

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Determinação dos valores plasmáticos de osteopontina em
cães com tumores mamários metastáticos ou não.
Correlações clínicas e anatomopatológicas.**

Eduardo Garrido
Médico Veterinário

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Determinação dos valores plasmáticos de osteopontina em
cães com tumores mamários metastáticos ou não.
Correlações clínicas e anatomopatológicas.**

Eduardo Garrido

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosângela Zacarias Machado

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

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDUARDO GARRIDO, nascido em 23 de setembro de 1974 formou-se em Medicina Veterinária em 2006 pelo Centro Universitário “Barão de Mauá” e fez parte do Programa de Iniciação Científica e monitoria daquela instituição. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel - FCAV – UNESP, no período de 2007 a 2009. Integra, como discente, o programa de Pós graduação da FCAV – UNESP desde 2009. Membro da Associação Brasileira de Patologia Veterinária desde 2007 e do Corpo Editorial de seu Boletim desde setembro de 2009. Possui três artigos completos em revistas, 20 resumos em congressos, participou em 27 congressos, simpósios e encontros. Ministrou palestras em Jales, SP e Palmeira do Oeste, SP. Ministrou aulas para as turmas do 2º e 3º anos do curso de Medicina Veterinária da FCAV – UNESP.

A cisterna contém, a fonte derrama.

William Blake

Dedico este trabalho aos meus pais, Salete e Antonio, pelo apoio, carinho e amor que me dedicam constantemente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, pela sábia ajuda, sem a qual este trabalho seria impossível.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Rosângela Zacarias Machado, pelo apoio técnico-científico e sessão de seu Laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, por disponibilizar o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária para os exames hematológicos e por suas sugestões.

Agradeço à Mestranda Márcia Mariza Gomes Jusi e a Dr^a Carla Roberta Freschi pelas sugestões, paciência e disponibilidade.

Agradeço à Thaís Larissa Lourenço Castanheira pela paciência e apoio técnico e intelectual.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado (Proc. Fapesp 2008/07087-6).

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO DE LITERATURA	2
III MATERIAL E MÉTODOS	8
Grupos experimentais.....	8
Histopatologia	7
Colheita e processamento das amostras	9
Análise de dados	13
IV RESULTADOS.....	15
V DISCUSSÃO	25
VI CONCLUSÕES	28
VII REFERÊNCIAS	29

Índice de Tabelas

Tabela 1	Sistema de pontuação utilizado para a graduação histológica segundo Elston e Ellis (1998).	10
Tabela 2	Número de cães e frequência, por raça, acometidas de tumores mamários utilizados no experimento.	15
Tabela 3	Classificação e graduação histológica dos tumores dos animais dos grupos GT1, GT2 e GT3.	17
Tabela 4	Parâmetros estatísticos do grupo GC.	21
Tabela 5	Comparação de médias de DO pelo teste de Tukey dos grupos GC e GT.	22
Tabela 6	Parâmetros estatísticos de DO e OPN (ng/dL) em cães com carcinomas mamários sem metástase (GT1), com metástases (GT2), com carcinomas em tumor mamário misto (GT3) e cães hígidos (GC). A 1ª colheita realizada durante a primeira consulta do animal e a 2ª colheita realizada 10 dias após a exérese do tumor.	22

Índice de Figuras

- Figura 1 Elisa. A) Placa de Elisa pronta para a leitura. B) Processo de pipetagem para a diluição sanguínea. C) Placa de Elisa após leitura. Notar a coloração amarelada dos poços com presença de Osteopontina. D) Leitora de placa MRX Tc plus (Dynex). 12
- Figura 2 Histograma da porcentagem de animais portadores de tumor mamário, independente do tipo histológico, segundo a idade. As barras representam um limite de classe de 1,5 anos. 16
- Figura 3 Fotomicrografia de carcinomas mamários. A) Carcinoma sólido grau III. Notar presença de figuras mitóticas (setas) e pleomorfismo nuclear moderado, HE, 400X. B) Carcinoma anaplásico grau III. Notar pleomorfismo nuclear acentuado, HE, 400X. C) Carcinoma papilífero grau II. Notar estruturas papilares, HE, 200X. D) Carcinoma tubular grau II. Notar formação acinar, HE, 400X. E) Carcinoma em tumor misto grau I. Notar a formação em paliçada com proliferação mioepitelial e presença de matriz mixoide (*), HE, 200X. F) Carcinoma em tumor misto grau II. Notar a presença de matriz cartilaginosa (*), HE, 200X. G) Linfonodo com presença de células metastáticas (setas), HE, 400X. H) Vaso sanguíneo com presença de célula tumoral em seu interior (seta), HE, 400X. 18
- Figura 4 Número de hemácias $\times 10^6$ (HE), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), plaquetas $\times 10^3$, Leucócitos totais $\times 10^3$ (LEU), bastonetes (BAS), eosinófilos (EOS), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF), monócitos (MON), creatinina e alanina aminotransferase (ALT) de cães hípidos GC (colunas vermelha), com presença de tumores mamários GT (colunas azul) e a média dos valores referências do laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP (colunas verdes). Notar a coincidência entre os valores de cada parâmetro. 19
- Figura 5 Gráfico de dispersão evidenciando a falta de correlação entre os níveis plasmáticos de OPN (ng/dL) e os parâmetros do hemograma e bioquímicos séricos. Notar a dispersão elevada em todos os parâmetros. Hemácias $\times 10^6$ (HE), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), plaquetas $\times 10^3$, Leucócitos totais $\times 10^3$ (LEU), bastonetes (BAS), eosinófilos (EOS), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF), monócitos (MON), creatinina e alanina aminotransferase (ALT). 20
- Figura 6 Gráfico de probabilidade de normalidade para os níveis OPN de GT. O valor de p indica a rejeição da hipótese dos valores terem uma distribuição normal. 23

