano, para diferenciar do gene *ERBB2* de neuroblastomas induzidos quimicamente em ratos (Eccles, 2011; Roskoski, 2014).

A família *EGFR* se distribui em quatro cromossomas diferentes (Roskoski, 2014). O *HER1* se localiza no braço curto do cromossoma 7 (7p22); o *HER2*, no braço longo do cromossoma 17 (17q12) (Iqbal e Iqbal, 2014); O *HER3*, no braço longo do cromossoma 12 (12q13) (Zimonjic, Rezanka, *et al.*, 1995), e o *HER4*, no braço longo do cromossoma 2 (2q34) (Zimonjic, Alimandi, *et al.*, 1995).

Com exceção das células hematopoiéticas, o papel da família dos genes *EGFR* é crítico na embriogênese, puberdade, e na maioria dos tecidos maduros do Sistema Nervoso Central (SNC). Mutações nulas em ratos podem provocar danos embrionários e perinatais letais (lesões no cérebro, pele, pulmões, trato gastrointestinal), assim como malformações cardíacas, de folículos pilosos, desenvolvimento da córnea e hipodesenvolvimento mamário com morte da prole por desnutrição (Iqbal e Iqbal, 2014).

A família das proteínas EGFR é composta por quatro integrantes, homônimas aos genes, que são o EGFR ou HER1 (*erbB1*), o HER2 (*erbB2*), o HER3 (*erbB3*) e o HER4 (*erbB4*). Elas estão presentes em todas as células do organismo, e são responsáveis por crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, e motilidade celular. A família das proteínas EGFR são glicoproteínas de membrana tipo I, tirosina-quinases (TQ),

compostas por três regiões distintas: um N-terminal que é o domínio extracelular (DEC), um domínio transmembrana (TM) em α -hélice, e um domínio tirosina-quinase intracelular. O domínio extracelular é composto por quatro subdomínios (I, II, III e IV). Os subdomínios I e III podem formar sítios de ligação com seus potenciais ligantes, enquanto os subdomínios II e IV estão envolvidos na homodimerização e heterodimerização. Habilitadas para formarem homodímeros e/ou heterodímeros entre si, as proteínas EGFR podem fazer 28 combinações diferentes. Quando ativadas, desencadeiam uma cascata de reações intracelulares através dos seus caminhos de sinalizações protéicas específicos (Li *et al.*, 2002; Alazzam *et al.*, 2010; Tai *et al.*, 2010; Wee e Wang, 2017).

Na estrutura cristalóide do domínio transmembrana encontramos a força da formação do dímeros dos HER. O domínio tirosina-quinase intracelular é formado por um ligante citoplasmático justamembrana (JM), e por uma cauda carboxi-terminal. O Domínio TQ contém diversas alças que formam a parte ativa da enzima: a cauda carboxi-terminal apresenta resíduos de tirosina que são aptos para a fosforilação e também têm sítios de encaixe para moléculas que vão dar início à cascata de sinalizações (Tai *et al.*, 2010; Wee e Wang, 2017).

A perda de controle na regulação da atividade e na expressão destas proteínas da família EGFR está relacionada não só com a promoção do câncer, mas com outras doenças como o diabetes, doenças autoimunes, cardiovasculares, inflamatórias e degenerativas do SNC (Roskoski, 2014).

6.4.2 OS LIGANTES:

As moléculas transmembrana HER (os EGFR) existem como monômeros inativos na superfície celular, mas formam dímeros quando estimuladas por ligantes que se unem aos seus domínios extracelulares. A dimerização pode ocorrer entre receptores iguais (formando homodímeros), ou entre receptores diferentes (heterodímeros). A interação entre os monômeros de HER e os vários ligantes determina a diversidade das transduções de sinalizações a partir do domínio tirosina-quinase intracelular. A

complexidade das consequências destas ligações fazem com que a família dos EGFR exerça um papel-chave na regulação do crescimento, sobrevivência e diferenciação celulares (Van De Vijver, 2001; Nahta e Esteva, 2006a).

Embora o HER2 não tenha um ligante específico, seus ligantes mais frequentes são o Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor EGF*), o Fator α de Transformação do Crescimento, a Anfiregulina (*Amphiregulin AREG*), o EGF ligado a heparina, a Betacelulina, a Epiregulina, e as Heregulinas. Dentre todos, o EGF e a AREG são os mais importantes (Van De Vijver, 2001; Revillion *et al.*, 2008; Fukami *et al.*, 2009).

O EGF executa um papel importante no desenvolvimento embrionário desde o estágio pré-implantacional até a fase placentária. Ao se ligar ao EGFR, além das ações fundamentais da célula, exerce funções na reparação, remodelagem e formação de tecidos como pele, pulmões, trato gastrointestinal, cérebro e fígado além de ter atividade anti-apoptótica e antioxidante (Rajaram *et al.*, 2017). Na placenta humana encontramos a maior expressão de EGF de todos os tecidos (Nilsson *et al.*, 2013), e estudos já mostraram que o EGF estimula a produção de β hCG em células de cultura (Nomura *et al.*, 1996).

A AREG é encontrada em grandes quantidades no tecido placentário e no líquido amniótico no início da gravidez, e se sugere que ela possa participar da produção do marcador tumoral da DTG-NTG, o β hCG. Fukami e cols. avaliaram a produção de hCG em cultura de células de CC JAR, JEG3 e BeWo. Após submetê-las a tratamento com AREG, observaram um aumento na produção do hormônio. Quando o receptor EGFR estava neutralizado, entretanto, o hCG não se elevou, o que sugere que a produção do hCG seja mediada pela via dos EGFR (Fukami *et al.*, 2009).

Muitos estudos têm chamado a atenção para o papel da AREG no processo da tumorigênese, incluindo uma auto-suficiência para gerar sinalizações de crescimento, replicação sem limites, invasão de tecidos, metástases, angiogênese e resistência à apoptose. A atividade oncogênica da AREG já foi descrita nas malignidades de origem epitelial mais comuns como carcinoma de mama, pulmão, colo-retal, ovário, próstata, assim como em cânceres de origem hematológica e mesenquimal. Além disso a AREG

também é implicada na resistência a diversos tipos de tratamento do câncer. Devido a essas características, a AREG representa uma opção promissora como marcador biológico de valor preditivo e como alvo nas terapias contra o câncer (Busser *et al.*, 2011).

6.5. O HER 2

Os tecidos normais apresentam uma quantidade pequena da proteína HER2 nas suas membranas celulares. Há mais de 25 anos se identificou a amplificação do gene *HER2* em linhagens celulares de carcinoma de mama, e essa amplificação se mostrou importante na patogênese e na progressão desses tumores. Desde então. A amplificação do *HER2* e a sua conseqüente superexpressão protéica tem sido exaustivamente estudada, proporcionando a síntese de diversas drogas direcionadas ao seu bloqueio, com sucesso (Gutierrez e Schiff, 2011).

Nos tumores de mama se verifica uma superexpressão do HER2 em 20 a 30% dos casos, e nos tumores de pulmão não pequenas células também é bem documentada. Além disso, o aumento das proteínas HER2 nas membranas celulares tem sido identificado em outras neoplasias como as de estômago, esôfago, cólon, cabeça e pescoço, pâncreas, carcinoma de glândulas salivares, ovário, bexiga e próstata (Harries e Smith, 2002; Yan *et al.*, 2014).

A positividade do HER2 nos tecidos neoplásicos confere maior agressividade a esses tumores e pior prognóstico. O *HER2* age como um gene-chave na sobrevivência celular, e a sua amplificação, juntamente com a superexpressão da proteína HER2 é reconhecida como responsável pela transformação maligna em diversos tecidos. No câncer de mama, ele já é utilizado como fator prognóstico, orientando o estadiamento e o tratamento a ser empregado. A amplificação ou a superexpressão do HER2 podem servir como biomarcadores preditivos da resposta ao tratamento numa variedade de tumores como os de mama, estômago e ginecológicos (Yarden e Sliwkowski, 2001; Gutierrez e Schiff, 2011; Iqbal e Iqbal, 2014; Segovia-Mendoza *et al.*, 2015; Parakh *et al.*, 2017)

O HER2 tem peso molecular 185 kDa, e não costuma formar homodímeros, entretanto, os heterodímeros que forma com os outros membros da família são os mais potentes em termos de desencadeamento das vias de sinalização intracelulares. Seu domínio extracelular está sempre ativado, o que o torna “o preferido” para formar dímeros (Tai *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2014; Wee e Wang, 2017). O HER3 parece ser o grande parceiro do HER2, formando os heterodímeros mais ativos (Moasser, 2014) (Figura 2).

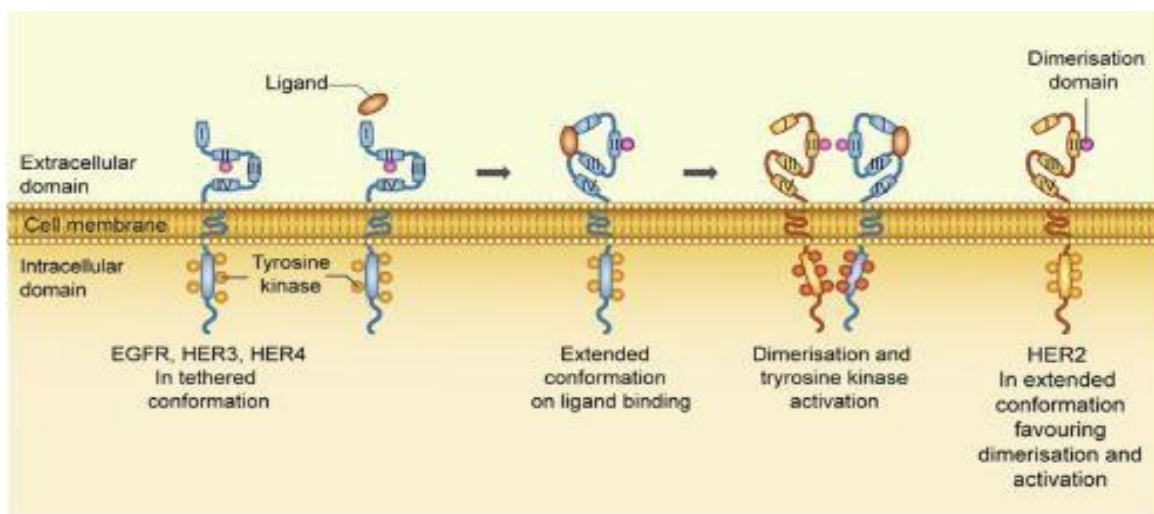


Figura 2. Família HER e seus sítios de ligação para formar os dímeros (homo e heterodímeros). Fonte: Parak *et al.* Cancer Treatment Reviews 59 (2017) 1-21.

Após formar os dímeros e sofrer transfosforilação, as principais vias que serão ativadas pelo HER2 são a via das MAPK (proteína-quinases ativadas ou *Mutagen-Activated-Protein Kinases*: MAPK= ERK; MEK=MAPKK e RAF=MAPKKK) e a via da PI3K/ AKT (*Phosphatidylinositol-3-kinase/Protein Kinase B*). São finalmente estas vias ativadas através de mecanismos bioquímicos complexos que vão exercer as funções vitais de sobrevivência e, migração, crescimento, proliferação, angiogênese, diferenciação, e apoptose celulares. (Iqbal e Iqbal, 2014; Parakh *et al.*, 2017; Wee e Wang, 2017) (Figura 3).

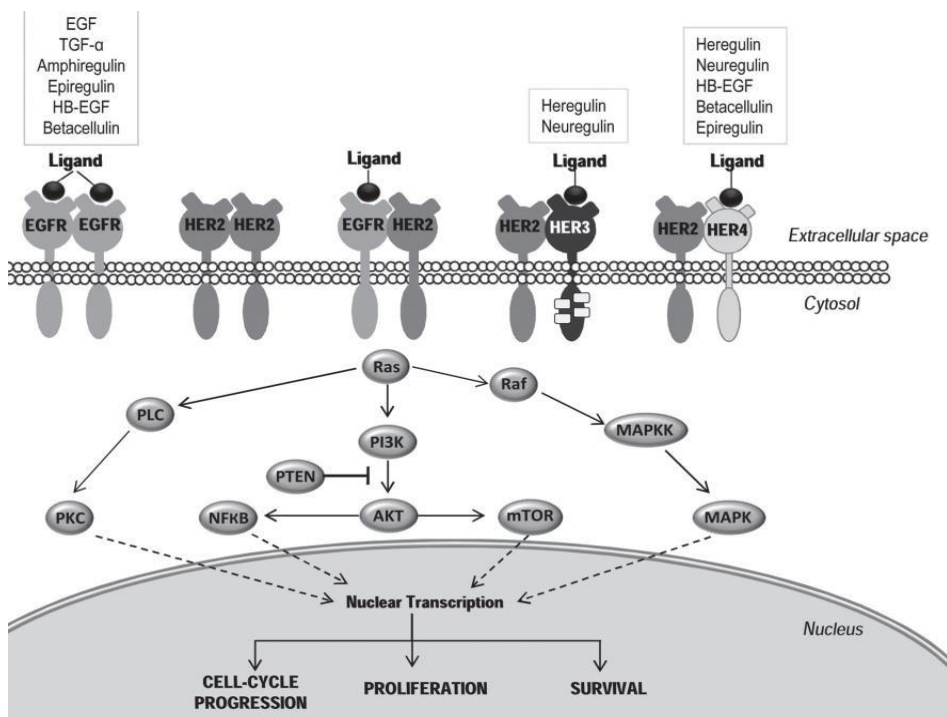


Figura 3. O HER2, seus ligantes, e as principais vias de sinalização: MAPK, PI3K e AKT

Fonte: Sandrini et al, 2015. Anais da Academia Brasileira de Ciências (2016)88 (1 Suppl) 565-77.

6.5.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HER2

Existe uma vasta quantidade de métodos que vêm sendo utilizados para a detecção do HER2. Seu *status* nos tecidos pode ser avaliado e quantificado de acordo com a molécula-alvo pesquisada, pelas análises de DNA, mRNA ou proteína. A proteína pode ser medida como o receptor HER2 intacto na membrana celular ou apenas o domínio extracelular. A maioria dos testes mede ou a proteína, ou o DNA. Para se detectar o mRNA, se utiliza a técnica da cadeia da polimerase e transcriptase reversa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: RT-PCR*). O RT-PCR tem

uma desvantagem para a prática clínica que é o fato de não dar uma análise quantitativa de presença *do HER2* (Van De Vijver, 2001).

Alguns métodos serão mais úteis na pesquisa, e outros, na prática clínica. Por exemplo, na detecção das proteínas de membrana, temos o *Western Blotting* (WB), o ELISA (*enzyme-linked immunosorption assay: ELISA*), e a Imunohistoquímica (IHQ). O método WB ficou mais restrito à pesquisa, pois precisa de homogeneizados de tumor fresco, e é muito influenciado pelas diluições que precisam ser realizadas de células normais e tumorais (Van De Vijver, 2001).

O método ELISA pode medir a proteína HER2 nos homogeneizados de tecido ou HER2 no soro do paciente. Também apresenta a desvantagem das diluições, e, quando mede o antígeno HER2 no soro, fica vulnerável às modificações fisiológicas e às causadas pela ação terapêutica. Além disso, não reflete exatamente a carga tumoral nos tumores HER2 positivos (Van De Vijver, 2001).

É preciso frisarmos que em vários tipos de câncer, há uma discrepância em relação à positividade do HER2. Esta discrepância se deve a vários fatores como heterogeneidade do tumor, processo de fixação, protocolos laboratoriais, anticorpos usados e à própria interpretação. O critério de positividade do HER2 pode mudar, conforme as características inerentes ao tumor. Atualmente, os tumores mais estudados em relação ao HER2 são os tumores de mama e os de estômago. As análises dos outros tumores são feitas através de comparações e extrapolações dos valores já protocolados para estes dois cânceres (Yan *et al.*, 2014).

Uma vez que esse aspecto vai nortear o tratamento, é importante que possamos avaliar com precisão a amplificação e a expressão do HER2 no tecido tumoral. Este diagnóstico historicamente foi muito confuso até que, em 2007, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology*) e o Colégio Americano de Patologistas (*American College of Pathologists*) chegaram a um consenso de recomendações para a diminuição dos erros diagnósticos da expressão do HER2 no câncer de mama. Atualmente, os testes para detecção do HER2 considerados seguros são: IHQ, FISH (*Fluorescence In Vitro Hybridization*), o CISH (*Chromogenic In Situ*

Hybridization) e o SISH (*Silver Enhanced In Situ Hybridization*). Em geral, se lança mão da técnica FISH, quando a IHQ é duvidosa, pois a positividade para a expressão do HER2 muda desde o prognóstico até as formas de tratamento dos(as) pacientes (Gutierrez e Schiff, 2011; Ayatollahi *et al.*,2017). (Quadro 5).

Quadro 5. IHQ para HER2 na mama.

STATUS	ESCORE	EXPRESSÃO	CONFIRMAR POR FISH
POSITIVO	3+	>30% das células tumorais coradas intensamente e uniformemente	NÃO
SUSPEITO	2+	30% ou menos de membranas coradas intensamente, ou pelo menos 10% de células coradas completa, não uniformemente	SIM
NEGATIVO	1+	Membranas coradas levemente, ou de forma incompleta, em qualquer proporção	NÃO
NEGATIVO	0	Não houve coloração	NÃO

No que tange à IHQ, é importante o intervalo de tempo entre a obtenção do tecido e a fixação de 6 a 48 horas, e estes tempos devem ser registados nas amostras. A IHQ para o HER2 pode ser positiva, suspeita, ou negativa (Gutierrez e Schiff, 2011).

A análise molecular do HER2 faz parte integral do diagnóstico dos tumores de mama. O FISH e o CISH podem ser utilizados em uma gama de ampla de amostras linhagens celulares, tecidos de congelação e parafina (convencionais e *tissue*

microarrays). O princípio da hibridização *in situ* é simples: criação de sondas de DNA complementares às sequências de genes de interesse, depois identificá-las e contá-las.

O FISH é positivo para o HER2 quando apresenta uma média de > 6 cópias do gene/núcleo. Suspeito quando fica entre 4 a 6 cópias do gene/núcleo, e negativo quando apresenta menos que 2 cópias. Tanto o FISH quanto o CISH necessitam 2 dias para serem executados, e dificilmente darão resultados errados. O FISH necessita maior treinamento, um microscópio especial e a contagem manual consome mais tempo, enquanto o CISH é mais rápido, e é mais facilmente lido pelos patologistas devido à semelhança com a IHQ. Todavia, por enquanto a FDA aprova apenas a IHQ e o FISH para a confirmação do HER2 nos tumores de mama (Ayatollahi *et al.*, 2017).

6.5.2. HER2 NA DTG E NTG

Muitos autores vêm estudando esses eventos na DTG-NTG com o avanço da biologia molecular, mas a patogênese desta doença permanece uma incógnita. Fulop e cols., e Tuncer e cols., utilizando RT-PCR e IHQ demonstraram que o HER2 se expressa mais nos CC e nas MHC, do que nas MHP e nas placentas normais (Fulop *et al.*, 1998; Tuncer *et al.*, 2000; Fulop *et al.*, 2001) .

Menczer e cols., e Yang e cols. provaram através da IHQ que as MH que apresentavam maior expressão de HER2, eram as que mais evoluíam para NTG (Yang *et al.*, 2002; Menczer *et al.*, 2007). Yasazki-Sue e cols., encontraram um valor preditivo positivo de 70% para transformação maligna nas MH que apresentavam superexpressão de HER2 (Yazaki-Sun *et al.*, 2006).

Wang e cols. Reportaram uma expressão significativamente maior do HER2 nos tumores trofoblásticos gestacionais, que nas molas e nas placentas normais, enquanto não houve diferença entre os tumores estágio III e IV, quando comparados com estágio I e II.(Wang *et al.*, 2002).

Hazanzadeh e cols., através do uso *Endovysion TM system* na IHQ, observaram 90% de sensibilidade e 92% de especificidade para detectar a expressividade do HER2 e a

progressão da mola para NTG. Encontraram um valor preditivo positivo de 88,4% de malignização nas molas que superexpressavam o HER2 (Hasanzadeh, Sharifi, *et al.*, 2016).

Há mais de duas décadas, pesquisadores vêm se dedicando ao desenvolvimento de drogas-alvo direcionadas ao HER2, e elas revolucionaram o tratamento de alguns tumores como o de mama e o de estômago, além do de pulmão, colorretal e ginecológicos. Atualmente muitas dessas medicações são utilizadas em casos avançados, em combinação com QT, ou isoladamente, combinadas entre si, e também na neoadjuvância, com menos toxicidade que o tratamento convencional quimioterápico. Como se não bastasse, as drogas-alvo têm mostrado resultados melhores que a QT nos casos avançados e metastáticos (Gutierrez e Schiff, 2011; Connell e Doherty, 2017; Gligorov *et al.*, 2017; Parakh *et al.*, 2017).

6.5.3. AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO HER2 E AS REPERCUSSÕES

As vias de sinalização ativadas pelo HER2 compreendem o maior motivo dos EGFR terem sido tão estudados nos últimos anos. A magnitude das vias e o poder de cada uma delas sob o controle dos EGFR na proliferação e na resistência à apoptose foi um grande estímulo às pesquisas no câncer. Após ser ativado por seu ligante e dimerizar, o HER2 sofre o processo de fosforilação, e, a partir daí, ativa a rede de vias de proteínas (interligadas ou não), cuja consequência será a proliferação, crescimento, migração, diferenciação, adesão, motilidade, metabolismo e apoptose (ou inibição da apoptose) (Harries e Smith, 2002; Nahta e Esteva, 2006a; Connell e Doherty, 2017).

As duas vias mais importantes relacionadas ao HER2 parecem ser:

- 1) MAPK: *mitogen-activated protein kinase*- RAS-RAF-MEK-ERK: essa via é o maior alvo das terapias contra o câncer. A via MEK-ERK-MAPK interage com mais de cem substratos para dar início às funções fisiológicas e patológicas da célula, como citadas anteriormente. A RAS inicia a ativação; a RAF, através de outras reações químicas ativará a MEK1 e a MEK2. A MEK1/2 estimulará a ERK, que

então fosforilará múltiplos substratos para induzir respostas biológicas. A ERK e suas isoformas ERK1 e ERK 2 além de bastante estudadas como responsáveis no processo da oncogênese, são essenciais a várias atividades fisiológicas como desenvolvimento, imunidade, metabolismo e formação da memória (Nahta e Esteva, 2006a; Nahta, 2012b; Busca *et al.*, 2016; Wee e Wang, 2017).

- 2) PI3K: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*- PI3K-AKT-mTOR: esta via é frequentemente superativada devido a mutações no EGFR. Elas suprimem o famoso supressor tumoral PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) o qual antagoniza a atividade da PI3K. A PI3K apresenta 3 classes, I, II, e III. A PI3K classe I é a maior efetora dos EGFR. Quando ela fosforila a PIP2 (*lipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*), dá origem à PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*), que é um potente mediador da sua ação. A AKT é também conhecida como PKB (*Protein Kinase B*), ativa a PI3K a formar a PIP3. Há 3 membros da família AKT: AKT1, AKT2 e AKT3, e elas são encontradas tanto no citoplasma quanto no núcleo celular. As isoformas AKT parecem exercer funções diferentes tanto fisiologicamente como na tumorigênese. Um dos papéis importantes da AKT é sinalizar a mTOR (*mammalian target of rapamycin*). A mTOR é sabidamente responsável pela regulação do crescimento celular e autofagia. Os componentes dessa via coordenam a absorção de nutrientes, para melhor dar suporte ao crescimento das células tumorais. Essa via apresenta-se desregulada no envelhecimento e em doenças como o diabetes e o autismo (Nahta, 2012a; Busca *et al.*, 2016; Wee e Wang, 2017)

6.5.4. AS CASPASES

A superexpressão do HER2 nos tumores tem estrita relação com o bloqueio da expressão das caspases no funcionamento das células malignas (Arman *et al.*, 2014). As caspases são proteases não somente essenciais no processo de apoptose elas são as próprias executoras desse processo. A apoptose é um processo de morte celular programada, que não é importante apenas na embriogênese e durante os múltiplos

eventos fisiológicos que ocorrem durante a vida, mas é altamente relevante em diversas doenças do ser humano. Nos últimos anos ficou mais evidente que o processo neoplásico não é só a consequência de uma proliferação celular anárquica, mas também se deve a um prejuízo da apoptose (Arman *et al.*, 2014).

A célula alterada adquire uma capacidade de “fugir” do controle apoptótico natural, seja por inativação dos fatores apoptóticos, por produção inapropriada das proteínas apoptóticas, ou por expressão de proteínas anti-apoptóticas (Fulda, 2017; Ramirez e Salvesen, 2018).

Nos vertebrados, as caspases apoptóticas podem ser subdivididas em iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e em efetoras (caspases 3, 6 e 7), e agem através de 2 vias apoptóticas: uma via intrínseca, e outra, extrínseca (Arman *et al.*, 2014; Ramirez e Salvesen, 2018).

As caspases ficam restritas a zimogênios inativos aguardando o sinal de ativação. No mecanismo extrínseco, elas são ativadas através de ligantes nos receptores de membrana (*death ligands and death receptors*) como o CD95Fas/Apo1, o Fator de Necrose Tumoral α (α -TNF- α *Tumor Necrose Factor*) e TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing-Ligand*). Esta ligação ativa a caspase 8, que ativa a caspase 3, chave das caspases efetoras. A caspase 8 ativa a membrana mitocondrial através de proteínas da família Bcl-2, iniciando simultaneamente a via intrínseca da apoptose mediada pelas mitocôndrias. A membrana externa da mitocôndria fica permeável e libera no citoplasma proteínas apoptogênicas como o citocromo-c e como o ativador mitocondrial das caspases (*Smac-second mitochondria-derived activator of caspases*), que formarão um complexo chamado apoptosoma. O apoptosoma é o citocromo-c, APAF-1, e caspase 9, ativando a caspase 9, e, conseqüentemente, a caspase 3. O Smac se liga à proteína inibidora da apoptose (*IAP-Inhibitor of Apoptosis Protein*) desligando-a, das caspases 3, 7 e 9 e assim facilitando a sua ativação. A resistência à morte celular tem sido vista como uma característica elementar do câncer, e modular a atividade das caspases pode ser uma abordagem terapêutica (Fulda, 2017).

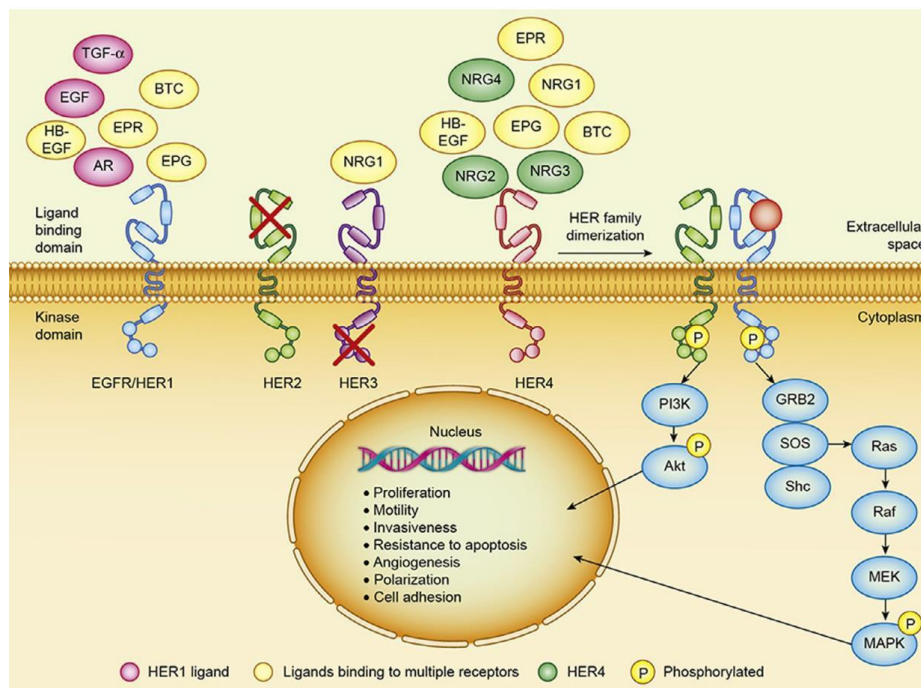
6.6. AS DROGAS-ALVO ANTI-HER2

Frente a todo esse avanço científico sobre os mecanismos moleculares, foi possível se desenvolver drogas que atuassem diretamente sobre as moléculas de interesse, isto é, drogas-alvo, com menos toxicidade que a quimioterapia convencional. Drogas de primeira geração, como os anticorpos monoclonais, e drogas inibidoras das tirosina-quinases (*TKI- Tyrosine Kinase Inhibitors*) anti-HER2 foram aprovadas pela FDA como drogas de primeira linha em pacientes com câncer de mama que apresentassem mutações em *HER2*, baseadas em estudos clínicos que mostraram taxas de resposta superiores de Sobrevida Livre de Doença (SLD) e Sobrevida Global (SG), em relação à QT (Gutierrez e Schiff, 2011).

Duas drogas que revolucionaram o tratamento das neoplasias HER2 positivas são o TRASTUZUMABE e o LAPATINIBE. O Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao domínio extracelular do HER2 impedindo sua dimerização, e assim bloqueia a sua ação. O Lapatinibe é uma pequena molécula inibidora das TQ, que tem ação sobre o domínio intracelular do HER2. O Trastuzumabe, em combinação com a QT trouxe um robusto incremento na SLD e na SG de pacientes com câncer de mama, tanto nos casos avançados como iniciais. O Lapatinibe, quando empregado em associação com a Capecitabina, diminui a progressão da doença em comparação à Capecitabina utilizada como droga única (Nahta e Esteva, 2006b; Scaltriti *et al.*, 2015; Segovia-Mendoza *et al.*, 2015). (Figura 4)

Figura 4 .Mecanismos de ação das terapias anti-HER2: (A) internalização e degradação do Receptor HER2;(B) Ativação anticorpo dependente da citotoxicidade (C) Inibição da dimerização do HER2 (D) internalização do Complexo formado com o Trastuzumabe modificado (T-DM1) seguida por uma degradação lisossomal e liberação de metabólitos que rompem os microtúbulos (E) Inibição da TQ causando ruptura da transdução dos sinais pelas vias MAPK e PI3K.(F) Restauração da função do P27 (gene supressor tumoral), assim como diminui a síntese de histonas e DNA, inibe a proliferação da célula tumoral.

Fonte: Parak et al. Cancer Treatment Reviews 59 (2017)1-21.



A padronização para a pesquisa da expressão e da amplificação do HER2 só está estabelecida para a mama e estômago, (Yan *et al.*, 2014) e a extrapolação destas aferições para outros tipos de tumor, podem trazer respostas imprevisíveis às drogas-alvo.

6.6.1. TRASTUZUMABE

O Trastuzumabe sem dúvida nenhuma tem sido o maior sucesso no campo dos agentes antineoplásicos molécula-alvo (Nahta e Esteva, 2007; Parakh *et al.*, 2017). Em meados de 1990, o esforço inicial para se criar um tratamento cujo alvo fosse a proteína HER2, levou ao desenvolvimento do 4D5, um anticorpo monoclonal de rato (AcM: *Monoclonal Antibody- mAb*), cuja mira era o DEC do HER2. Este AcM inibia fortemente as células de cultura HER2 positivas e fracamente as negativas. Pelo fato de o 4D5 ter origem em ratos, o sistema imune dos seres humanos reconhecia-o como um corpo estranho e produzia anticorpos contra ele. Então, através da engenharia genética, Carter e cols. “humanizaram” o 4D5 acrescentando uma imunoglobulina G a um de seus domínios. A droga foi chamada Trastuzumabe (*Trastuzumab-Herceptin*; Genetech, San Francisco, CA). O Trastuzumabe é menos antigênico que o 4D5 e se liga ao HER2 com uma afinidade três vezes maior (Harries e Smith, 2002; Nahta e Esteva, 2007; Kostyal *et al.*, 2012).

O Trastuzumabe se liga ao DEC IV do HER2, e alguns mecanismos de ação foram propostos:

- 1) Inibir a mudança de conformação do HER2, impedindo sua dimerização;
- 2) Inibição da via PI3K-AKT;
- 3) Inibição da angiogênese tumoral;
- 4) Citotoxicidade celular anticorpo-dependente: devido ao suporte principal do Trastuzumabe ser uma IgG, as células ligadas ao Trastuzumabe são reconhecidas pelo sistema imune e ativam resposta de citotoxicidade celular (*ADCC-antibody-dependent cellular cytotoxicity*). Assim, *natural killers* e macrófagos são ativados, destruindo as células do câncer;
- 5) Atenuação da sinalização celular (Tai *et al.*, 2010; Iqbal e Iqbal, 2014; Lion *et al.*, 2016).

O Trastuzumabe foi a primeira droga-alvo aprovada para a terapia contra câncers HER2 positivos (Nahta e Esteva, 2007; Yan *et al.*, 2014).

Os efeitos adversos mais comuns observados com o uso do Trastuzumabe são febre, vômitos, reações de infusão, diarreia, dor de cabeça, fadiga, *rash* cutâneo, neutropenia e anemia. Os parestesias mais graves incluem a cardiomiopatia, toxicidade pulmonar, reações na infusão, e neutropenia febril. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo deve ser avaliada sempre nos pacientes candidatos ao seu uso (Iqbal e Iqbal, 2014).

Contudo, muitos tumores começaram a apresentar resistência ao Trastuzumabe e, juntamente com a toxicidade cardíaca e sua incapacidade de agir nas metástases cerebrais, logo houve estímulo para a pesquisa de novas drogas-alvo. Os prováveis mecanismos da resistência a esta droga são a superexpressão dos outros HER, a ativação de outras vias de sinalização através da supressão do PTEN, mutações na via PI3K, alterações nos sítios de ligação do AcM, modificações nos mecanismos imunes da citotoxicidade celular, e a existência de sequências adicionais amplificadas do *HER2* (Nahta e Esteva, 2006b; Perez e Spano, 2012; Vicario *et al.*, 2015; Parakh *et al.*, 2017).

6.6.2. LAPATINIBE: INIBIDOR DAS TIROSINA- QUINASES (TKI-TYROSINE KINASE INHIBITOR)

Lapatinibe (*Tykerb*, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC, EUA) é um composto anilinoquinazolônico, não peptídico, para uso oral, análogo ao Trifostato de Adenosina (ATP). Se constitui de uma pequena molécula da primeira geração dos inibidores reversíveis das proteínas tirosino-quinases (TQ), que atua sobre os receptores HER2 e HER1 (inibidor duplo). O Lapatinibe se liga aos domínios intracelulares do HER2 e do HER1, impedindo a fosforilação das TQ, e o início das sinalizações das principais vias de sinalização da oncogênese MAPK e PI3K. Sendo análogo ao ATP, ele se liga ao sítio do ATP das TQ, e bloqueia a fosforilação e o início das reações químicas (induz à apoptose e diminui a proliferação celular). Embora o Lapatinibe seja um inibidor duplo, parece que sua maior atividade é sobre o HER2. (Tai *et al.*, 2010; Perez e Spano, 2012; Yan *et al.*, 2014; Segovia-Mendoza *et al.*, 2015; Rajaram *et al.*, 2017).

O Lapatinibe foi aprovado para uso em combinação com a Capecitabina em 2007 em pacientes com tumor de mama avançado HER2 positivo, que apresentassem progressão da doença na vigência do uso do Trastuzumabe, Antraciclinas e Taxanos. Ele foi aprovado como primeira linha em combinação com o Letrozole no tratamento de pacientes com câncer de mama que sejam Receptor Hormonal Positivo e HER2 positivo. Como agente único, o Lapatinibe apresenta bons resultados, em especial em pacientes já tratadas com Trastuzumabe. Estudos mostraram um outro benefício desta droga, que é o fato de ser uma molécula pequena: ela atravessa a barreira hemato-encefálica, e o seu uso diminuiu o volume das metástases cerebrais e aumentou a sobrevida (Nahta, 2012b; Iqbal e Iqbal, 2014).

Os principais efeitos colaterais do Lapatinibe são diarreia, anemia, síndrome mão-pé, disfunção hepática, náusea, *rash* cutâneo e neutropenia. (Iqbal e Iqbal, 2014).

Com o passar do tempo, as células tumorais também desenvolvem mecanismos de resistência ao Lapatinibe, e a maioria deles dizem respeito a mutações “escondidas” tanto no *HER2*, como nas proteínas das vias de sinalização, novos ligantes que estimulam o HER2, dimerização de outros HER com estabelecimento de “atalhos alternativos” das vias de sinalização (by-passes). As células tumorais acabam por “driblar” os bloqueios para sobreviver (Arteaga e Engelman, 2014; Segovia-Mendoza *et al.*, 2015).

A experiência clínica já validou o uso das drogas-alvo direcionadas ao HER2 principalmente, mas também aos outros integrantes da família EGFR. Entretanto, nos casos metastáticos, essas medicações não levam à cura, e, seguidamente, a doença adquire resistência. Existe, portanto, a necessidade de continuarmos buscando alternativas para essas pacientes. É muito importante que se “cubram todas as rotas de fuga” das vias de sinalização (mecanismo de resistência). Para isso, talvez seja necessária a combinação de múltiplas drogas, com novos ajustes de doses e intervalos (Perez e Spano, 2012; Arteaga e Engelman, 2014).