Abreviaturas

ALT	Alanina amino transferase
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína
ATF-4	Fator de ativação da transcrição 4
BRCA1	Gene de susceptibilidade do câncer mamário
Brk	<i>Breast tumor kinase</i>
BRMS1	Supressor de metástase do câncer mamário
CD44	Antígeno de diferenciação celular 44
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Elisa	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GC	Grupo controle
GC+ GT1+GT2+GT3	Somatória de todos os cães do experimento
GT	Somatória de todos os animais acometidos por tumor mamário
GT1	Grupo tumor 1 – Carcinoma não metastático
GT2	Grupo tumor 2 – Carcinoma metastático
GT3	Grupo tumor 3 – Carcinoma em tumor misto
HAS2	Ácido hialurônico sintase 2
NF-κB	Fator nuclear κB
OPN	Osteopontina
Pnpp	P-nitrofenilfosfato
rpm	Rotações por minuto
Src	Oncogene do sarcoma de Rous
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

Determinação dos valores plasmáticos de osteopontina em cães com tumores mamários metastáticos ou não. Correlações clínicas e anatomopatológicas.

RESUMO

A osteopontina (OPN) é uma proteína produzida por diversas células e tem grande implicação com o desenvolvimento de tumores mamários e na disseminação de metástases em humanos. Em cães há poucos estudos envolvendo neoplasias e OPN. Neste trabalho objetiva-se determinar as concentrações de OPN sérica em cães sem a presença de tumores mamários (GC) ou com presença de carcinoma mamário ou carcinoma em tumor misto, com e sem metástase macro ou microscopicamente evidente. Utilizou-se o Ensaio Imunoenzimático Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), a partir do plasma colhido antes e após a ressecção cirúrgica do tumor, em animais com neoplasia, e apenas em um momento (basal) nos animais saudáveis. As informações do ensaio, assim como os dados histopatológicos, hematológico e de bioquímica sérica foram confrontadas e analisadas por análise de variância e teste de Tukey. Os cães do GC obtiveram média de OPN de 2499 ± 1159 ng/d, com amplitude de referência entre 4770 e 227 ng/dL. Os cães com presença de tumor, quando em um único grande grupo, obtiveram uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de OPN, quando avaliado a densidade óptica. Quando o grupo se subdivide, em função do tipo histológico e/ ou presença de metástases, os resultados não evidenciam diferenças significativas nos níveis plasmáticos de OPN entre os animais saudáveis e os animais com neoplasias metastáticas ou não. A análise de correlação também não apresentou nenhum resultado significativo com os dados hematológicos ou de bioquímica sérica. Nas condições de realização deste ensaio, infere-se que, ao contrário do que ser

observa com seres humanos, nos cães a OPN não se revela importante no diagnóstico ou prognóstico de neoplasias mamárias caninas.

Palavras chaves: biomarcadores tumorais, doenças em cães, neoplasia mamária, oncologia, osteopontina, patologia

Determination of plasmatic osteopontin in dogs with mammary tumors metastatic or not. Clinical and pathological correlations.