A associação do Trastuzumabe com o Lapatinibe tem se mostrado muito encorajadora no que diz respeito à SG, SLD e resposta patológica completa, especialmente nas pacientes com câncer de mama. A biologia molecular, sem dúvida

nenhuma, trouxe um avanço sem precedentes quanto ao entendimento do câncer, e com isso uma esperança de encontramos a cura desta enfermidade no futuro (Tai *et al.*, 2010; Wainberg *et al.*, 2010; Gligorov *et al.*, 2017; Parakh *et al.*, 2017).

Em 2017, Telli e cols. publicaram um trabalho com cultura de células de CC, a JAR, e testaram as drogas Erlotinibe (ITQ) e EGCG (epigallocatechin-3-gallete) separadamente e em associação com agentes quimioterápicos clássicos no tratamento da NTG, o MTX e a Act-D. Eles observaram expressão significativa de HER2 nas células JAR, uma diminuição da proliferação das células quando exposta às diferentes combinações das drogas, e um aumento das caspases, o que sugeriu a apoptose como possível mecanismo de inibição da proliferação celular.

6.7. AS CULTURAS DE CÉLULAS

A primeira linhagem celular, HeLa, foi criada em 1951 a partir de um câncer cervical. As células humanas diplóides foram desenvolvidas nos anos 60, para a manufatura de vacinas, entretanto, críticas a respeito de um agente oncogênico latente nessa linhagem de células, atrasaram a sua aceitação (Dumont, *et al.*, 2016).

A partir disso, Pattillo e diversos colaboradores, se dedicaram a pesquisas no campo de células trofoblásticas. Um sistema de células trofoblásticas sintetizadoras de hormônios humanos foi produzido *in vitro* e provou ser a primeira linhagem celular embrionária humana em cultura contínua. Iniciada a partir da biópsia de uma metástase cerebral de coriocarcinoma humano transplantada em um hamster, o sistema *in-vitro* de células trofoblásticas (Linhagem de células Be-Wo) derivada do coriocarcinoma gestacional foi mantido continuamente por 2 anos, e diversas passagens. A produção de hCG foi a marca para identificar essas células como trofoblásticas (Pattillo e Gey, 1968; Knoth, *et al.*, 1969).

Desde então, as linhagens de células de coriocarcinoma têm sido utilizadas para estudos do trofoblasto e funções placentárias, por serem mais fáceis de obter do que a cultura primária do trofoblasto.

Atualmente dispomos de 4 tipos de linhagens celulares de coriocarcinoma que são a BeWo, JEG3, JAR e ACH-3, cada uma com suas particularidades e semelhanças, o que deve ser valorizado conforme o estudo proposto. Por exemplo, a BeWo apresenta maior produção de hCG e maior transporte de glicose que as demais linhagens, por exemplo(Rothbauer *et al.*,2017).

Nosso estudo é com linhagens de célula de coriocarcinoma JEG3 e BeWo. Avaliamos a expressão do HER2, e submetemos as células ao Trastuzumabe e ao Lapatinibe Os resultados foram obtidos através de ensaios de proliferação e técnicas para confirmar a expressão protéica e gênica do HER2 nas diferentes culturas.

Optamos por utilizar a BeWo e a JEG3, por termos tido mais facilidade na obtenção das mesmas e termos encontrado mais literatura que as utilizava.

7. JUSTIFICATIVA:

A NTG é uma neoplasia relativamente rara, que atinge mulheres jovens, em idade fértil.

É altamente curável com quimioterapia, especialmente nos países desenvolvidos, onde a incidência é menor, e o acompanhamento das pacientes é realizado em Centros de Referência, na quase totalidade dos casos.

Todavia, uma parcela de pacientes desenvolve uma forma mais agressiva e resistente da doença, ou formas intrinsecamente resistentes à quimioterapia, como o TTSP e o TTE, e estas pacientes apresentarão metástases, doenças volumosas, e poderão morrer tanto por complicações da doença, como do tratamento.

As pacientes que apresentam doença resistente e/ou recorrente, serão submetidas a diversos ciclos de tratamento, combinando drogas gradativamente mais citotóxicas, padecendo se sofrimento físico e psicológico.

A engenharia genética e a biologia molecular nas últimas décadas apresentaram um avanço espetacular, e atualmente drogas-alvo como o Trastuzumabe e o Lapatinibe têm mostrado resultados estimulantes quando empregados em pacientes com tumores HER2 positivos. A literatura mostra que na DTG e na NTG encontramos superexpressão de HER2 nos casos de evolução menos favorável.

Através de cultura de células de coriocarcinoma JEG3 e BeWo, pudemos investigar a expressão do HER2, e o comportamento das células quando submetidas a essas drogas.

As culturas de células de coriocarcinoma começaram a ser desenvolvidas por Patillo e Gey, em 1968, e desde lá vêm sendo utilizadas por pesquisadores que estudam o trofoblasto e seus aspectos fisiológicos e patológicos.

A proposta do nosso estudo é testar em caráter experimental novas drogas que porventura possam ser utilizadas no tratamento de pacientes com NTG avançada,

resistente à quimioterapia e/ou recorrente, pois atualmente essas pacientes correm risco de vida tanto pela doença, como pela exposição ao tratamento.

8. HIPÓTESES:

ALTERNATIVA

As células de cultura de coriocarcinoma JEG3 e BeWo apresentam expressão significativa de HER2, e modificarão seu comportamento quando expostas às drogas-alvo Trastuzumabe e Lapatinibe.

NULA

As células de cultura de coriocarcinoma JEG3 e BeWo, apresentam expressão de HER2, e a submissão das drogas-alvo Trastuzumabe e Lapatinibe não provocará alteração nas mesmas.

9. OBJETIVOS:

9.1 PRINCIPAL:

Avaliar a resposta das linhagens de células de coriocarcinoma JEG3 e BeWo às diferentes drogas-alvo Trastuzumabe e Lapatinibe.

9.2 SECUNDÁRIOS:

- Avaliar a expressão proteica do HER2 nas linhagens de coriocarcinoma
- Avaliar a expressão do gene HER2 na linhagem celular JEG3.
- Determinar a concentração da droga e o tempo de exposição necessários para inibir a proliferação das células

10. REFERÊNCIAS:

NTG e HER2

ALAZZAM, M. et al. Gestational trophoblastic neoplasia, an ancient disease: new light and potential therapeutic targets. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 10, n. 2, p. 176-85, Feb 2010. ISSN 1875-5992 (Electronic)

1871-5206 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015010> >.

ARMAN, K. et al. The interrelationship between HER2 and CASP3/8 with apoptosis in different cancer cell lines. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 12, p. 8031-6, Dec 2014. ISSN 1573-4978 (Electronic)

0301-4851 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189649> >.

ARTEAGA, C. L.; ENGELMAN, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 282-303, Mar 17 2014. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651011> >.

AYATOLLAHI, H. et al. Chromogenic in situ Hybridization Compared with Real time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Evaluate HER2/neu Status in Breast Cancer. **Iran J Pathol**, v. 12, n. 2, p. 128-134, Spring 2017. ISSN 1735-5303 (Print)

1735-5303 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515634> >.

BEHNAMFAR, F.; ROUHOLAMIN, S.; ESTEKI, M. Presentation of Placental Site Trophoblastic Tumor with Amenorrhea. **Adv Biomed Res**, v. 6, p. 29, 2017. ISSN 2277-9175 (Print)

2277-9175 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28401076> >.

BELFORT, P. PERSPECTIVAS-PASSADO, PRESENTE E FUTURO NO DIAGNOSTICO DA DOENÇA TROFOBLASTICA GESTACIONAL. In: BELFORT, P.;MADI, J. M., et al (Ed.). **NEOPLASIA TROFOBLASTICA GESTACIONAL CONTROVERSIAS**. PRIMEIRA. RIO DE JANEIRO BRASIL: EDITORA RUBIO, v.1, 2007. cap. 1, p.3 A 9. ISBN 978-85-87600-91-2

BOLZE, P. A. et al. Formalised consensus of the European Organisation for Treatment of Trophoblastic Diseases on management of gestational trophoblastic diseases. **Eur J Cancer**, v. 51, n. 13, p. 1725-31, Sep 2015. ISSN 1879-0852 (Electronic)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092638>

[http://www.ejancer.com/article/S0959-8049\(15\)00494-3/fulltext](http://www.ejancer.com/article/S0959-8049(15)00494-3/fulltext) >.

BOLZE, P. A. et al. Mortality rate of gestational trophoblastic neoplasia with a FIGO score of ≥ 13 . **Am J Obstet Gynecol**, v. 214, n. 3, p. 390 e1-8, Mar 2016. ISSN 1097-6868 (Electronic)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433171> >.

BRAGA, A. et al. Epidemiological report on the treatment of patients with gestational trophoblastic disease in 10 Brazilian referral centers: results after 12 years since International FIGO 2000 Consensus. **J Reprod Med**, v. 59, n. 5-6, p. 241-7, May-Jun 2014. ISSN 0024-7758 (Print)

0024-7758 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937964> >.

BROWN, J. et al. 15 years of progress in gestational trophoblastic disease: Scoring, standardization, and salvage. **Gynecol Oncol**, v. 144, n. 1, p. 200-207, Jan 2017. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27743739> >.

BUSCA, R.; POUYSSEGUR, J.; LENORMAND, P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 53, 2016. ISSN 2296-634X (Print)

2296-634X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376062> >.

BUSSER, B. et al. The multiple roles of amphiregulin in human cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1816, n. 2, p. 119-31, Dec 2011. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21658434> >.

CAVALIERE, A. et al. Management of molar pregnancy. **J Prenat Med**, v. 3, n. 1, p. 15-7, Jan 2009. ISSN 1971-3282 (Print)

1971-3282 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439034> >.

CONNELL, C. M.; DOHERTY, G. J. Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. **ESMO Open**, v. 2, n. 5, p. e000279, 2017. ISSN 2059-7029 (Print)

2059-7029 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29209536> >.

DANTAS, P. R. S. et al. Does hormonal contraception during molar pregnancy follow-up influence the risk and clinical aggressiveness of gestational trophoblastic neoplasia after controlling for risk factors? **Gynecol Oncol**, v. 147, n. 2, p. 364-370, Nov 2017. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28927899> >.

DI MATTEI, V. E. et al. [Gestational Trophoblastic Disease: psychological impact and the role of defence mechanisms during illness and follow-up]. **Recenti Prog Med**, v. 106, n. 12, p. 641-5, Dec 2015. ISSN 2038-1840 (Electronic)

0034-1193 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26780074> >.

DREYFUS, M. [Maternal deaths due to gestational trophoblastic diseases, results from the French confidential enquiry into maternal deaths, 2010-2012]. **Gynecol Obstet Fertil Senol**, v. 45, n. 12S, p. S58-S60, Dec 2017. ISSN 2468-7189 (Electronic)

2468-7189 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113877> >.

DUMONT, J et al. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Crit Rev Biotechnol**, v.36, n.6, p 1110-1122, Dec 2016 . ISSN 15497801 (Electronic) 0738-8551 (Linking) Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26383226>>

ECCLES, S. A. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. **Int J Dev Biol**, v. 55, n. 7-9, p. 685-96, 2011. ISSN 1696-3547 (Electronic)

0214-6282 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22161825> >.

ESSEL, K. G. et al. Salvage chemotherapy for gestational trophoblastic neoplasia: Utility or futility? **Gynecol Oncol**, v. 146, n. 1, p. 74-80, Jul 2017. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473205> >.

EYSBOUTS, Y. K. et al. Trends in incidence for gestational trophoblastic disease over the last 20 years in a population-based study. **Gynecol Oncol**, v. 140, n. 1, p. 70-5, Jan 2016. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586414> >.

FUKAMI, T. et al. Amphiregulin regulates the production of human chorionic gonadotropin in trophoblasts. **Life Sci**, v. 84, n. 23-24, p. 796-804, Jun 5 2009. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344731> >.

FULDA, S. Therapeutic opportunities based on caspase modulation. **Semin Cell Dev Biol**, Dec 15 2017. ISSN 1096-3634 (Electronic)

1084-9521 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29247787> >.

FULOP, V. et al. c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. **J Reprod Med**, v. 43, n. 2, p. 101-10, Feb 1998. ISSN 0024-7758 (Print)

0024-7758 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9513871> >.

FULOP, V.; VEGH, G.; DOSZPOD, J. [The c-erbB-related oncoproteins in normal placenta and in gestational trophoblastic diseases (in vitro study)]. **Orv Hetil**, v. 142, n. 22, p. 1147-54, Jun 3 2001. ISSN 0030-6002 (Print)

0030-6002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424588> >.

GARCIA, M. T. et al. Pregnancy outcomes after chemotherapy for trophoblastic neoplasia. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 62, n. 9, p. 837-842, Dec 2016. ISSN 1806-9282 (Electronic)

0104-4230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28001257> >.

GARI, A. Placental site trophoblastic tumor and choriocarcinoma: an unusual presentation. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 703, Nov 23 2015. ISSN 1756-0500 (Electronic)

1756-0500 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597227> >.

GIULIANO, R. J.; BIANCONI, M. I. HISTORIA DA DOENÇA TROFOBLASTICA GESTACIONAL NA ARGENTINA. In: BELFORT, P.;MADI, J. M., *et al* (Ed.). **NEOPLASIA TROFOBLASTICA GESTACIONAL-CONTROVERSIAS**. PRIMEIRA. RIO DE JANEIRO -BRASIL: EDITORA RUBIO, v.1, 2007. cap. 3, p.17 A 25. ISBN 978-85-87600-91-2.

GLIGOROV, J.; RICHARD, S.; TODOROVIC, V. New anti-HER2 agents: from second-generation tyrosine kinases inhibitors to bifunctional antibodies. **Curr Opin Oncol**, v. 29, n. 6, p. 405-410, Nov 2017. ISSN 1531-703X (Electronic)

1040-8746 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28984651> >.

GRILLO, B. M. Estadiamento e sistemas de avaliação de risco: histórico, análise crítica , vantagens e desvantagens. In: BELFORT, P.;MADI, J. M., *et al* (Ed.). **Neoplasia Trofoblástica Gestacional: Controvérsias**. 1. Rio de Janeiro- RJ Brazil: Editora Rúbio, v.1, 2007. cap. 6, p.41 a 46. ISBN 978-85-87600-91-2.

GRILLO, B. M. ESTADIAMENTOS E SISTEMAS DE AVALIACAO DE RISCO-HISTORICO, ANALISE CRITICA, VANTAGENS E DESVANTAGENS. In: BELFORT, P.;MADI, J. M., *et al* (Ed.). **NEOPLASIA TROFOBLASTICA - CONTROVERSIAS**. PRIMEIRA. RIO DE JANEIRO -BRASIL: EDITORA RUBIO, v.1, 2007. cap. 6, p.41 A 46. ISBN 978-85-87600-91-2.

GUEYE, M. et al. Fatal Cases of Gestational Trophoblastic Neoplasia in a National Trophoblastic Disease Reference Center in Dakar Senegal. **Int J MCH AIDS**, v. 5, n. 1, p. 32-8, 2016. ISSN 2161-8674 (Print)

2161-864X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27622010> >.

GUTIERREZ, C.; SCHIFF, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 1, p. 55-62, Jan 2011. ISSN 1543-2165 (Electronic)

0003-9985 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204711> >.

HALPERIN, R. et al. Expression of the p53 gene and apoptosis in gestational trophoblastic disease. **Placenta**, v. 21, n. 1, p. 58-62, Jan 2000. ISSN 0143-4004 (Print)

0143-4004 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692252> >.

HARRIES, M.; SMITH, I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). **Endocr Relat Cancer**, v. 9, n. 2, p. 75-85, Jun 2002. ISSN 1351-0088 (Print)

1351-0088 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121832> >.

HASANZADEH, M. et al. Immunohistochemistry Study of P53 and C-erbB-2 Expression in Trophoblastic Tissue and Their Predictive Values in Diagnosing Malignant Progression of Simple Molar Pregnancy. **Iran J Cancer Prev**, v. 9, n. 3, p. e4115, Jun 2016. ISSN 2008-2398 (Print)

2008-2398 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27703642> >.

HASANZADEH, M. et al. Fertility sparing surgery in gestational trophoblastic neoplasia: A report of 4 cases. **Int J Reprod Biomed (Yazd)**, v. 14, n. 9, p. 603-606, Sep 2016. ISSN 2476-4108 (Print)

2476-3772 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27738663> >.

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Mol Biol Int**, v. 2014, p. 852748, 2014. ISSN 2090-2182 (Print)

2090-2182 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25276427> >.

JAGTAP, S. V. et al. Gestational Trophoblastic Disease - Clinicopathological Study at Tertiary Care Hospital. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 8, p. EC27-EC30, Aug 2017. ISSN 2249-782X (Print)

0973-709X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28969138> >.

KAJII, T.; OHAMA, K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. **Nature**, v. 268, n. 5621, p. 633-4, Aug 18 1977. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/561314> >.

KNOTH, M. et al. Ultrastructure and hormone synthesis of choriocarcinoma in vitro. **Am J Pathol**, v. 54, n. 3, p. 479-88, Mar 1969. ISSN 0002440 (Print)

00029440 (Linking) Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5813147> >

KOHORN, E. I. Dynamic staging and risk factor scoring for gestational trophoblastic disease. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, n. 5, p. 1124-30, Sep-Oct 2007. ISSN 1048-891X (Print)

1048-891X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386047> >.

KONG, Y. et al. Clinical characteristics and prognosis of ultra high-risk gestational trophoblastic neoplasia patients: A retrospective cohort study. **Gynecol Oncol**, v. 146, n. 1, p. 81-86, Jul 2017. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28461032> >.

KOSTYAL, D. et al. Trastuzumab and lapatinib modulation of HER2 tyrosine/threonine phosphorylation and cell signaling. **Med Oncol**, v. 29, n. 3, p. 1486-94, Sep 2012. ISSN 1559-131X (Electronic)

1357-0560 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21769502> >.

LEWIS, J. L., JR. Past, present and future of gestational trophoblastic diseases. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 60 Suppl 1, p. S121-7, Apr 1998. ISSN 0020-7292 (Print)

0020-7292 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9833624> >.

LI, H. W.; TSAO, S. W.; CHEUNG, A. N. Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. **Placenta**, v. 23, n. 1, p. 20-31, Jan 2002. ISSN 0143-4004 (Print)

0143-4004 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869089> >.

LION, M. et al. Trastuzumab as a preoperative monotherapy does not inhibit HER2 downstream signaling in HER2-positive breast cancer. **Oncol Lett**, v. 12, n. 3, p. 2028-2032, Sep 2016. ISSN 1792-1074 (Print)

1792-1074 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27602133> >.

LURAIN, J. R. Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. **Am J Obstet Gynecol**, v. 203, n. 6, p. 531-9, Dec 2010. ISSN 1097-6868 (Electronic)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728069> >.

_____. Gestational trophoblastic disease II: classification and management of gestational trophoblastic neoplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 204, n. 1, p. 11-8, Jan 2011. ISSN 1097-6868 (Electronic)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739008> >.

LYBOL, C. et al. Fatal cases of gestational trophoblastic neoplasia over four decades in the Netherlands: a retrospective cohort study. **BJOG**, v. 119, n. 12, p. 1465-72, Nov 2012. ISSN 1471-0528 (Electronic)

1470-0328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925191> >.

MAESTA, I. et al. Prognostic factors associated with time to hCG remission in patients with low-risk postmolar gestational trophoblastic neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 130, n. 2, p. 312-6, Aug 2013. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707672> >.

MENCZER, J. et al. Assessment of Her-2/neu expression in hydatidiform moles for prediction of subsequent gestational trophoblastic neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 104, n. 3, p. 675-9, Mar 2007. ISSN 0090-8258 (Print)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126893> >.

MITROVIC, S. et al. Gestational choriocarcinoma of the cervix. **Arch Iran Med**, v. 17, n. 11, p. 783-5, Nov 2014. ISSN 1735-3947 (Electronic)

1029-2977 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365622> >.

MOASSER, M. M. Two dimensions in targeting HER2. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 19, p. 2074-7, Jul 1 2014. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868026> >.

NAGAMINE, K. et al. Placental site trophoblastic tumor with sole metastasis to breast: A case report. **Gynecol Oncol Rep**, v. 21, p. 86-90, Aug 2017. ISSN 2352-5789 (Print)

2352-5789 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28795129> >.

NAHTA, R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. **ISRN Oncol**, v. 2012, p. 428062, 2012a. ISSN 2090-567X (Electronic)

2090-5661 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23227361> >.

_____. New developments in the treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 4, p. 53-64, May 1 2012b. ISSN 1179-1314 (Print)

1179-1314 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869176> >.

NAHTA, R.; ESTEVA, F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. **Breast Cancer Res**, v. 8, n. 6, p. 215, 2006a. ISSN 1465-542X (Electronic)

1465-5411 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096862> >.

_____. Herceptin: mechanisms of action and resistance. **Cancer Lett**, v. 232, n. 2, p. 123-38, Feb 8 2006b. ISSN 0304-3835 (Print)

0304-3835 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16458110> >.

_____. Trastuzumab: triumphs and tribulations. **Oncogene**, v. 26, n. 25, p. 3637-43, May 28 2007. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17530017> >.

NEUBAUER, N. L. et al. Fatal gestational trophoblastic neoplasia: An analysis of treatment failures at the Brewer Trophoblastic Disease Center from 1979-2012 compared to 1962-1978. **Gynecol Oncol**, v. 138, n. 2, p. 339-42, Aug 2015. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26047591> >.

NGAN, H. Y. et al. Update on the diagnosis and management of gestational trophoblastic disease. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 131 Suppl 2, p. S123-6, Oct 2015. ISSN 1879-3479 (Electronic)

0020-7292 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433668> >.

NILSSON, U. W. et al. Effects of gefitinib, an epidermal growth factor receptor inhibitor, on human placental cell growth. **Obstet Gynecol**, v. 122, n. 4, p. 737-44, Oct 2013. ISSN 1873-233X (Electronic)

0029-7844 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084529> >.

NOMURA, S. et al. Autocrine mechanism of epidermal growth factor in choriocarcinoma cell proliferation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 124, n. 1-2, p. 63-9, Nov 29 1996. ISSN 0303-7207 (Print)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027325> >.

PARAKH, S. et al. Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment. **Cancer Treat Rev**, v. 59, p. 1-21, Sep 2017. ISSN 1532-1967 (Electronic)

0305-7372 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28715775> >.

PATTILLO, R.A.; GEY, G.O. The establishment of cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. **Cancer Res**, v.28, n.7, p 1231-6, Jul 1968. ISSN 0008-5472 (Printing)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4299001>>.

PEREZ, E. A.; SPANO, J. P. Current and emerging targeted therapies for metastatic breast cancer. **Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3014-25, Jun 15 2012. ISSN 1097-0142 (Electronic)

0008-543X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006669> >.

PIRES, L. V. et al. Role of hysterectomy in the management of patients with gestational trophoblastic neoplasia: importance of receiving treatment in reference centers. **J Reprod Med**, v. 57, n. 7-8, p. 359-68, Jul-Aug 2012. ISSN 0024-7758 (Print)

0024-7758 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22838254> >.

RAJARAM, P. et al. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. **Indian J Dent Res**, v. 28, n. 6, p. 687-694, Nov-Dec 2017. ISSN 1998-3603 (Electronic)

0970-9290 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29256471> >.

RAMIREZ, M. L. G.; SALVESEN, G. S. A primer on caspase mechanisms. **Semin Cell Dev Biol**, Jan 12 2018. ISSN 1096-3634 (Electronic)

1084-9521 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29329946> >.

REVILLION, F. et al. ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. **Ann Oncol**, v. 19, n. 1, p. 73-80, Jan 2008. ISSN 1569-8041 (Electronic)

0923-7534 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962208> >.

RICHARD, S. et al. Pertuzumab and trastuzumab: the rationale way to synergy. **An Acad Bras Cienc**, v. 88 Suppl 1, p. 565-77, 2016. ISSN 1678-2690 (Electronic)

0001-3765 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27275646> >.

ROSKOSKI, R., JR. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacol Res**, v. 79, p. 34-74, Jan 2014. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269963> >.

ROTHBAUER, M. et al. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines. **Sci Rep**, v. 7, n.1, p 5892, Jul 2017. ISSN 20432322 (Electronic)

20432322(Linking). Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724925>>

SANTABALLA, A. et al. SEOM clinical guidelines in gestational trophoblastic disease (2017). **Clin Transl Oncol**, v. 20, n. 1, p. 38-46, Jan 2018. ISSN 1699-3055 (Electronic)

1699-048X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29149431> >.

SCALTRITI, M. et al. High HER2 expression correlates with response to the combination of lapatinib and trastuzumab. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 3, p. 569-76, Feb 1 2015. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467182> >.

SECKL, M. J.; SEBIRE, N. J.; BERKOWITZ, R. S. Gestational trophoblastic disease. **Lancet**, v. 376, n. 9742, p. 717-29, Aug 28 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673583> >.

SECKL, M. J. et al. Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 24 Suppl 6, p. vi39-50, Oct 2013. ISSN 1569-8041 (Electronic)

0923-7534 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999759> >.

SEGOVIA-MENDOZA, M. et al. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. **Am J Cancer Res**, v. 5, n. 9, p. 2531-61, 2015. ISSN 2156-6976 (Print)

2156-6976 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609467> >.

SHEN, Y.; WAN, X.; XIE, X. A metastatic invasive mole arising from iatrogenic uterus perforation. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 876, Dec 20 2017. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262807> >.

STANCULESCU, R. V. et al. Epithelioid trophoblastic tumor: a case report and literature review. **Rom J Morphol Embryol**, v. 57, n. 4, p. 1365-1370, 2016. ISSN 1220-0522 (Print)

1220-0522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28174805> >.

STEIGRAD, S. J. Epidemiology of gestational trophoblastic diseases. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 17, n. 6, p. 837-47, Dec 2003. ISSN 1521-6934 (Print)

1521-6934 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614884> >.

STEVENS, F. T. et al. Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. **Geburtshilfe Und Frauenheilkunde**, v. 75, n. 10, p. 1043-1050, Oct 2015. ISSN 0016-5751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000364398900013 >.

SZULMAN, A. E.; SURTI, U. The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations. **Am J Obstet Gynecol**, v. 131, n. 6, p. 665-71, Jul 15 1978a. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/686053> >.

The syndromes of hydatidiform mole. II. Morphologic evolution of the complete and partial mole. **Am J Obstet Gynecol**, v. 132, n. 1, p. 20-7, Sep 1 1978b. ISSN 0002-9378 (Print)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/696779> >.

TAI, W.; MAHATO, R.; CHENG, K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. **J Control Release**, v. 146, n. 3, p. 264-75, Sep 15 2010. ISSN 1873-4995 (Electronic)

0168-3659 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385184> >.

TARNEY, C. M. et al. Relative Effects of Age, Race, and Stage on Mortality in Gestational Choriocarcinoma. **Int J Gynecol Cancer**, v. 28, n. 2, p. 338-345, Feb 2018. ISSN 1525-1438 (Electronic)

1048-891X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29232272> >.

TEMPFER, C. et al. Gestational and Non-gestational Trophoblastic Disease. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k Level, AWMF Registry No. 032/049, December 2015). **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v. 76, n. 2, p. 134-144, Feb 2016. ISSN 0016-5751 (Print)

0016-5751 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26941444> >.

TUNCER, Z. S. et al. Expression of epidermal growth factor receptor-related family products in gestational trophoblastic diseases and normal placenta and its relationship with development of postmolar tumor. **Gynecol Oncol**, v. 77, n. 3, p. 389-93, Jun 2000. ISSN 0090-8258 (Print)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831347> >.

UBERTI, E. M. et al. Prevention of postmolar gestational trophoblastic neoplasia using prophylactic single bolus dose of actinomycin D in high-risk hydatidiform mole: a simple, effective, secure and low-cost approach without adverse effects on compliance to general follow-up or subsequent treatment. **Gynecol Oncol**, v. 114, n. 2, p. 299-305, Aug 2009. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427681> >.

UBERTI, E. M. H. et al. Importância e dificuldade na quantificação do hCG em pacientes com doença trofoblástica gestacional. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 30, p. 161 a 166, 1998. ISSN 0370-369.

UBERTI, E. M. H. et al. Doença Trofoblástica Gestacional: Peculiaridades do Diagnóstico, Manejo e complicações. In: URBANETZ, A. A. e LUZ, S. H. (Ed.). **PROAGO**

Programa de Atualização em Ginecologia e Obstetrícia Ciclo 7-Módulo 4

Sistema de Educação Médica Continuada a Distância. 1. Porto Alegre -Brasil: Artmed - Panamericana, v.7, 2011. cap. 3, p.51 a 106. ISBN 771-80-06347-00-2.

VAN DE VIJVER, M. J. Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). **Eur J Cancer**, v. 37 Suppl 1, p. S11-7, Jan 2001. ISSN 0959-8049 (Print)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167086> >.

VICARIO, R. et al. Patterns of HER2 Gene Amplification and Response to Anti-HER2 Therapies. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129876, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26075403> >.

WAINBERG, Z. A. et al. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 5, p. 1509-19, Mar 1 2010. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179222> >.

WANG, Y.; CAO, Y.; SUN, Y. Expression of c-erbB2 in gestational trophoblastic disease and its clinical significance. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 22, n. 2, p. 123-5, 2002. ISSN 1672-0733 (Print)

1672-0733 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12658752> >.

WEE, P.; WANG, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. **Cancers (Basel)**, v. 9, n. 5, May 17 2017. ISSN 2072-6694 (Print)

2072-6694 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28513565> >.

XIAO, C. et al. Management and prognosis of patients with brain metastasis from gestational trophoblastic neoplasia: a 24-year experience in Peking union medical college hospital. **BMC Cancer**, v. 15, p. 318, Apr 28 2015. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25927660> >.

YAN, M. et al. HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 6, p. 770-80, Jul 2014. ISSN 1532-1967 (Electronic)

0305-7372 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656976> >.

YANG, X. et al. The relationship between expression of c-ras, c-erbB-2, nm23, and p53 gene products and development of trophoblastic tumor and their predictive significance for the malignant transformation of complete hydatidiform mole. **Gynecol Oncol**, v. 85, n. 3, p. 438-44, Jun 2002. ISSN 0090-8258 (Print)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051871> >.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 127-37, Feb 2001. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252954> >.

YAZAKI-SUN, S. et al. Correlation of c-erbB-2 oncogene and p53 tumor suppressor gene with malignant transformation of hydatidiform mole. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 32, n. 3, p. 265-72, Jun 2006. ISSN 1341-8076 (Print)

1341-8076 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16764615> >.

ZHAO, P.; CHEN, Q.; LU, W. Comparison of different therapeutic strategies for complete hydatidiform mole in women at least 40 years old: a retrospective cohort study. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 733, Nov 9 2017. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29121880> >.

ZIMONJIC, D. B. et al. Localization of the human HER4/erbB-4 gene to chromosome 2. **Oncogene**, v. 10, n. 6, p. 1235-7, Mar 16 1995. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232.

ZIMONJIC, D. B. et al. Refined localization of the erbB-3 proto-oncogene by direct visualization of FISH signals on LUT-inverted and contrast-enhanced digital images of DAPI-banded chromosomes. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 80, n. 2, p. 100-2, Apr 1995. ISSN 0165-4608 (Print)

0165-4608.

11. ARTIGOS EM INGLÊS:

Artigo 1

Effect of Trastuzumab on cellular proliferation of choriocarcinoma cells

Leticia Viçosa Pires¹, Lolita Schneider Pizzolato², Elvira Alicia Aparicio Cordero², Jung-Chien Cheng³,
Yuyin Yi³, Peter CK Leung³, Ilma Simoni Brum^{*1,2},

1 Post-graduation Program in Gynecology and Obstetrics - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(CAPES scholarship holder, PDSE, Process Number 8881.131744/2016-01)

2 Laboratory of Molecular Biology Endocrine and Tumoral, Department of Physiology- Universidade
Federal do Rio Grande do Sul - Brazil

3 Department of Obstetrics and Gynaecology, BC Children's hospital research Institute, university of British
Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 4H4, Canada

****Correspondence to:***

Professor Ilma Simoni Brum, Department of Physiology- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 500
Sarmiento Leite, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Email address: ilma@ufrgs.br

Phone number: +55 51 33083559

Abstract:

The gestational trophoblastic diseases encompass several pregnancy-related disorders that include pre-malignant (partial and complete hydatidiform moles), and persistent, malignant entities that are referred as a gestational trophoblastic neoplasia represented by invasive moles, gestational choriocarcinoma, placental site trophoblastic tumour, and epithelioid trophoblastic tumour, the latter two being very rare entities. Chemotherapy approaches cure levels from 90 to 95%, although 5–10% of patients die from complications of the disease or from the treatment itself. The carcinogenesis involves several genetic events, including the activation of oncogenes and loss of tumour suppressor genes. Cellular processes in the trophoblast, such as proliferation, maturation and apoptosis, depend on the balance between the expression of proto-oncogenes and tumour suppressor genes. The HER2 proto-oncogene is involved in altering proliferation, survival and cell adhesion. In breast cancer, the overexpression of HER2 is associated with poor prognosis and increased recurrence rates and is also associated with choriocarcinoma. Trastuzumab is a monoclonal antibody that binds to HER2 and is used in the treatment of HER2+ breast cancer. This antibody leads to a partial inhibition of the intracellular signalling cascade, which may lead to the blockade of cell proliferation and apoptosis. The aim of this study was to analyse the expression of HER2 in choriocarcinoma cell lines, and the response to treatment with Trastuzumab on cell proliferation, gene and protein expression.

The treatments were performed in doses of 0.1; 1; 10; 50; 100 µg/mL followed by analysis at 24, 48, 72, 96, 120 hours. For each treatment, cell proliferation was evaluated by Sulforhodamine B assays. HER2 gene and protein expression were assessed at the most effective dose and time. The results showed that treatment with 50 µg/mL Trastuzumab for 96 hours inhibited approximately 50% of JEG-3 cell proliferation and also inhibited HER protein expression. Taken together, these results suggest that Trastuzumab can inhibit cell proliferation in choriocarcinoma cells. In the future, these findings may help identify an alternative treatment for patients with HER+ choriocarcinoma.

Key words: choriocarcinoma; HER2; Trastuzumab.

INTRODUCTION

Gestational trophoblastic disease (DTG) is a rare complication of pregnancy, and as such, affects women of reproductive age during the peak of life (Stevens, 2015). The incidence of choriocarcinoma (CC), which is a type of trophoblastic disease, is difficult to estimate because of its rarity and the difficulty in clinically distinguishing it from other kinds of gestational trophoblastic neoplasias due to the lack of histological material. Choriocarcinoma has been reported to affect approximately 1 in 40,000 to 9 in 40,000 pregnancies and can arise from any gestation (Ngan et al. 2015).

Although these tumours are rare, they have been routinely curable with treatment for over 50 years. One of the main considerations of the current treatments is to maintain cure rates while minimising exposure to excess chemotherapy, which can result in potential negative effects on fertility and future second tumour risks (Sita-Lumsden et al. 2012). Now, the challenge is to identify markers that can predict malignant transformation of GTD prior to any increase in hCG serum levels (Yazaki-Sun et al. 2006; Menczer et al. 2007)

Deaths from gestational trophoblastic neoplasia (GTN) are now rare events, with the overall cure rate exceeding 90%. Virtually all patients with nonmetastatic and metastatic low-risk disease will be cured, whereas up to 20% of patients with metastatic high-risk choriocarcinoma will die from their disease (Neubauer et al. 2015; Stevens et al. 2015).

The literature is limited on cases that failed fatally on treatment (Lybol et al. 2012). Some authors cite a mortality rate of 38.4% in patients with a score ≥ 13 (Bolze et al. 2016); 35% in brain metastatic disease (Kong et al, 2017), 29,7% advanced and brain disease (Xiao et al, 2015), 15.3% in stage IV in Thailand (Suprasert et al 2016); a 12.8% mortality rate was reported among all patients in Senegal

(Gueye et al. 2016); and a 10.3% mortality rate was reported in Brazil for high-risk GTN and placental site trophoblastic tumours (PSTT) in Reference Centres (Braga et al, 2014; Braga et al. 2016).

The social and economic differences between countries plays an important role in the treatment outcomes of these patients (Gueye et al. 2016). Several factors contribute to the admission of patients for treatment in advanced stages of GTN, therefore, decreasing the chance of cure, including a delay in diagnosis, the absence of Reference Centres, cultural problems, the time between the first evacuation and the admission of the patient, time to onset of GTN treatment, an uncertain follow up, low income (or no income) of the families, and a lack of resources for laboratory and anatomopathological analysis (Gueye et al. 2016).

Nevertheless, young women still die of GTN even in developed and rich countries. The widespread chemotherapy-resistant disease is the most common cause of death in some series (Seckl et al. 2010; Neubauer et al. 2015), but late presentation and diagnosis, extensive disease, haemorrhage from metastatic sites, post-term choriocarcinoma, infection, multisystem organ failure or tumour lysis syndrome are also associated with a fatal outcome (Lybol, 2012; Bolze et al.2016; Neubauer et al. 2015). It is, thus, imperative to offer some alternative for these young patients that present drug resistance, relapse, persistent or extensive disease, and/or failure to respond to multi-agent chemotherapy (Alazzam et al. 2010; Alazzam et al. 2016).

Mortality is closely related to late presentation and diagnosis as well as to drug resistance and recurrence. New treatment approaches are needed to reduce malignant transformation, increase the cure rates, reduce resistance/recurrence and, importantly, reduce toxic effects associated with current effects of chemotherapeutic regimens (Alazzam et al. 2010; Alazzam et al. 2016).