ABSTRACT

The osteopontin (OPN) is a protein produced by several cells and has extensive involvement with the development of mammary tumors and its spread through metastases in humans. In dogs there are no studies involving cancer and OPN. This study aimed to determine serum concentrations of OPN in dogs without the presence of mammary tumors (GC) and presence of carcinoma in breast or carcinoma in mixed tumor with or without metastasis macro or microscopically evident. We used immunoenzymatic assay Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) from plasma collected before and after surgical resection of the tumor, in animals with cancer, and only at a time (baseline) in healthy animals. The information of the test, and histopathological data, hematology and serum biochemistry were compared and analyzed by ANOVA and Tukey test. Dogs GC got an average of OPN in 2499 ± 1159 ng / d, with reference range between 227 and 4770 ng / dL. Dogs with the presence of tumor, when one large group, had a significant decrease in plasma levels of OPN, when determined by optical density. When the group is subdivided, according to the histological type and / or metastasis, the results showed no significant differences in serum levels of OPN between healthy animals and animals with metastases or not. The correlation analysis did not show any significant result with hematological or serum

biochemistry. We conclude that, contrarily to what is observed in humans, OPN does not appear important in the diagnosis or prognosis of breast neoplasm in dogs.

Key words: breast cancer, diseases in dogs, oncology, osteopontin, pathology, tumor biomarkers

I INTRODUÇÃO

Vários estudos em humanos indicam um grande valor prognóstico associado ao uso da osteopontina (OPN) como biomarcador para metástases tumorais e para avaliar a eficiência do protocolo de tratamento. No entanto, não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes em cães. Salienta-se ainda que a determinação plasmática de OPN seja um método mais facilmente aplicável na rotina clínica do que as biopsias. Portanto, a determinação dos níveis plasmáticos de OPN em cães poderá ajudar na detecção de metástases, na efetividade dos tratamentos cirúrgicos e quimioterápicos e no prognóstico de cães com carcinoma mamário. Além disso, como modelo experimental, a determinação dos níveis plasmáticos de OPN pode favorecer a utilização de cães para futuros estudos associando OPN e neoplasias e estudos comparativos entre as neoplasias humanas e caninas.

Neste estudo objetivou-se determinar os níveis plasmáticos basais de OPN em cães não acometidos por tumores mamários; determinar os níveis plasmáticos basais e pós cirúrgicos de OPN em cães acometidos por carcinomas mamários com ou sem metástases e carcinomas em tumores mamários mistos; e estabelecer a correlação entre os níveis plasmáticos de OPN e outros constituintes bioquímicos séricos (ALT, Creatinina) e hemograma.

II REVISÃO DE LITERATURA

Os tumores mamários são as mais comuns neoplasias em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos e caninos. Segundo KUMARUGURUPARAN *et al.*, (2006a) a incidência de carcinomas em cães é três vezes maior que em humanos.

Caninos e humanos possuem semelhanças epidemiológicas, morfológicas, clínicas e bioquímicas no desenvolvimento das neoplasias mamárias, como idade, maior incidência de tumores malignos oriundos de células epiteliais, disseminação de metástases para o pulmão e outros órgãos e, como fator de risco, o aumento no período de exposição a estrógenos endógenos e exógenos (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006b). Ademais, cães e outros animais de companhia têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos (KUSEWITT & RUSH, 2007). Essas semelhanças e o fato de cães desenvolverem neoplasias de forma espontânea, carcinogênese e progressão tumoral acelerada em relação à humana, maior tempo de vida em relação às outras espécies de laboratório, propiciando acompanhamento clínico, além de custos reduzidos de manutenção, faz do cão um ótimo modelo experimental para o estudo das neoplasias (PORRELLO *et al.*, 2004).

Em cães, as neoplasias mamárias representam, aproximadamente, 50% de todas as neoplasias na espécie (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006a; KENNEDY & MILLER, 1993). Entre as neoplasias mamárias as de caráter maligno representam 40 a 50% (SARLI *et al.*, 2002). Segundo DE NARDI *et al.* (2009) esses números podem chegar a 60%, sendo que 25% dos pacientes apresentam metástases em linfonodos

regionais e/ou parênquima pulmonar. Os tumores de origem epitelial representam o tipo histológico mais comum e sua etiologia é multifatorial, incluindo aumento na idade, ovariectomia após os 2,5 anos, nuliparidade, ciclo estral irregular, hiperplasia cística do endométrio e tratamento com progestágenos (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006c). O prognóstico das neoplasias mamárias malignas está associado ao tamanho do tumor primário, com a classificação histológica, avaliação de parâmetros no DNA e na região organizadora de nucléolo e expressão oncogênica (HELLER *et al.*, 2005), além da graduação do tumor referente à invasão do estroma por células neoplásicas e presença de êmbolos neoplásicos em vasos (SARLI *et al.*, 2002).

Os tumores mamários caninos são conhecidos pela sua estrutura complexa e histogênese questionável (MISDORP, 2002).

Os carcinomas mamários classificam-se em: carcinoma *in situ*, carcinoma complexo, carcinomas simples e carcinomas especiais. Os carcinomas simples possuem três variantes histomorfológicas: carcinoma túbulo-papilar, sólido e anaplásico. E dentre os tipos especiais de carcinomas estão o carcinoma micropapilar, carcinoma de células escamosas, carcinoma mucinoso, carcinoma secretor, carcinoma rico em lípidos e carcinoma de células fusiformes (CASSALI *et al.*, 2011).