The critical characteristic of malignant neoplasms is abnormal proliferation. The human epidermal growth factor receptor (HER) family has been extensively researched in different types of cancers. They are transmembrane tyrosine kinases with an extracellular domain that may bind ligands and an intracellular domain involved in signal transduction. Ligand binding to a single receptor induces

conformational changes and dimerization, which activates the kinase activity of the intracellular domain and the downstream signalling cascade. Representatives of the HER family include HER1, HER2, HER3 and HER4 (Yarden et al, 2001; Levkowitz et al, 2002; Roskoski 2004; Arteaga and Engelman 2014; Iqbal and Iqbal, 2014; Zalloum et al, 2015).

HER2 gene amplification and HER2 protein overexpression is observed in several human malignancies, especially breast, lungs, gastric, colorectal, endometrium and ovary (Yarden et al, 2001; Yang et al, 2002; Levkovitz et al, 2002; Diaz et al, 2010; Wainberg et al, 2010; Teplinsky et al, 2014; Yan et al. 2014; Iqbal and Iqbal, 2014; Zalloum, 2015) .

Trastuzumab is the first humanized monoclonal antibody HER2-target therapy that was approved for the treatment of HER2+ breast cancers. These tumours are commonly more aggressive, with precocious metastasis and recurrence. Trastuzumab is used with good results in combination with chemotherapy (Slamon et al, 1989; Harries, 2002; Nahta and Estva, 2006 a; Nahta, 2006b, Nahta, 2007).

Trastuzumab is now approved for treatment of other neoplasms involving the lungs, stomach, colon, endometrium and ovary in association with chemotherapy or other tyrosine kinase inhibitors (Teplinsky et al 2014; Wang at al. 2015; Matsuzaki et al. 2015; Khalii, 2016; Keller et al. 2017)

The association of several oncogenes and tumour suppressor genes with GTN has been studied. An increased expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) has been reported in complete hydatidiform moles and in GTN. In fact, there was a correlation between the strength of EGFR expression and the aggressiveness of the disease (Fulop et al. 1998a; Tuncer et al. 2000; Yang et al. 2008; Hasanzadeh et al. 2016).

The effort to develop human EGFR 2-targeting agents for cancer therapy now spans more than two decades. Because *HER2* amplification underlies a large variety of cancers, the interest in this mode of cancer therapy continues to intensify. The monoclonal antibody Trastuzumab was developed in 1980. It binds to domain IV of the extracellular segment of the HER2 receptor and inhibits the tyrosine kinase signalling cascade. Trastuzumab was approved as part of a treatment regimen involving chemotherapy

(doxorubicin, cyclophosphamide and paclitaxel) for the adjuvant treatment of women with HER2-overexpressing breast cancer. Inclusion of Trastuzumab produces roughly a 50% improvement in disease-free survival and 33% improvement in overall survival of these patients (Harries, 2002; Moasser, 2014; Iqbq and Iqbal, 2014).

The aims of this study were to analyse the expression of HER2 in choriocarcinoma cell lines, and to determine the response to Trastuzumab on cell proliferation, gene amplification and protein expression.

In the present work, we investigated the expression of HER2 proteins in JEG3 choriocarcinoma cell lines and their responsiveness to the target-drug, monoclonal antibody Trastuzumab. As far as we know, this is the first time that the response to the antibody Trastuzumab has been assessed in a choriocarcinoma cell line.

We initially confirmed the presence of HER2 in JEG-3 cells and observed HER2 cytoplasmic expression in 60% of the samples and membrane expression in 40%. The expression or overexpression of HER2 in GTN and choriocarcinomas has been previously shown by immunochemical analyses. Fulop et al. (1998) observed that the expression of HER2 oncoprotein was significantly stronger in complete moles and in choriocarcinomas than in partial moles and normal placentas. A relationship between the overexpression of HER2 and the aggressiveness of these entities was suggested. Tuncer et al. (2000) showed that the level of expression of EGFR in choriocarcinoma and complete moles was significantly higher than that in both normal placentas and partial moles by comparing immunohistochemical analysis and *in situ* mRNA hybridization. In addition, EGFR expression was significantly higher in choriocarcinoma than in complete moles. Menczer et al. (2007) observed that the rate of HER2 expression was somewhat higher in moles with subsequent GTN than in moles with an uneventful course. Yang et al. (2002) found that HER2 expression was significantly stronger in complete moles that progressed to postmolar disease than in those that remitted after evacuation, and HER2 expression further

increased after malignant transformation. Yazaki-Sue et al. (2006) showed that the expression of HER2 has a positive predictive value of 70% in the progression of mole transformation. Yuxia et al. (2006) reported significantly higher HER2 expression in gestational trophoblastic tumours than in hydatidiform moles and normal placentas, while there was no difference between stage III and IV gestational trophoblastic tumours compared with stage I and II. Hazanzadeh et al. (2016) adopting the Endovision™ system to perform immunohistochemistry to detect the expression of HER2 observed a sensitivity of 90% and specificity of 92% with this method to detect the malignant progression of molar pregnancy to GTN. They also found a positive predictive value of 88.4% in developing GTN when the HER2 was overexpressed in the analysed tissues (Tuncer et al. 2000; Menczer et al. 2007; Yuxia et al 2002; Yang et al. 2002; Fulop et al. 1998b; Yazaki-Sun et al. 2006; Hasanzadeh et al. 2016).

To assess the effect of monoclonal antibody HER2-target therapy in a choriocarcinoma cell line, we treated JEG-3 with increasing doses of Trastuzumab, for 120 hours. A dose of 50 µg/mL in 96 hours could suppress the cell proliferation by 50%. The effect of Trastuzumab has been demonstrated in different cell lines, but not yet in a choriocarcinoma cell line such as JEG3.

Based on reports appearing in the literature, the trastuzumab concentration range selected was 0.01–500 µg/mL (Zazo et al. 2016). Zazo et al., studying the development of Trastuzumab resistance, worked with 10 breast cell lines and reached 60% of suppression of three wild cell lines after 10 µg/mL for 72 hours. Ithimakin et al. (2013) used five different breast cell lines and only obtained a response in the HER2-positive cells. They could suppress 50% of the cells after seven days of treatment with 21µg/mL of Trastuzumab. Kneissl et al. (2017), working with gastric cancer cell lines reached suppression of 50% of two of 10 cell lines with 10 µg/mL of Trastuzumab. Pivitera et al., using two lung cancer cell lines did not observe any results using Trastuzumab alone; however, addition of another HER2-target monoclonal antibody, Cetuximab, at 40 µg/mL each for 72 h, induced a significant growth inhibition of the cell (Zazo et al. 2016; Ithimakin et al. 2013; Kneissl et al. 2017; Pivitera et al. 2016).

The results of our study confirm the effect of Trastuzumab in reducing cell growth and suppressing the increase in cell number over time, as demonstrated by other authors in various cell lines (Canonici et al. 2013; Kostyal et al. 2012; Nahta and Esteva 2004; Wainberg et al. 2010; Ma et al. 2014; Privitera et al. 2016).

To assess the mechanism of action, JEG-3 cells were treated with 50 µg/ml of Trastuzumab for 96 hours, and *HER2* gene and protein expression were analysed. *HER2* gene amplification is the primary mechanism of HER2 overexpression, which is a key feature of the pathology of some cancers that is associated with poor prognosis especially for breast, stomach and lung cancers (Privitera et al. 2016; Dowsett et al. 2009; Yan 2011; Vicario et al. 2015).

In the present study, the same dose of Trastuzumab that can suppress the proliferation of cells was able to inhibit the expression of HER2 protein compared to the control cell group ($P = 0.003$), suggesting that the reduced cell proliferation resulted from the inhibition of HER2 protein after treatment.

Apoptosis in human cells that overexpress HER2 induced by the down-regulation of HER2 expression was suggested by Roh et al.(Canonici et al. 2013; Kostyal et al. 2012; Nahta and Esteva 2004; Wainberg et al. 2010; Ma et al. 2014; Privitera et al. 2016; Roh, et al.2000).

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture

Choriocarcinoma cell lines (JEG-3) were obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brazil. All cells were cultured in DMEM-Low Glucose/F12K supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) (GIBCO, BRL) and 1% (v/v) kanamycin (Invitrogen, EUA). All cell lines were grown in a 37 °C, humidified incubator in the presence of 5% (v/v) CO₂ gas. Passages were made with Trypsin/EDTA 0.25% (GIBCO, BRL) after reaching 80% confluence.

Drug treatment

Trastuzumab (21 mg/mL) (HERCEPTIN®, Genenich/Roche, Manufacturer Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was kindly provided by Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – Hospital Santa Rita and prepared in bacteriostatic water. The cultured cells were divided into the following groups: The treatments, performed on JEG-3 cells, were made in doses of 0.1; 1; 10; 50; 100 µg/mL and a control group without the drug and with water at different times including 24, 48, 72, 96, 120 hours. All treatments were performed for seven days, as previously standardized in our laboratory.

Cell proliferation

JEG-3 cells were seeded in 24-well plates (1×10^3 cells/well), divided into six groups for analysis (Control, 0.1; 1; 10; 50; 100 µg/mL of Trastuzumab) and separated according to different times (24, 48, 72, 96, 120 hours). After treatment, cell proliferation was measured using a modified Sulforhodamine B assay (SR-B) (Skehan et al., 1990). For the assay, the culture medium was replaced by a culture medium without foetal bovine serum (Papazisis et al., 1997), and the cells were fixed with 50% trichloroacetic acid (TCA) (100 µL per well). The plate was incubated at 4 °C for 1 hour. The culture medium containing TCA was then removed, and the plates were washed four times with slow-running tap water and completely dried in an air flow. Next, 200 µL of SR-B solution was added to each well. After 25 min, the plates were rinsed with 1% acetic acid to remove the unbound dye. The incorporated dye was solubilized in Tris base solution (200 µL per well), and the plates were shaken for 10 minutes. The optical density (OD) was read at 510 nm on a spectrophotometer (AnthosZenyth 200 rt).

To obtain the proportion of cell growth for each experimental group, the final absorbance values were adjusted relative to the initial number of cells plated. The proliferation for the control group was considered to be 100%.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells were lysed directly in wells containing 1 mL of Trizol per 10 cm² according to the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified using a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 µg of total RNA using the Oligo dT12-18 primer, according to the manufacturer's protocol. For quantitative analysis of messenger RNAs (mRNAs) by RT-PCR, we used Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA samples were amplified on the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amplification reaction was normalized by the reference gene GAPDH.

Primer design

Primers were designed and synthesized by IDT (IDT, Integrated DNA Technologies, Coraville, IA). The sequences are as follows: HER2: forward 5'-ACCTGCTGAACTGGTGTATG-3', reverse 5'-TGACATGGTTGGGACTCTTG-3'; GAPDH: forward 5'-CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG-3', reverse 5'-TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC-3'.

Western blotting

JEG-3 cells were homogenized in RIPA buffer and incubated at 4 °C for 1 h, followed by centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatant was transferred to a clean tube, and the Bradford colorimetric method was used to determine protein concentration (Bradford, 1976). Then, 30 µg

of protein was separated by 10% SDS-PAGE for 3 h at 120 V, followed by transfer to Hybond™-ECL membranes (90 min at 100 V). The transferred membranes were incubated for 1 h in blocking solution containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.05% Tween (TTBS), and 5% skimmed milk at pH 7.4. Subsequently, the membranes were incubated with the primary antibodies (all human monoclonal mouse antibodies) including anti-c-erbB-2 (neu/HER2) (AHO1011) and anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (MAB374) at 4 °C overnight. GAPDH was used as the control protein. After incubation with the secondary antibody (anti-mouse: A16160) for 2 h at room temperature, the membranes were exposed to chemiluminescent reagent (ECL) for approximately 1 min. Quantitative autoradiography (GE Healthcare1) was carried out with an image densitometer (Image J) to analyse protein levels. The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad). All the results were expressed as arbitrary units.

Immunocytochemistry

JEG3 cells were cultured in 6-well plates with coverslips to 60–70% of confluence, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min at room temperature. For permeabilization and antigen access, cells were incubated with citrate buffer for 1 h at 62.5 °C, washed with PBS and incubated with 5% hydrogen peroxide in methanol (Merk). Nonspecific antibody reactions were blocked with 5% skim milk in PBS. Subsequently, the samples were incubated with anti-mouse Ig (1:100, Thermo / catálogo A16160) overnight at 4 °C in gentle agitation. After washing with PBS, the cells were incubated for 1 h with the secondary antibody anti-rabbit anti-human c-erbB-2 (neu/HER2) - conjugated (1:100, Invitrogen) at room temperature. Bright-field images were captured with a camera linked to a microscope to ascertain protein expression.

Statistical analysis

Data from HER2 gene expression were evaluated quantitatively by the Mann-Whitney test, and data from HER2 protein expression were evaluated quantitatively by the *t*-test. Cell proliferation results were evaluated using Generalized Estimating Equations (GEE), followed by Bonferroni or Least Significance Difference (LSD) for multiple comparisons. Data were analysed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, v. 21.0) and statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Evaluation of the expression of HER2 in the JEG-3 cell line

The presence of HER2 in the JEG-3 cell line was confirmed by immunocytochemistry of some samples prior to the initiation of all experiments. The immunohistochemical analyses showed significant HER2-positive cytoplasmic immunoreactivity (60%) and positive membrane immunoreactivity (40%) in the cells using an antibody concentration of 1:25 (Fig. 1).

Cell proliferation

After treatment of the six groups at the specified doses and times, the treatment with Trastuzumab at a dose of 50 $\mu\text{g/mL}$ for 96 h inhibited approximately 50% of the cell proliferation of the JEG-3 cell line in modified sulforhodamine B assays compared to that of the control group (Fig. 2).

Gene expression

Treatment with Trastuzumab at a dose of 50 µg/mL for 96 h was chosen for evaluation of the expression of the *HER2* gene. The results showed that *HER2* gene expression was similar in the treated group when compared to that of the control group (Fig. 3).

Protein expression

HER2 protein expression was evaluated in the various cell groups by Western blot analysis. Treatment of the cell groups with Trastuzumab 50 µg/mL for 96 h was associated with a decrease in HER2 protein levels when compared to that of the control cell group ($P = 0.003$). (Fig. 4).

DISCUSSION

Although GTN is a highly curable disease with chemotherapy, 20 to 40% of patients with advanced disease fail in treatment, because of multidrug resistance or metastatic recurrent diseases. Furthermore, patients with PSTT and epithelioid trophoblastic tumours (ETT) are usually resistant to conventional chemotherapy. With the development of new treatment approaches as targeted drugs it is necessary that we investigate alternatives for these young patients. These drugs also have the main advantage of less toxicity and increment of net drug uptake by neoplastic cells.

In the present work, we investigated the expression of HER2 proteins in JEG3 choriocarcinoma cell lines and their responsiveness to the target-drug, monoclonal antibody Trastuzumab. As far as we know, this is the first time that the response to the antibody Trastuzumab has been assessed in a choriocarcinoma cell line.

We initially confirmed the presence of HER2 in JEG-3 cells and observed HER2 cytoplasmic expression in 60% of the samples and membrane expression in 40%. The expression or overexpression of HER2 in GTN and choriocarcinomas has been previously shown by immunochemical analyses. Fulop et al.

(1998) observed that the expression of HER2 oncoprotein was significantly stronger in complete moles and in choriocarcinomas than in partial moles and normal placentas. A relationship between the overexpression of HER2 and the aggressiveness of these entities was suggested. Tuncer et al. (2000) showed that the level of expression of EGFR in choriocarcinoma and complete moles was significantly higher than that in both normal placentas and partial moles by comparing immunohistochemical analysis and *in situ* mRNA hybridization. In addition, EGFR expression was significantly higher in choriocarcinoma than in complete moles. Menczer et al. (2007) observed that the rate of HER2 expression was somewhat higher in moles with subsequent GTN than in moles with an uneventful course. Yang et al. (2002) found that HER2 expression was significantly stronger in complete moles that progressed to postmolar disease than in those that remitted after evacuation, and HER2 expression further increased after malignant transformation. Yazaki-Sue et al. (2006) showed that the expression of HER2 has a positive predictive value of 70% in the progression of mole transformation. Yuxia et al. (2006) reported significantly higher HER2 expression in gestational trophoblastic tumours than in hydatidiform moles and normal placentas, while there was no difference between stage III and IV gestational trophoblastic tumours compared with stage I and II. Hazanzadeh et al. (2016) adopting the Endovysion™ system to perform immunohistochemistry to detect the expression of HER2 observed a sensitivity of 90% and specificity of 92% with this method to detect the malignant progression of molar pregnancy to GTN. They also found a positive predictive value of 88.4% in developing GTN when the HER2 was overexpressed in the analysed tissues (Tuncer et al. 2000; Menczer et al. 2007; Yuxia et al. 2002; Yang et al. 2002; Fulop et al. 1998b; Yazaki-Sun et al. 2006; Hasanzadeh et al. 2016).

To assess the effect of monoclonal antibody HER2-target therapy in a choriocarcinoma cell line, we treated JEG-3 with increasing doses of Trastuzumab, for 120 hours. A dose of 50 µg/mL in 96 hours could suppress the cell proliferation by 50%. The effect of Trastuzumab has been demonstrated in different cell lines, but not yet in a choriocarcinoma cell line such as JEG3.

Based on reports appearing in the literature, the trastuzumab concentration range selected was 0.01–500 µg/mL (Zazo et al. 2016). Zazo et al., studying the development of Trastuzumab resistance, worked

with 10 breast cell lines and reached 60% of suppression of three wild cell lines after 10 μ /mL for 72 hours. Ithimakin et al. (2013) used five different breast cell lines and only obtained a response in the HER2-positive cells. They could suppress 50% of the cells after seven days of treatment with 21 μ /mL of Trastuzumab. Kneissl et al. (2017), working with gastric cancer cell lines reached suppression of 50% of two of 10 cell lines with 10 μ /mL of Trastuzumab. Pivitera et al., using two lung cancer cell lines did not observe any results using Trastuzumab alone; however, addition of another HER2-target monoclonal antibody, Cetuximab, at 40 μ /mL each for 72 h, induced a significant growth inhibition of the cell (Zazo et al. 2016; Ithimakin et al. 2013; Kneissl et al. 2017).

The results of our study confirm the effect of Trastuzumab in reducing cell growth and suppressing the increase in cell number over time, as demonstrated by other authors in various cell lines (Canonici et al. 2013; Kostyal et al. 2012; Nahta and Esteva 2004; Wainberg et al. 2010; Ma et al. 2014; Privitera et al. 2016).

To assess the mechanism of action, JEG-3 cells were treated with 50 μ g/ml of Trastuzumab for 96 hours, and *HER2* gene and protein expression were analysed. *HER2* gene amplification is the primary mechanism of HER2 overexpression, which is a key feature of the pathology of some cancers that is associated with poor prognosis especially for breast, stomach and lung cancers (Privitera et al. 2016; Dowsett et al. 2009; Yan 2011; Vicario et al. 2015).