Os carcinomas em tumores mistos são neoplasias contendo focos ou nódulos de células epiteliais com elevado pleomorfismo e com mitoses atípicas, que surgem em tumores mistos benignos. A proliferação carcinomatosa pode invadir ou até mesmo substituir completamente a lesão benigna pré-existente, na época do exame histopatológico (CASSALI *et al.*, 2011).

O tumor mamário é importante causa de morbidade e mortalidade na mulher devido, principalmente, ao desenvolvimento de metástases regionais e em sítios distantes, como linfonodos, pulmão, fígado, cérebro e ossos (ALLAN *et al.*, 2006; BRAMWELL *et al.*, 2006; RUDLAND *et al.*, 2006; PANTEL & BRAKENHOFF, (2004); RUDLAND *et al.*, 2002). Ainda segundo PANTEL & BRAKENHOFF, (2004), embora a presença de metástase no linfonodo axilar de mulheres prediga o desenvolvimento de metástases distantes, 20 a 30% dos pacientes com linfonodos livres de metástases (analisados por ensaios muito sensíveis) desenvolvem metástases em sítios distantes, sugerindo duas vias de disseminação, linfática e hematogêna.

Vários biomarcadores tumorais foram estudados até o momento, objetivando avaliar a agressividade do tumor, eficácia do tratamento e tempo de vida após o diagnóstico (BRAMWELL *et al.*, 2006). Eles envolvem genes que atuam na proliferação celular como as proteínas c-erbB-2 e c-erbB-3, na diferenciação celular como os receptores de estrógeno α (ER α), o gene pS2 e os receptores de progesterona (PgR), na apoptose como o gene de supressão tumoral p53 e na invasão celular como a protease cathepsin D (RUDLAND *et al.*, 2006). Embora alguns sítios metastáticos sejam de fácil acesso, como linfonodos, pele e fígado, outros não são tão facilmente monitorados (metástases ósseas, efusão pleural, pulmão). Um marcador sanguíneo eficiente, que acompanhe a regressão ou progressão do tumor, teria um substancial valor para estes pacientes (BRAMWELL *et al.*, 2006).

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada sintetizada por vários tecidos do organismo, acumulando-se, sobretudo, nos ossos (NATASHA *et al.*, 2006). A concentração desta proteína é incrementada no plasma de pacientes sofrendo de

carcinoma disseminado e também em infecções com organismos gram negativos. As fontes da OPN incluem macrófagos e/ou linfócitos ativados (DENHARDT & GUO, 1993). A OPN está presente em todos os fluídos corporais, incluindo sangue, urina, bile, liquor e leite, sendo a principal proteína não colágena nos ossos (RITTLING & NOVICK, 1997). A OPN serve como ponte, daí sua denominação, entre células e entre células e matriz extracelular por meio de interações entre integrinas e receptores em seu domínio arginina-glicina-aspartato (RGD) (RODRIGUES *et al.*, 2007; EL- TANANI *et al.*, 2006a).

A OPN está associada a funções como migração celular, inibição da calcificação, aceleração da angiogênese e inibição da síntese de óxido nítrico, desempenhando importante papel na imunidade mediada por células, mineralização fisiológica e patológica, inflamação aguda e crônica (KHODAVIRDI *et al.*, 2006; EL- TANANI *et al.*, 2006a). E, em humanos, está implicada na progressão de tumores e no desenvolvimento de metástases em diversas neoplasias, incluindo tumores mamários (CHAKRABORTY *et al.*, 2008; BRAMWELL *et al.*, 2006; MARTINETTI *et al.*, 2004), carcinoma de células transicionais da bexiga (ANG *et al.*, 2005), câncer de próstata (KHODAVIRDI *et al.*, 2006) e carcinoma de cólon (TAKAMI *et al.*, 2007).

A OPN interage com diversos reguladores celulares para desempenhar seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral, entre eles, com a integrina $\alpha_v\beta_3$, que, na célula, estimula a proliferação, organização do cito esqueleto, motilidade, e bloqueio da apoptose; com o antígeno de diferenciação celular 44 (CD44), promovendo a sobrevivência celular, quimiotaxia e a adesão celular (EL- TANANI *et al.*, 2006a); promove a ativação da “breast tumor kinase” (Brk), do fator nuclear κB (NF- κB) e do fator de ativação da transcrição 4 (ATF-4), aumentando a expressão do fator de

crescimento do endotélio vascular (VEGF), promovendo angiogênese (CHAKRABORTY *et al.*, 2008). Causa ainda, acréscimo na expressão da Ácido hialurônico sintase 2 (HAS2), que contribui para a ancoragem e sobrevivência (efeito antiapoptótico) das células tumorais (COOK *et al.*, 2006). Por outro lado a OPN sofre regulação por diversas substâncias como o estrógeno, o ativador de proteína 1 (AP-1), o Oncogene do sarcoma de Rous (Src), o segmento de DNA RE-1 e o p53 que intensificam a expressão da OPN (EL- TANANI *et al.*, 2006a), enquanto o gene de susceptibilidade do câncer mamário (BRCA1) (EL- TANANI *et al.*, 2006b) e o supressor de metástase do câncer mamário (BRMS1) (SAMANT *et al.*, 2007), inibem a expressão de OPN. Há uma relação aditiva da OPN com a proteína S100A4 na promoção de metástases (RUDLAND *et al.*, 2006). O conhecimento destas inter-relações pode, no futuro, orientar novas abordagens terapêuticas no tratamento das neoplasias.

Estudos em humanos sugerem uma potencial utilidade da determinação dos níveis plasmáticos de osteopontina tanto para a avaliação da resposta do paciente à terapia, quanto para o prognóstico do desenvolvimento do tumor e da disseminação de metástases (BRAMWELL *et al.*, 2006; ANG *et al.*, 2005; SINGHAL *et al.*, 1997).

De forma geral, a literatura relacionada a neoplasias humanas indica um aumento substancial nos níveis plasmáticos de OPN. ANG *et al.* (2005) determinaram este aumento em pacientes com carcinoma de células transicionais da bexiga. Já KHODAVIRDI *et al.* (2006), mostraram esse aumento como fator contribuinte para a progressão do câncer de próstata. FEDARKO *et al.* (2001) relataram aumento nos níveis de OPN em cânceres de mama, cólon, próstata e pulmão, porém utilizou soro ao invés do plasma, utilizado neste trabalho. LIU *et al.* (2010), demonstraram que a

supressão da OPN diminui a atividade de proliferação e invasão de células tumorais prostáticas *in vitro*, assim como JAN *et al.* (2010) demonstraram o papel da OPN na invasão tumoral de gliomas em roedores. BRAMWELL *et al.* (2006), constataram um aumento nos níveis de OPN em mulheres com neoplasias mamárias metastáticas, assim como MARTINETTI *et al.*, (2004), que evidenciaram um aumento de OPN sérica em pacientes com metástase óssea de neoplasia mamária. SINGHAL *et al.* (1997) também referiram um aumento nos níveis de OPN em pacientes com neoplasia mamária metastática. Enquanto ALLAN *et al.* (2006) evidenciaram um aumento de produção de OPN em linfonodos com presença de metástase mamária em relação ao tumor mamário, evidenciando o papel da OPN como promotora de metástase. BRAMWELL *et al.* (2006), MARTINETTI *et al.*, (2004) e SINGHAL *et al.* (1997) relataram ainda, que o acréscimo nos níveis de OPN está relacionado com um menor tempo de sobrevida. RUDLAND *et al.* (2002) constataram que a presença de OPN pode causar metástases em roedores inoculados com células tumorais mamárias humanas.

III MATERIAL E MÉTODOS

1 Grupos experimentais

Neste experimento utilizaram-se amostras de 43 fêmeas caninas, sem predileção de raça ou idade, atendidas pelo Serviço de Oncologia Veterinária e pelo Serviço de Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP, colhidos entre março de 2009 e setembro de 2010.

Destes animais, 28 eram portadores de tumor mamário, com diagnóstico histopatológico de carcinoma ou carcinoma em tumor misto, com ou sem presença de micrometástase, e 15 hígidos (que não estavam sob a ação de nenhum tratamento farmacológico e sem presença de sinais clínicos de qualquer doença) para o grupo controle.

Em um primeiro momento, os animais foram distribuídos em dois grupos, controle (GC), com 15 animais e de portadores de tumor (GT), com 28 animais. Posteriormente, os animais portadores de tumor foram distribuídos em três grupos, como a seguir:

- Grupo Tumor 1 (GT1): 10 animais portadores de carcinoma mamário, sem metástase detectada;
- Grupo Tumor 2 (GT2): 10 animais portadores de carcinoma mamário, na presença de macro ou micrometástase detectada; e
- Grupo Tumor 3 (GT3): 8 animais portadores de carcinoma em tumor misto, sem micrometástase detectada.

2 Colheita e processamento das amostras

2.1 Histopatologia:

Os fragmentos de tumor mamário dos animais dos grupos GT1, GT2 e GT3 foram colhidos através de biopsia excisional após mastectomia. Logo após a colheita, os fragmentos foram imersos em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) para fixação por, no mínimo, 48 horas.