In the present study, the same dose of Trastuzumab that can suppress the proliferation of cells was able to inhibit the expression of HER2 protein compared to the control cell group ($P = 0.003$), suggesting that the reduced cell proliferation resulted from the inhibition of HER2 protein after treatment.

Apoptosis in human cells that overexpress HER2 induced by the down-regulation of HER2 expression was suggested by Roh et al. (Canonici et al. 2013; Kostyal et al. 2012; Nahta and Esteva 2004; Wainberg et al. 2010; Ma et al. 2014; Privitera et al. 2016; Roh et al. 2000). Recently, Telli et al. exposed JAR choriocarcinoma cell lines to a combination of drugs including erlotinib (tyrosine kinase inhibitor), epigallocatechin-3-gallate (EGCG, a green tea catechin), actinomycin-D and methotrexate. They found

significant inhibition of HER2 protein levels, and showed synergetic effects of erlotinib and EGCG, with greater cytotoxicity than the controls with decreasing IC₅₀ cell concentration at the expense of apoptosis (Telli et al. 2017).

CONCLUSION

We conclude that treatment with Trastuzumab at a dose of 50 µg/mL for 96 hours showed a better dose-time effect on the inhibition of cellular proliferation of JEG-3 cells. Taken together, these results suggest a possible role of Trastuzumab in inhibiting cell proliferation in choriocarcinoma cells. Our study is significant for taking a fresh look at a traditional approach. Our data evidences the effects of this new target drug on choriocarcinoma molecular level and suggest an alternative treatment for patients with HER+ choriocarcinoma. Our findings also enhance the possibility of its application in the treatment of gestational trophoblastic neoplasia moreover prospects for further studies and research where it might be useful.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) (Grant number 8881.131744/2016-01).

REFERENCES

ALAZZAM, M. et al. Gestational trophoblastic neoplasia, an ancient disease: new light and potential therapeutic targets. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 10, n. 2, p. 176-85, Feb 2010.

ALAZZAM, M. et al. 2016. “Chemotherapy for Resistant or Recurrent Gestational Trophoblastic Neoplasia.” In *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

BOLZE, P. A. et al. Mortality rate of gestational trophoblastic neoplasia with a FIGO score of ≥ 13 . **Am J Obstet Gynecol**, v. 214, n. 3, p. 390 e1-8, Mar 2016

BRAGA, A. et al. Epidemiological report on the treatment of patients with gestational trophoblastic disease in 10 Brazilian referral centers: results after 12 years since International FIGO 2000 Consensus. **J Reprod Med**, v. 59, n. 5-6, p. 241-7, May-Jun 2014.

BRAGA, A. et al. 2016. “Centralized Coordination of Decentralized Assistance for Patients with Gestational Trophoblastic Disease in Brazil: A Viable Strategy for Developing Countries.” *The Journal of Reproductive Medicine* 61 (5-6): 224–29.

CANONICI et al. 2013. “Neratinib Overcomes Trastuzumab 9 Breast Cancer.” *Oncotarget* 4 (10): 1592–1605.

DIAZ, R. et al. 2010. “Antitumor and Antiangiogenic Effect of the Dual EGFR and HER-2 Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib in a Lung Cancer Model.” *BMC Cancer* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-188>.

DOWSETT, M. et al. 2009. “Disease-Free Survival according to Degree of HER2 Amplification for Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy with or without 1 Year of Trastuzumab:

- The HERA Trial.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (18): 2962–69.
- GUEYE, M. et al. 2016. “Diagnosis, Treatment and Outcome of Gestational Trophoblastic Neoplasia in a Low Resource Income Country.” *International Journal of MCH and AIDS* 5 (2): 112–18.
- FULOP, V. et al. c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. **J Reprod Med**, v. 43, n. 2, p. 101-10, Feb 1998
- FULOP, V.; VEGH, G.; DOSZPOD, J. [The c-erbB-related oncoproteins in normal placenta and in gestational trophoblastic diseases (in vitro study)]. **Orv Hetil**, v. 142, n. 22, p. 1147-54, Jun 3 2001.
- GUEYE, M. et al. Fatal Cases of Gestational Trophoblastic Neoplasia in a National Trophoblastic Disease Reference Center in Dakar Senegal. **Int J MCH AIDS**, v. 5, n. 1, p. 32-8, 2016.
- HARRIES, M.; SMITH, I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). **Endocr Relat Cancer**, v. 9, n. 2, p. 75-85, Jun 2002.
- HASANZADEH, M. et al. Immunohistochemistry Study of P53 and C-erbB-2 Expression in Trophoblastic Tissue and Their Predictive Values in Diagnosing Malignant Progression of Simple Molar Pregnancy. **Iran J Cancer Prev**, v. 9, n. 3, p. e4115, Jun 2016.
- ITHIMAKIN et al. 2013. “HER2 Drives Luminal Breast Cancer Stem Cells in the Absence of HER2 Amplification: Implications for Efficacy of Adjuvant Trastuzumab.” *Cancer Research* 73 (5): 1635–46.

- KELLER, G. et al. 2017. “New Concepts of Personalized Therapy in Salivary Gland Carcinomas.” *Oral Oncology* 68 (May): 103–13.
- KHALIL, H. S et al. 2016. “A Novel Mechanism of Action of HER2 Targeted Immunotherapy Is Explained by Inhibition of NRF2 Function in Ovarian Cancer Cells.” *Oncotarget* 7 (46): 75874–901.
- KNEISSL, J et al.2017. “Influence of the HER Receptor Ligand System on Sensitivity to Cetuximab and Trastuzumab in Gastric Cancer Cell Lines.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 143 (4): 573–600.
- IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Mol Biol Int**, v. 2014, p. 852748, 2014
- KONG, Y. et al. Clinical characteristics and prognosis of ultra high-risk gestational trophoblastic neoplasia patients: A retrospective cohort study. **Gynecol Oncol**, v. 146, n. 1, p. 81-86, Jul 2017.
- KOSTYAL, D. et al. Trastuzumab and lapatinib modulation of HER2 tyrosine/threonine phosphorylation and cell signaling. **Med Oncol**, v. 29, n. 3, p. 1486-94, Sep 2012.
- HARRIES, M.; SMITH, I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). **Endocr Relat Cancer**, v. 9, n. 2, p. 75-85, Jun 2002.
- Levkowitz, Gil, and Yosef Yarden. 2002. “ErbB.” In *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*.
- LYBOL, C. et al. Fatal cases of gestational trophoblastic neoplasia over four decades in the Netherlands: a retrospective cohort study. **BJOG**, v. 119, n. 12, p. 1465-72, Nov 2012.

- MA, T. et al. 2014. “Molecular Imaging Reveals Trastuzumab-Induced Epidermal Growth Factor Receptor Downregulation in Vivo.” *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 55 (6): 1002–7.
- MATSUZAKI, S. et al. 2015. “Potential Targets for Ovarian Clear Cell Carcinoma: A Review of Updates and Future Perspectives.” *Cancer Cell International* 15 (December): 117.
- MENCZER, J. et al. Assessment of Her-2/neu expression in hydatidiform moles for prediction of subsequent gestational trophoblastic neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 104, n. 3, p. 675-9, Mar 2007
- MOASSER, M. M. Two dimensions in targeting HER2. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 19, p. 2074-7, Jul 1 2014.
- NAHTA, R.; ESTEVA, F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. **Breast Cancer Res**, v. 8, n. 6, p. 215, 2006a.
- _____. Herceptin: mechanisms of action and resistance. **Cancer Lett**, v. 232, n. 2, p. 123-38, Feb 8 2006.
- NEUBAUER, N. L. et al. Fatal gestational trophoblastic neoplasia: An analysis of treatment failures at the Brewer Trophoblastic Disease Center from 1979-2012 compared to 1962-1978. **Gynecol Oncol**, v. 138, n 2, p. 339-42, Aug 2015.
- NGAN, H. Y. et al. Update on the diagnosis and management of gestational trophoblastic disease. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 131 Suppl 2, p. S123-6, Oct 2015
- PRIVITERA, G. et al. 2016. “In Vitro Antiproliferative Effect of Trastuzumab (Herceptin(®)) Combined with Cetuximab (Erbix(®)) in a Model of Human Non-Small Cell Lung

- Cancer Expressing EGFR and HER2.” *Clinical and Experimental Medicine* 16 (2): 161–68.
- ROH, H et al. 2000. “Down-Regulation of HER2/neu Expression Induces Apoptosis in Human Cancer Cells That Overexpress HER2/neu.” *Cancer Research* 60 (3): 560–65.
- ROSKOSKI, R 2004. “The ErbB/HER Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Cancer.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319 (1): 1–11.
- SITA-LUMSDEN, A. et al, 2012. “Treatment Outcomes for 618 Women with Gestational Trophoblastic Tumours Following a Molar Pregnancy at the Charing Cross Hospital, 2000–2009.” *British Journal of Cancer* 107 (11): 1810–14.
- SLAMON, D.J,1989. “Studies of the HER-2/neu Proto-Oncogene in Human Breast Cancer.” *Cancer Genetics and Cytogenetics* 41 (2): 219.
- SECKL, M. J.; SEBIRE, N. J.; BERKOWITZ, R. S. Gestational trophoblastic disease. **Lancet**, v. 376, n. 9742, p. 717-29, Aug 28 2010.
- STEVENS, F. T. et al. Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. **Geburtshilfe Und Frauenheilkunde**, v. 75, n. 10, p. 1043-1050, Oct 2015.
- SUPRASERT, et al. 2016. “Outcomes of Metastatic Gestational Trophoblastic Neoplasia: Fourteen Year Experience from a Northern Thailand Tertiary Care Center.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 17 (3): 1357–62.
- TEPLINSKY, Eleonora, and Franco Muggia. 2014. “Targeting HER2 in Ovarian and Uterine Cancers: Challenges and Future Directions.” *Gynecologic Oncology* 135 (2): 364–70.
- TUNCER, Z. S. et al. Expression of epidermal growth factor receptor-related family products in gestational trophoblastic diseases and normal placenta and its relationship with development of postmolar tumor. **Gynecol Oncol**, v. 77, n. 3, p. 389-93, Jun 2000.

- VICARIO, R. et al. Patterns of HER2 Gene Amplification and Response to Anti-HER2 Therapies. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e 0129876, 2015.
- WAINBERG, Z. A. et al. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 5, p. 1509-19, Mar 1 2010.
- XIAO, C. et al. Management and prognosis of patients with brain metastasis from gestational trophoblastic neoplasia: a 24-year experience in Peking union medical college hospital. **BMC Cancer**, v. 15, p. 318, Apr 28 2015
- WANG, C. J. et al, 2015. “The Combinational Therapy of Trastuzumab and Cetuximab Inhibits Tumor Growth in a Patient-Derived Tumor Xenograft Model of Gastric Cancer.” *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 18 (5): 507–14.
- YANG, J. et al. 2008. “Prognosis of Malignant Gestational Trophoblastic Neoplasia: 20 Years of Experience.” *The Journal of Reproductive Medicine* 53 (8): 600–607.
- YAN, M. et al. HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 6, p. 770-80, Jul 2014.
- YANG, X. et al. The relationship between expression of c-ras, c-erbB-2, nm23, and p53 gene products and development of trophoblastic tumor and their predictive significance for the malignant transformation of complete hydatidiform mole. **Gynecol Oncol**, v. 85, n. 3, p. 438-44, Jun 2002.
- YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 127-37, Feb 2001.

- YAZAKI-SUN, S. et al. Correlation of c-erbB-2 oncogene and p53 tumor suppressor gene with malignant transformation of hydatidiform mole. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 32, n. 3, p. 265-72, Jun 2006.
- YUXIA ET AL. 2002. "Expression of c-erbB2 in Gestational Trophoblastic Disease and Its Clinical Significance." *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 22 (2): 123–25.
- ZALLOUM ET AL. 2015. "Discovery of New Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) Inhibitors for Potential Use as Anticancer Agents via Ligand-Based Pharmacophore Modeling." *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 61 (September): 61–84.
- ZAZO ET AL. 2016. "Generation, Characterization, and Maintenance of Trastuzumab-Resistant HER2+ Breast Cancer Cell Lines." *American Journal of Cancer Research* 6 (11): 2661–78.

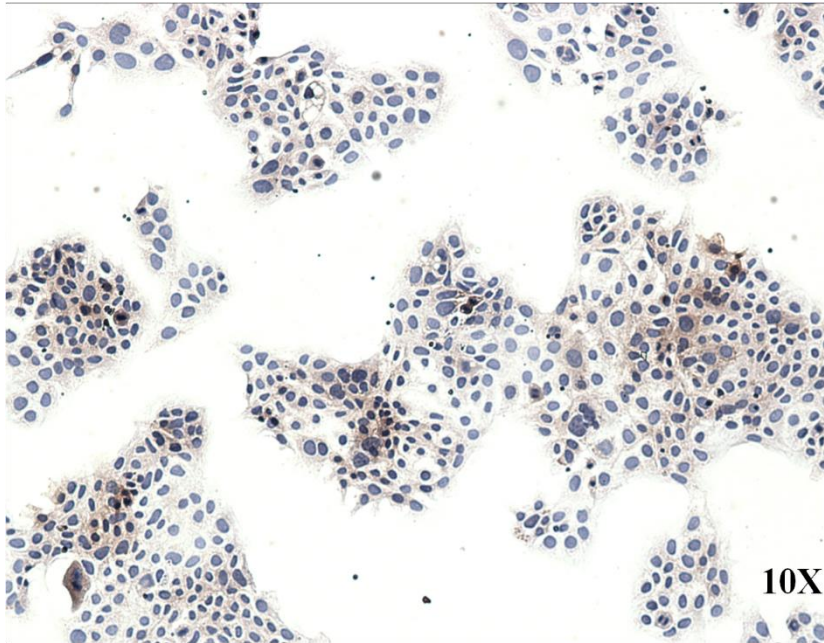


Figure 1. **Immunocytochemistry of the JEG-3 cells for HER2.** The immunocytochemistry staining resulted in significant positive immunoreactivity cytoplasmic in more than 60% and 40% positive immunoreactivity in the membrane of the cells for HER2 when used the antibody concentration 1:50.

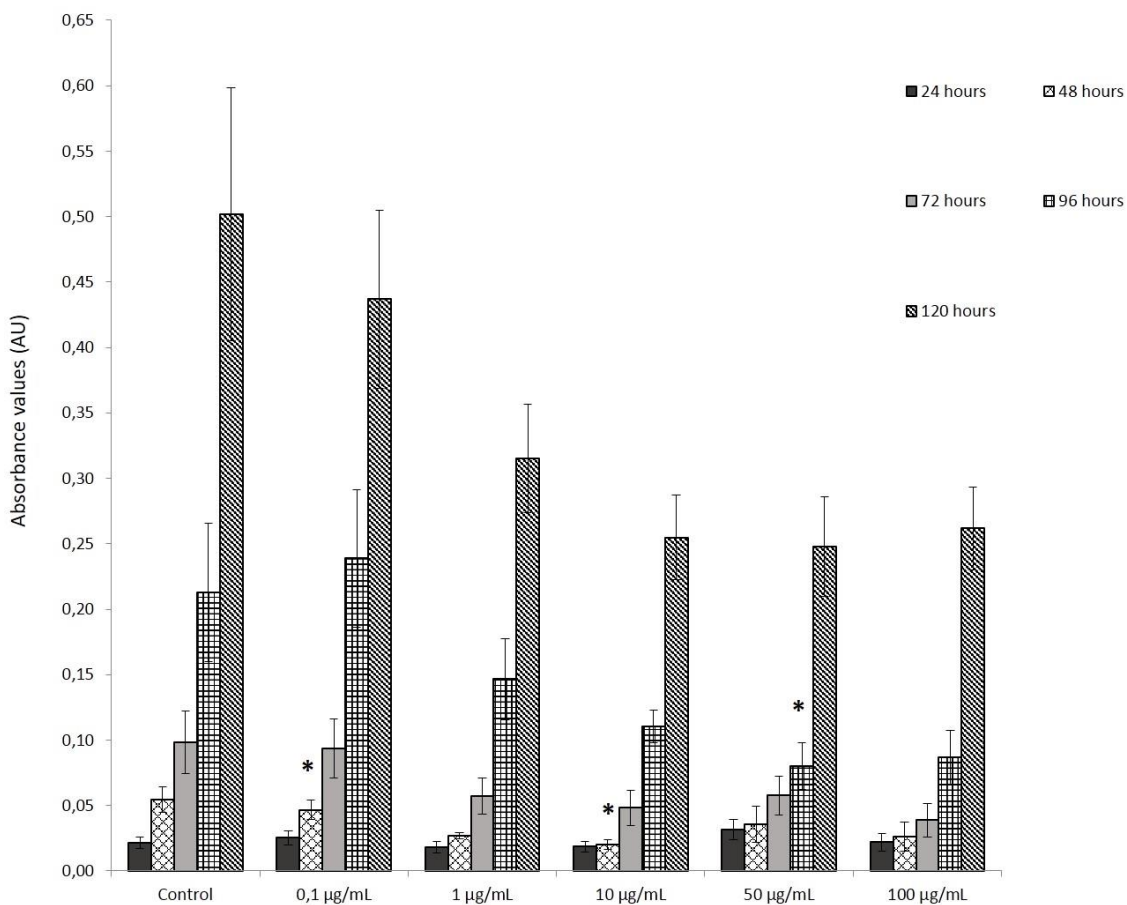


Figure 2. Cell Proliferation assay. Graphical representation of cell proliferation assessed by the. The JEG-3 cell line was treated with trastuzumab at different concentrations and different times, analysed by Sulforhodamine B assay. * Significant inhibition of cell proliferation at 48h related to control group and 0,1 µg/mL group; at 96h related to 0,1 µg/mL group (* $P < 0,05$). Values are represented as mean \pm EP.

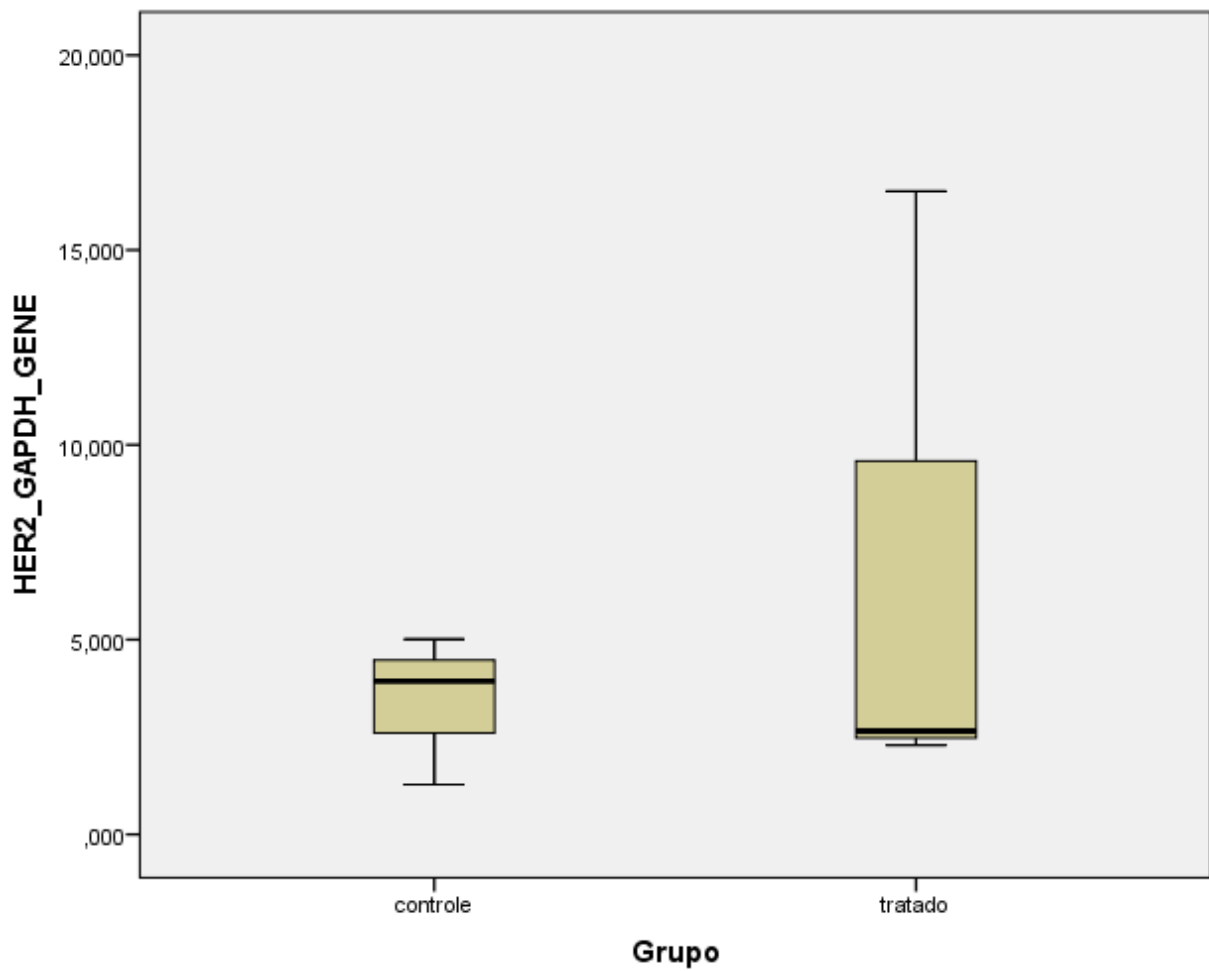


Figure 3. **Graphical representation of HER2 gene expression.** RT-qPCR analysis for HER2 gene in samples of JEG-3 cells. Values represented as media and interquartile range.

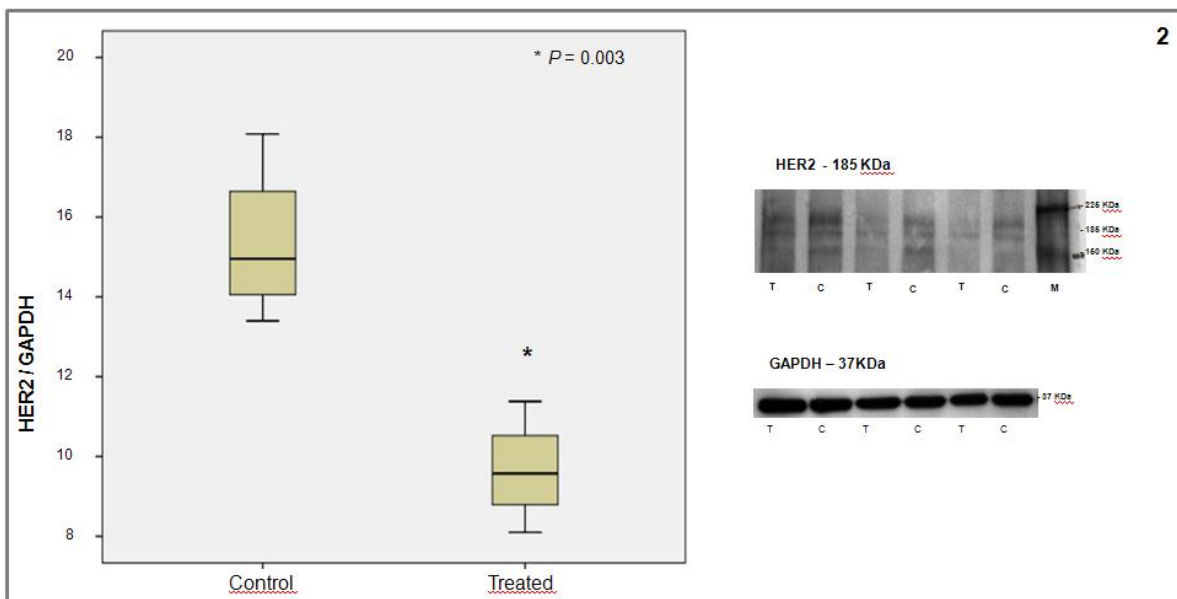


Figure 4. **Graphical representation of HER2 protein expression.** Western blot analysis for HER2 protein in samples of JEG-3 cells. Values represented as media and interquartile range. * $P = 0.003$

Artigo 2

Lapatinib inhibits amphiregulin-induced BeWo choriocarcinoma cell proliferation by decreasing ERK1/2 and AKT signaling pathways

Leticia Vicosa Pires^{1,2}, Yuyin Yi², Jung-Chien Cheng², Peter C. K. Leung², Ilma Simoni Brum^{1,3}

¹Post-Graduation Program in Gynaecology and Obstetrics, Hospital de Clinicas Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Obstetrics and Gynaecology, BC Children's Hospital Research Institute, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V5Z 4H4

³Department of Physiology, Instituto de Ciencias Basicas da Saude, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: Lapatinib inhibits choriocarcinoma cell growth

Key words: Lapatinib, EGFR, HER2, choriocarcinomas

Grant support: This work was supported by a Foundation Grant from the Canadian Institutes of Health Research to P.C.K.L (FDN-143317).

Disclosure summary: The authors have nothing to disclose.

Address all correspondence and requests for reprints to:

Ilma Simoni Brum
Department of Physiology
Instituto de Ciencias Basicas da Saude
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Sarmiento Leite 500
Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: +55-51-33083559

E-mail: ilma@ufrgs.br

Abstract

Human choriocarcinoma is the most aggressive type of gestational trophoblastic neoplasia with abnormal invasive, migratory and proliferative properties. The expression levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) in choriocarcinomas have been shown to be significantly higher than those of trophoblastic cells in healthy placentas. In addition, the levels of amphiregulin (AREG) are the highest among EGFR ligands in amniotic fluid during human pregnancy. Lapatinib is a potent inhibitor of EGFR/HER2 tyrosine kinase catalytic activity and has been shown to inhibit cell proliferation and induce apoptosis in different types of human cancer cells. However, thus far, the effect of lapatinib on human choriocarcinoma cell proliferation has not been determined. Moreover, the role of AREG in human choriocarcinoma cell proliferation remains unknown. In the present study, we show that treatment with lapatinib alone decreases cell proliferation by inducing cell apoptosis in a human choriocarcinoma cell line, BeWo. In addition, we demonstrate that AREG stimulated BeWo cell proliferation by activating ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. Inhibition of EGFR/HER2 by treatment with lapatinib blocks the AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways as well as AREG-stimulated cell proliferation. These results suggest that targeting EGFR/HER2 could be a useful therapeutic strategy for the prevention of human choriocarcinoma development and progression.

Introduction

Placenta is an important organ required for the successful development of the fetus during pregnancy. Gestational trophoblastic disease (GTD) is a group of rare diseases in which placental trophoblast cells grow abnormally inside the uterus after conception. Based on the histological and pathological characteristics, GTD can be broadly divided into two groups: 1) benign trophoblastic lesions (hydatidiform moles, complete and partial) and 2) gestational trophoblastic neoplasia (GTN) [1, 2]. GTN are uncommon malignancies which encompass a group of interrelated but distinct tumors that include invasive trophoblastic mole, placental-site trophoblastic tumor (PSTT), epithelioid trophoblastic tumor (ETT) and choriocarcinoma [3].

Although human choriocarcinoma is the most aggressive type of GTN with abnormal invasive, migratory and proliferative properties, it is among the few human cancers that are highly responsive to chemotherapy and, unlike other types of malignant tumor; metastatic choriocarcinomas are potentially curable by combined chemotherapy and adjuvant surgical procedures [4, 5]. However, a small but significant proportion of patients exhibit resistance to the traditional chemotherapy and fail to survive due to delayed diagnosis or a recurrent tumor [6-8]. Therefore, it is important and necessary to develop new therapies or strategies for treating or preventing choriocarcinomas.

The ErbB family belong to the family of receptor tyrosine kinases (RTKs) comprises four members: epidermal growth factor receptor (EGFR; ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4). The expression levels of EGFR in choriocarcinomas are significantly higher than those of trophoblastic cells in healthy placentas whereas the expression levels of ErbB3 and ErbB4 do not vary significantly [9]. It has been characterized that different ligands of ErbB family can bind to different ErbB receptors. EGF, amphiregulin (AREG) and transforming growth factor α (TGF- α) bind specifically to EGFR [10, 11]. Among these EGFR ligands, AREG is primarily expressed in human placenta throughout pregnancy and has been thought to be the key molecule involved in regulation of placental development and maturation. Importantly, the expression levels of AREG is significantly higher than EGF and TGF- α in human

choriocarcinoma cells [12]. Together, these results suggest that AREG/EGFR signaling may play important roles in the development and/or progression of human choriocarcinomas.

Despite having no direct identified ligand, HER2 is able to be activated via dimerization with other ligand-bound ErbB receptors and this heterodimerization can further potentiate signaling that mediated by those ligand-bound ErbB receptors [13, 14]. Using drugs that target EGFR or HER2 has been emerged as effective treatments against various types of human cancer. However, to the best of our knowledge, the role of EGFR-mediated signaling in regulation of human choriocarcinoma progression remains unclear. Lapatinib is a potent inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase catalytic activity. It has been shown that treatment with lapatinib inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in different types of human cancer cells [15]. Given the high expression levels of AREG and EGFR, the present study examined the effect of lapatinib on cell apoptosis and on AREG-induced cell proliferation in two human choriocarcinoma cell lines.

Material and Methods

Antibodies and reagents

The polyclonal anti-EGFR (1:1000) and monoclonal anti- α -tubulin (1:5000) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The monoclonal anti-HER2 (1:2000), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:1000) and polyclonal anti-caspase-3 (1:1000), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-phospho-AKT (Ser473) (1:1000) and anti-AKT (1:1000) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Lapatinib was purchased from Selleckchem (Houston, TX). LY294002 were obtained from Sigma. U0126 was obtained from Calbiochem (San Diego, CA). Recombinant human AREG was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Cell culture

The human choriocarcinoma cell lines BeWo and JEG-3 were obtained from American Type Culture

Collection (Manassas, VA). Cells were grown in a 1:1 (v/v) mixture of DMEM/F12 medium (Gibco, Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

MTT assay

Cells were seeded in a 24-well plate (2×10^4 /well) with 500 μ L of medium. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) was added at different time points to a final concentration of 0.5 mg/mL and then incubated for 4 h. After incubation, the media were removed and DMSO was added into each well to dissolve the crystals. The absorbance values were examined by spectrophotometer microplate reader.

Western blot

Cells were lysed in ice cold lysis buffer (Cell Signaling Technology) with added protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Equal amounts of protein were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membranes. After blocking for 1 h with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS), the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS with 5% non-fat milk. Following primary antibody incubation, the membranes were incubated for 1 h with appropriate HRP-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescent substrate or Super Signal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific) and X-ray film.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed with different passages of cells. Multiple group comparisons were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's

multiple comparison test using PRISM software (GraphPad Software). Means were considered significantly different if $p < 0.05$.

Results

EGFR and HER2 are expressed in BeWo and JEG-3 cells

To the best of our knowledge, thus far, the expression levels of EGFR and HER2 in human choriocarcinoma cell lines are not clearly demonstrated. To examine the expression levels of EGFR and HER2, the total protein extracted from two human choriocarcinoma cell lines, BeWo and JEG-3, were analyzed by Western blot. A human ovarian cancer cell line, SKOV3, which has been reported to express EGFR and high levels of HER2 was used as a positive control [16, 17]. As shown in Figure 1A, both BeWo and JEG-3 cells expressed EGFR and the protein levels of EGFR is higher in JEG-3 cells than that in BeWo cells. Similarly, HER2 protein was detected in both cell lines. Interestingly, BeWo cells expressed higher HER2 when compared with JEG-3 cells (Figure 1B).

Lapatinib inhibits cell proliferation in BeWo, but not in JEG-3 cells

To examine the effect of lapatinib on cell proliferation in human choriocarcinoma cells, BeWo and JEG-3 cells were treated with 1 μM and 10 μM of lapatinib every 24 h for 96 h. As shown in Figure 2A, treatment with 1 μM of lapatinib did not affect the cell proliferation in BeWo cells, while cell proliferation was significantly inhibited by treatment of 10 μM lapatinib for 48 h and the greater inhibitory effect was observed after 96 h of treatment. To our surprise, neither treatment with 1 μM nor 10 μM of lapatinib affected cell proliferation in JEG-3 cells. Treatment with 10 μM lapatinib decreased basal cell number in BeWo cells suggesting its pro-apoptotic effect. To further confirm this, BeWo cells were treated with 10 μM lapatinib and the expression levels of cleaved caspase-3, an important marker of apoptosis, were examined by Western blot. As shown in Figure 2B, 24 h of 10 μM lapatinib treatment significantly induced the expression levels of cleaved caspase-3. These results agree with the previous study demonstrating the pro-apoptotic effect of lapatinib in human cancer cells [15].

AREG stimulates cell proliferation by activating ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways

To date, the effect of AREG on human choriocarcinoma cell proliferation remain unclear. It has been shown that the concentration of AREG in the human amniotic fluid can reach 20 ng/mL [12]. Therefore, BeWo cells were treated with 20 ng/mL AREG and the effect of AREG on cell proliferation was examined by MTT assay. As shown in Figure 3A, the cell proliferation was significantly increased after 72 h and 96 h of AREG treatment. The ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways are well-established mediators of EGFR. We next examined the effects of AREG on the activation of the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. Our results showed that, in BeWo cells, treatment with AREG for 10, 30 and 60 min induced the phosphorylation of ERK1/2 and AKT indicating the activation of these two pathways (Figure 3B). In addition, inhibition of ERK1/2 by pre-treating cells with MEK inhibitor, U0126, decreased basal cell proliferation and abolished the AREG-stimulated cell proliferation. Similarly, the basal levels of cell proliferation and the AREG-stimulated cell proliferation were blocked by pre-treatment of LY294002, PI3K inhibitor (Figure 3C). Together, these results indicate that AREG can stimulate human choriocarcinoma cell proliferation by activating ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways.

Lapatinib blocks AREG-stimulated cell proliferation by attenuating ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways

Our results showed that treatment with low concentration (<10 μM) of lapatinib alone did not induce cell apoptosis in BeWo cells. Therefore, we examined whether low concentrations (1 μM and 5 μM) of lapatinib could affect the AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways as well as AREG-stimulated cell proliferation. As shown in Figure 4A, pre-treatment of BeWo cells with 1 μM of lapatinib partially attenuated AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. The AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways were totally blocked by pre-treatment

with 5 μ M of lapatinib. MTT assay results further showed that treatment with 1 μ M or 5 μ M of lapatinib blocked the AREG-stimulated BeWo cell proliferation.

Discussion

Lapatinib has been shown to inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in different types of human cancer cells. However, its effects in human choriocarcinoma cells remain unknown. The present study, for the first time, examined the effect of lapatinib on human choriocarcinoma cells. Our results showed that treatment with lapatinib alone decreases cell proliferation by inducing cell apoptosis in BeWo cells. In addition, we demonstrated that AREG stimulated BeWo cell proliferation by activating ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. Inhibition of EGFR/HER2 by treatment with lapatinib blocked the AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways as well as AREG-stimulated cell proliferation.

It is interesting to note that treatment with lapatinib did not affect the cell proliferation in JEG-3 cells. It has been shown that PI3K/AKT signaling pathway appears to be more dependent upon HER2 signaling than EGFR [18]. Our results showed that the expression levels of HER2 are higher in BeWo cells than that in JEG-3 cells. In addition, compared to MEK inhibitor, treatment of cells with PI3K inhibitor induced greater decrease in the basal cell proliferation. Taken together, these results suggest that the low expression of HER2 and low activation of HER2-mediated PI3K/AKT signaling pathway in JEG-3 cells may be the reasons that lapatinib could not induce apoptosis in this cell line. The ability of induction of apoptosis by lapatinib might in part be dependent upon the degree to HER2 expression and activation of AKT signaling pathway.

EGFR signaling is known to regulate cell proliferation, motility and invasion in many types of cancer [19, 20]. EGFR is up-regulated in human gestational trophoblastic diseases including choriocarcinomas [9, 21, 22]. Among EGFR ligands, the expression level of AREG is the highest in amniotic fluid during human pregnancy. In addition, AREG treatment stimulates human chorionic gonadotropin production in BeWo

cells [12]. However, thus far, the mitogenic effect of AREG on BeWo human choriocarcinoma cells remains unknown. In this study, we demonstrated that treatment with recombinant human AREG stimulates BeWo cell proliferation. These results indicate that AREG may play critical roles in regulation of human choriocarcinoma cell proliferation. Therefore, targeting EGFR could be a useful therapeutic strategy for the prevention of human choriocarcinoma development and progression.

Similar to our previous studies in other cell types [23, 24], AREG treatment activated ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways in human choriocarcinoma cells. We also reported that AREG-stimulated cell proliferation required the activations of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. ERK1/2 has been well known a signaling pathway that regulates cancer cell proliferation and survival. In many types of human cancer, expression of activated ERK1/2 signaling pathway has been detected [25]. The activation PI3K/AKT signaling pathway is involved in protecting cells from apoptosis. In cancer cells, constitutive activation of AKT signaling pathway has been implicated as a mechanism of resistance to cytotoxic chemotherapies [26]. Our results showed that lapatinib blocked AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways in BeWo cells. These findings indicate that lapatinib acts as a potent EGFR/HER2 inhibitor which can lead to cell growth arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cells.

In summary, in the present study, we demonstrated that treatment with lapatinib alone induced apoptosis in human choriocarcinoma cells with high HER2 expression. In addition, we showed the stimulatory effect of AREG on the cell proliferation. Moreover, AREG-stimulated cell proliferation required the activations of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. Similar to the previous study, we showed that blocking EGFR/HER2 by lapatinib inhibited AREG-induced activation of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways as well as AREG-stimulated cell proliferation [27]. These results not only increase the understanding of the effect of EGFR/HER2 inhibitor on human choriocarcinoma cell proliferation but also provide important insights into the molecular mechanisms mediating AREG-stimulated cell proliferation.