Uma vez fixados, foram processados rotineiramente no Serviço de Anatomopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP, Jaboticabal, até a inclusão em parafina, passando pela desidratação em sequência crescente de alcoóis e diafanização em xilol. Cortes de 5µm foram feitos em micrótomo e posteriormente corados pelo método da Hematoxilina e Eosina. A análise foi realizada em microscópio de luz Nikon Eclipse E200. Fotomicrografias digitais foram obtidas com auxílio de câmara de vídeo Moticam 2300.

Microscopicamente, foi avaliado o grau de diferenciação celular, pleomorfismo nuclear, anaplasia, formação tubular, presença de figuras mitóticas, evidência de êmbolos tumorais em vasos sanguíneos e linfáticos e metástases em linfonodos inguinais ou axilares, quando enviados.

A classificação histológica foi orientada pelo “Consenso para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias mamárias da cadela” (CASSALI *et al.*, 2011). A graduação histológica foi realizada segundo ELSTON E ELLIS (1998), onde é avaliada a porcentagem de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a presença de figuras mitóticas. Cada item varia de 1 a 3 pontos e a soma dos referidos pontos leva a

um escore (3 a 9) que determina a graduação da seguinte forma: 3 a 5 pontos – grau I; 6 a 7 pontos – grau II; e 8 a 9 pontos - grau III. (Tabela 1).

Tabela 1. Sistema de pontuação utilizado para a graduação histológica segundo Elston e Ellis (1998).

Formação tubular	Pontos
> 75%	1
>10% e<75%	2
< 10%	3
Pleomorfismo nuclear	
Baixo	1
Moderado	2
Severo	3
Figuras mitóticas	
0 a 8*	1
9 a 16*	2
17 ou mais*	3

* Em 10 campos de grande aumento. Objetiva de 40 X.

2.2 Colheita de sangue:

Foram realizadas duas colheitas de sangue dos animais do grupo GT, antes (basal) e 10 dias após a ressecção tumoral, sendo segunda colheita utilizada apenas para a realização do Elisa, e uma colheita dos animais do grupo GC.

Foram colhidos, de cada animal, 7 mL de sangue, por venopunção da jugular, com 4 mL acondicionados em tubos contendo o anticoagulante Ácido Etilenodiaminotetracético dissódico (Na₂ EDTA) para a realização do hemograma e do ELISA, e 3 mL acondicionados em tubos sem anticoagulante para a realização dos exames de bioquímica sérica (ALT e creatinina).

2.3 Hemograma e bioquímicos séricos:

Os exames hematológicos foram realizados pelo laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP.

Para a realização do hemograma foi utilizado um analisador hematológico Micros ABX 60 e para as análises bioquímicas um analisador bioquímico Labquest e kits para ALT e creatinina da Labtest.

2.4 Elisa:

Para a realização do Elisa, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma aliquotizado em tubos Eppendorf de 1,5 mL foi novamente centrifugado a 10000 rpm por três minutos a 4°C e aliquotizado para novo tubo, sendo estocado a -80°C, em freezer, até sua análise.

O ELISA, tipo sanduíche, foi realizado a partir da técnica desenvolvida por BAUTISTA *et al.* (1996), com adaptações. Todas as amostras de um mesmo animal foram analisadas em uma mesma bateria como proposto por MARTINETTI *et al.* (2004) e em duplicatas, tomando-se a média das leituras das amostras para a análise

estatística. Amostras com diferenças de densidade óptica (DO) superiores a 80 foram descartadas ou refeitas.

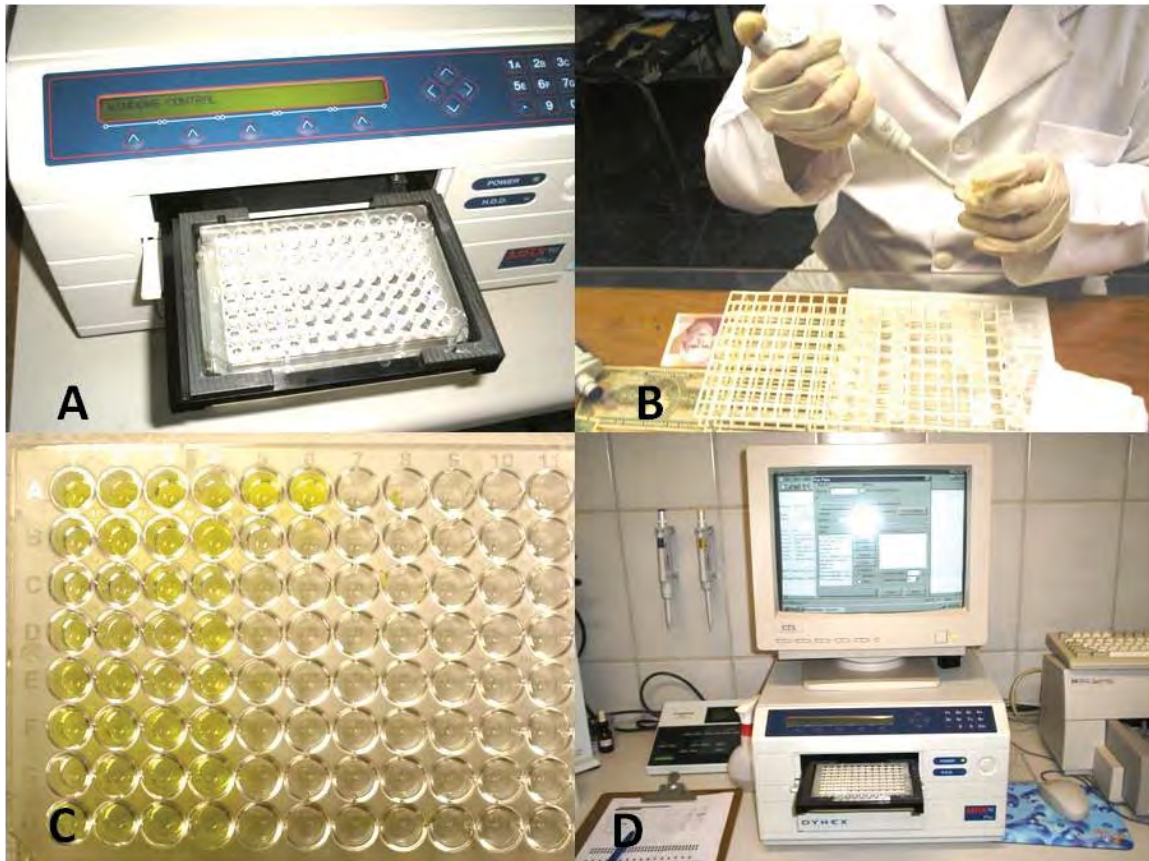


Figura 1. Elisa. A) Placa de Elisa pronta para a leitura. B) Processo de pipetagem para a diluição do plasma. C) Placa de Elisa após leitura. Notar a coloração amarelada dos poços com presença de Osteopontina. D) Leitora de placa MRX Tc plus (Dynex).

Resumidamente, sensibilizou-se a placa Nuclon Surface (Nalge Nunc International Corp. Rochester, NY, USA) adicionando-se 100 μ l/pocinho do anticorpo policlonal, produzido em coelho, anti Osteopontin (US Biological, Swampscott, MA, USA nº cat. 08064-04B) diluído (4 μ l/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubado a 4°C por 15 horas em câmara úmida. A placa foi, então, bloqueada com tampão fosfato salino (PBS) acrescido de 5% de leite em pó com incubação de 2 horas a 36°C, após o que a placa foi lavada três vezes com PBS/Tween 80. Foi adicionado,

em cada pocinho, 100 μ L de plasma diluído (1:400) em PBS, com incubação de uma hora a 36°C. Nova lavagem foi realizada como descrito acima. Em seguida foi adicionado o conjugado anticão acoplado com fosfatase alcalina (Sigma, USA, nº cat 038K4760) na diluição de 1:4000 em PBS com incubação a 36°C por uma hora. Novo ciclo de lavagem. Foi, então, adicionado o substrato para fosfatase alcalina P-nitrofenilfosfato (Pnpp) (Sigma, USA, nº cat N2770-50 Set) diluído (1mg/mL) em tampão tris, sendo incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro leitora de placa MRX Tc plus no comprimento de onda 405 nm.

Foi realizada uma curva para a conversão de DO em ng/dL e OPN, utilizando-se a proteína OPN (Abcam, USA, nº de cat. ab87460), nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,50, 31,25 e 15,62 ng/pocinho. Os valores de DO foram convertidos através de regressão linear, pela equação $DO = 106,3 + 0,1147 \text{ OPN}$.

3 Análise estatística:

Para a análise estatística, confrontaram-se os níveis plasmáticos basais de OPN (em ng/dL) com os parâmetros do hemograma, ALT e creatinina. Foram avaliados 43 cães, hígdos ou com presença de tumor mamário, independente da classificação e graduação histológica (GC+GT), através do teste de correlação de Pearson ($P < 0,05$).

As comparações das médias de OPN entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA de um só fator) e teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Foram realizadas provas de variâncias iguais (Bartlett e Levene) e prova de normalidade (Anderson-Darling). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Minitab 15.