Acknowledgements

This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research to P.C.K.L (#143317).

References

- [1] M. Shih Ie, R.J. Kurman, Molecular basis of gestational trophoblastic diseases, *Current molecular medicine*, 2 (2002) 1-12.
- [2] I.M. Shih, R.J. Kurman, The pathology of intermediate trophoblastic tumors and tumor-like lesions, *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 20 (2001) 31-47.
- [3] M. Shih Ie, Gestational trophoblastic neoplasia--pathogenesis and potential therapeutic targets, *The Lancet. Oncology*, 8 (2007) 642-650.
- [4] M.S. Cagayan, L.R. Lu-Lasala, Management of gestational trophoblastic neoplasia with metastasis to the central nervous system: A 12-year review at the Philippine General Hospital, *The Journal of reproductive medicine*, 51 (2006) 785-792.
- [5] J.R. Lurain, D.K. Singh, J.C. Schink, Primary treatment of metastatic high-risk gestational trophoblastic neoplasia with EMA-CO chemotherapy, *The Journal of reproductive medicine*, 51 (2006) 767-772.
- [6] E.S. Newlands, The management of recurrent and drug-resistant gestational trophoblastic neoplasia (GTN), *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 17 (2003) 905-923.
- [7] H.Y. Ngan, K.F. Tam, K.W. Lam, K.K. Chan, Relapsed gestational trophoblastic neoplasia: A 20-year experience, *The Journal of reproductive medicine*, 51 (2006) 829-834.
- [8] R.S. Berkowitz, D.P. Goldstein, Current management of gestational trophoblastic diseases, *Gynecologic oncology*, 112 (2009) 654-662.
- [9] Z.S. Tuncer, G.L. Vegh, V. Fulop, D.R. Genest, S.C. Mok, R.S. Berkowitz, Expression of epidermal growth factor receptor-related family products in gestational trophoblastic diseases and normal placenta and its relationship with development of postmolar tumor, *Gynecologic oncology*, 77 (2000) 389-393.

- [10] Z. Wang, ErbB Receptors and Cancer, *Methods in molecular biology*, 1652 (2017) 3-35.
- [11] N.E. Hynes, G. MacDonald, ErbB receptors and signaling pathways in cancer, *Curr Opin Cell Biol*, 21 (2009) 177-184.
- [12] T. Fukami, T. Yoshizato, S. Miyamoto, H. Yagi, F. Yotsumoto, K. Nabeshima, T. Hachisuga, M. Kuroki, T. Kawarabayashi, Amphiregulin regulates the production of human chorionic gonadotropin in trophoblasts, *Life sciences*, 84 (2009) 796-804.
- [13] D. Graus-Porta, R.R. Beerli, J.M. Daly, N.E. Hynes, ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling, *Embo J*, 16 (1997) 1647-1655.
- [14] M.A. Olayioye, R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *Embo J*, 19 (2000) 3159-3167.
- [15] D.W. Rusnak, K. Lackey, K. Affleck, E.R. Wood, K.J. Alligood, N. Rhodes, B.R. Keith, D.M. Murray, W.B. Knight, R.J. Mullin, T.M. Gilmer, 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, *Molecular cancer therapeutics*, 1 (2001) 85-94.
- [16] J.A. Wilken, K.T. Webster, N.J. Maihle, Trastuzumab Sensitizes Ovarian Cancer Cells to EGFR-targeted Therapeutics, *Journal of ovarian research*, 3 (2010) 7.
- [17] J.C. Cheng, X. Qiu, H.M. Chang, P.C. Leung, HER2 mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin in human ovarian cancer cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 434 (2013) 81-86.
- [18] A.M. Tari, G. Lopez-Berestein, Serum predominantly activates MAPK and akt kinases in EGFR- and ErbB2-over-expressing cells, respectively, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 86 (2000) 295-297.
- [19] B.F. El-Rayes, P.M. LoRusso, Targeting the epidermal growth factor receptor, *Br J Cancer*, 91 (2004) 418-424.

- [20] M.D. Marmor, K.B. Skaria, Y. Yarden, Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58 (2004) 903-913.
- [21] P. Balaram, M. John, T.N. Rajalekshmy, B. Nair, G. Schultz, K. Nair, Expression of epidermal growth factor receptor in gestational trophoblastic diseases, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 123 (1997) 161-166.
- [22] M. John, T. Rajalekshmy, B. Nair, J. Augustine, G. Schultz, K. Nair, P. Balaram, Expression of epidermal growth factor and its receptor in gestational trophoblastic diseases, *Oncology reports*, 4 (1997) 177-182.
- [23] W.K. So, J.C. Cheng, Y. Liu, C. Xu, J. Zhao, V.T. Chang, P.C. Leung, Sprouty4 mediates amphiregulin-induced down-regulation of E-cadherin and cell invasion in human ovarian cancer cells, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37 (2016) 9197-9207.
- [24] L. Fang, J.C. Cheng, H.M. Chang, Y.P. Sun, P.C. Leung, EGF-like growth factors induce COX-2-derived PGE2 production through ERK1/2 in human granulosa cells, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98 (2013) 4932-4941.
- [25] C.J. Caunt, M.J. Sale, P.D. Smith, S.J. Cook, MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road, *Nature reviews. Cancer*, 15 (2015) 577-592.
- [26] I.A. Mayer, C.L. Arteaga, The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment, *Annual review of medicine*, 67 (2016) 11-28.
- [27] W. Xia, R.J. Mullin, B.R. Keith, L.H. Liu, H. Ma, D.W. Rusnak, G. Owens, K.J. Alligood, N.L. Spector, Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways, *Oncogene*, 21 (2002) 6255-6263.

Figure Legends

Figure 1. The expression levels of EGFR and HER2 in BeWo and JEG-3 cells. A, Endogenous levels of EGFR were examined in BeWo and JEG-3 cells by Western blot. B, Endogenous levels of HER2 were examined in BeWo and JEG-3 cells by Western blot. The ovarian cancer cell line SKOV3 was used as a positive control.

Figure 2. Lapatinib induces cell apoptosis in BeWo cells. A, BeWo and JEG-3 cells were treated with vehicle control (DMSO), 1 μ M or 10 μ M lapatinib every 24 h. The cell proliferation was examined by MTT assay. B, BeWo cells were treated with 10 μ M lapatinib for 24 h. The protein levels of cleaved caspases-3 were examined by Western blot. The cell proliferation results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * p <0.05 compared with Ctrl.

Figure 3. AREG stimulates BeWo cell proliferation and activates ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways. A, Cells were treated without or with 20 ng/mL AREG every 24 h. The cell proliferation was examined by MTT assay. B, Cells were treated with 20 ng/mL AREG for the indicated durations. Phosphorylation of ERK1/2 and AKT was determined by Western blot using antibodies specific for the phosphorylated forms of ERK1/2 (p-ERK1/2) and AKT (p-AKT). Membranes were stripped and reprobbed with antibodies to total ERK1/2 and AKT. C, Cells were pre-treated with U0126 (10 μ M) or LY294002 (10 μ M) for 1 h and then treated with 20 ng/mL AREG every 24 h for 96 h. The cell proliferation was examined by MTT assay. The cell proliferation results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * p <0.05 compared with Ctrl.

Figure 4. Lapatinib blocks AREG-induced activations of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways and AREG-stimulated cell proliferation in BeWo cells. A, Cells were pre-treated with 1 μ M or 5 μ M

lapatinib for 1 h and then treated with 20 ng/mL AREG for 60 min. Phosphorylation of ERK1/2 and AKT was determined by Western blot using antibodies specific for the phosphorylated forms of ERK1/2 (p-ERK1/2) and AKT (p-AKT). Membranes were stripped and reprobed with antibodies to total ERK1/2 and AKT. B, Cells were pre-treated with 1 μ M or 5 μ M lapatinib for 1 h and then treated with 20 ng/mL AREG every 24 h for 96 h. The cell proliferation was examined by MTT assay. The cell proliferation results are presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * p <0.05 compared with Ctrl.

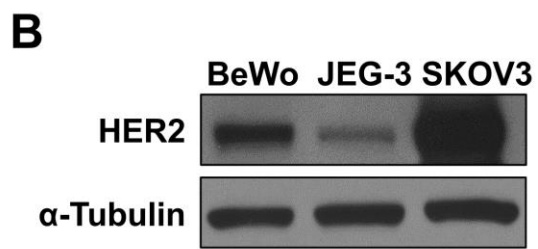
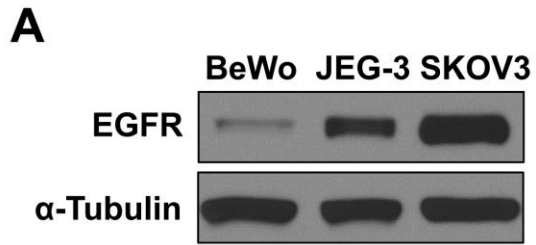
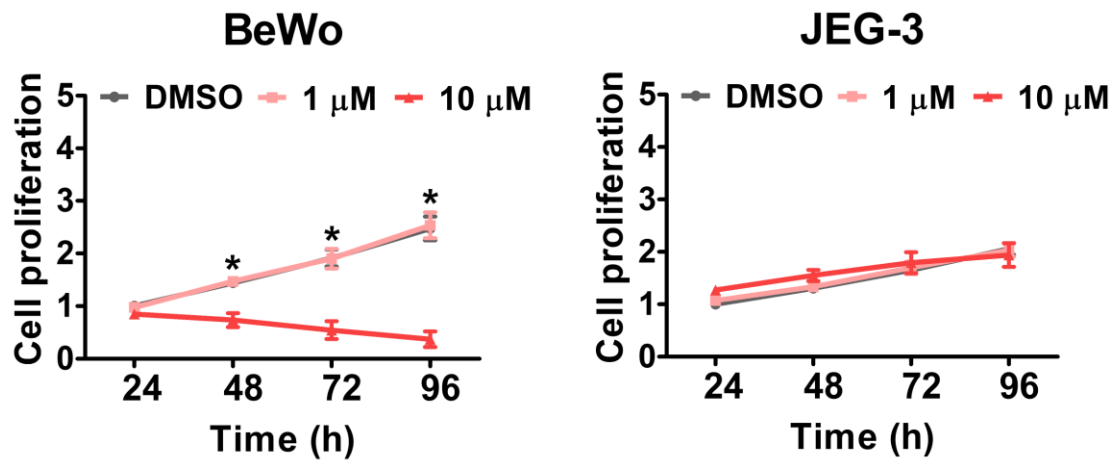


Figure 1

A



B

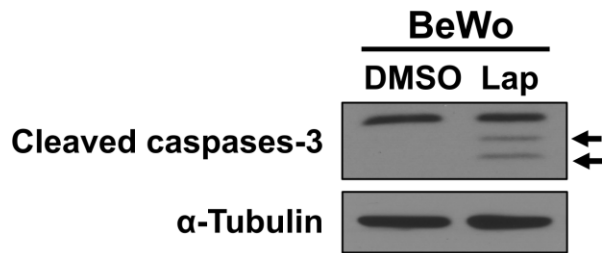


Figure 2

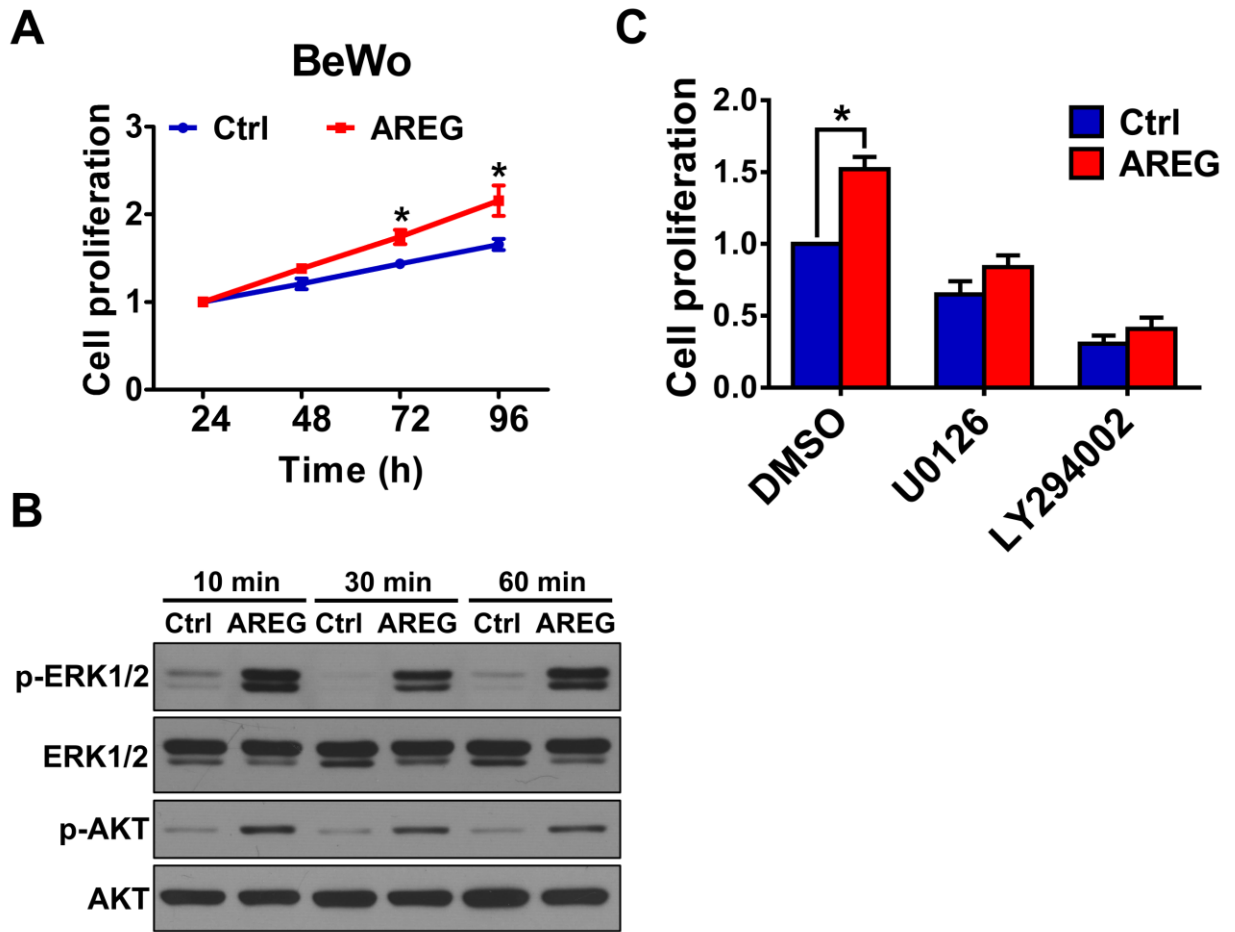


Figure 3

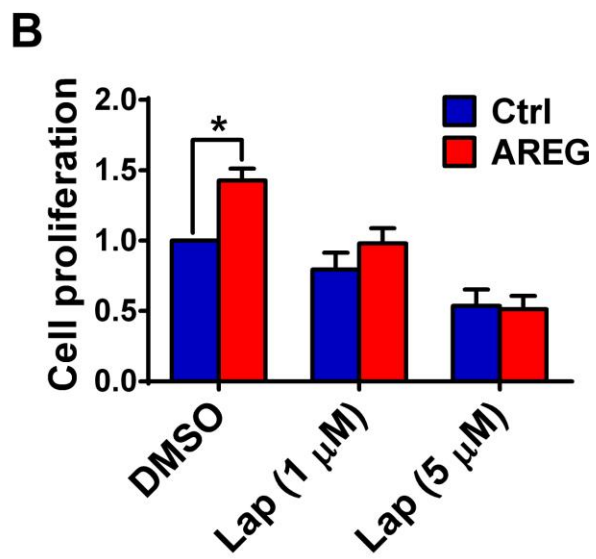
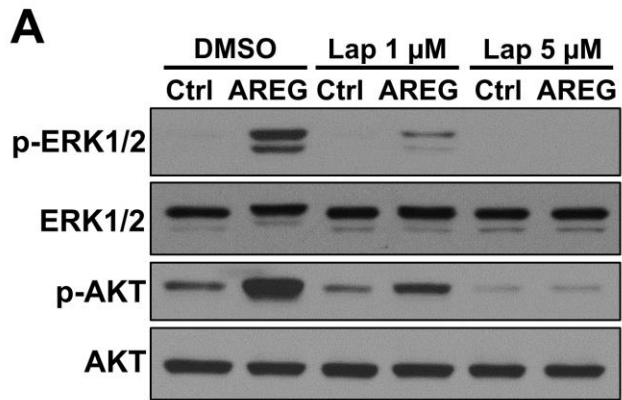


Figure 4

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

No presente trabalho confirmamos a expressão do HER2 nas linhagens de célula de coriocarcinoma JEG3 e BeWo, conforme dados anteriores da literatura.

Quando expostas às drogas alvo, as duas linhagens celulares estudadas (JEG3 e BeWo) apresentaram respostas de inibição do crescimento celular. As células da linhagem JEG3 apresentaram diminuição na sua proliferação, quando expostas ao Trastuzumabe ou Lapatinibe, as células da linhagem BeWo igualmente apresentaram um grau de inibição da sua proliferação quando tratadas com Lapatinibe.

Estes dados, avaliados em conjunto, indicam que células de coriocarcinoma que forem HER2 positivas podem ser inibidas em seu crescimento e proliferação por drogas-alvo, tanto por um Anticorpo Monoclonal, como por um Inibidor das Tirosina-Quinases.

Frente a esses achados, concluímos a importância de dar continuidade as pesquisas com essas drogas novas, visando encontrar um tratamento alternativo para as pacientes com NTG avançada, metastática, resistente e recorrente, que morrem diariamente por complicações da doença ou dos tratamentos vigentes.

13. PERSPECTIVAS:

Embora as taxas de cura com quimioterapia para paciente com NTG de baixo-risco sejam maiores que 90%, as pacientes de alto-risco ainda morrem em mais de 30% dos casos.

Nosso trabalho mostrou que linhagens de células de coriocarcinoma apresentam expressão de HER2, e podem ser inibidas com drogas-alvo como o Trastuzumabe e o Lapatinibe.

Esta certamente pode ser considerada somente a primeira etapa de uma vasta pesquisa a ser realizada com cultura primária de células, de tecidos, experimentos com modelo animal utilizando técnicas de análise imuno-histoquímica, genéticas e moleculares mais detalhadas, onde poderemos testar novos anticorpos e novas drogas, definir mecanismos de ação, para que finalmente, mas não tardiamente possamos oferecer essas drogas às pacientes como alternativa de tratamento, e quem sabe, como cura.