Os níveis plasmáticos de OPN (em DO e ng/d) no GC e no grupo GT foram comparados para determinar a eficiência do teste ELISA em diagnosticar a presença de tumores mamários. Comparou-se o GC e os grupos GT1, GT2 e GT3, separadamente, para determinar a eficiência da OPN como biomarcador para metástase de tumores mamários. Realizou-se, ainda, a comparação entre a primeira e segunda colheita nos grupos GT1, GT2 e GT3 para avaliar o valor preditivo da OPN em relação ao tratamento.

IV Resultados

Distribuição de raças e idade:

Os cães do grupo GT apresentaram uma distribuição de raças com predomínio das raças SRD e Poodle, representando, em conjunto, 53% dos animais acometidos por tumores (Tabela 2).

Tabela 2. Número de cães e frequência, por raça, acometidas de tumores mamários utilizados no experimento.

Raças	Número de cães	Frequência (%)
Boxer	1	3
Cocker	2	7
Fox	2	7
Maltes	1	4
Pequinês	1	4
Pinscher	2	7
Pitt Bull	1	4
Poodle	6	21
Rottweiler	1	4
SRD	9	32
Teckel	2	7
Total	28	100

A idade média dos cães do grupo GT foi de $8,63 \pm 2,61$ anos, com idade mínima de quatro anos e máxima de 14,9 anos e intervalo interquartil de 7 a 10,025 anos. A distribuição, por idade, encontra-se na figura 2.

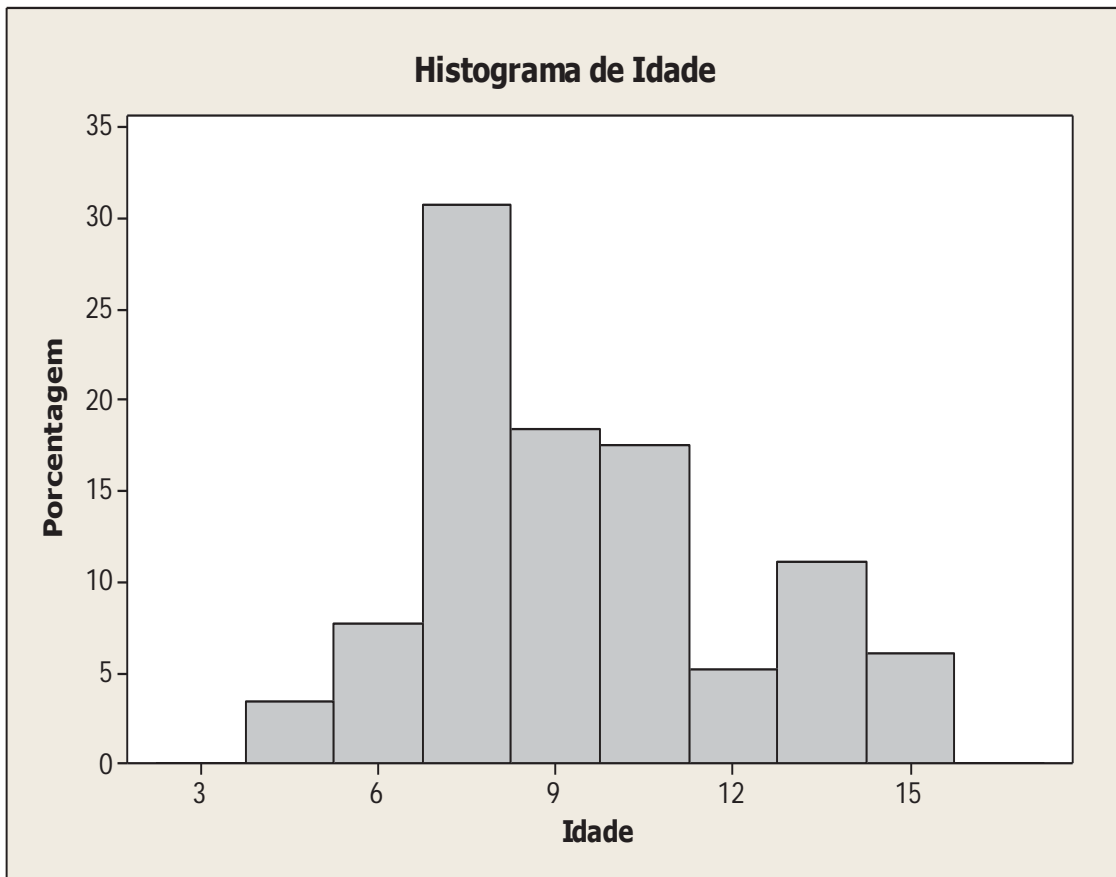


Figura 2. Histograma da porcentagem de animais portadores de tumor mamário, independente do tipo histológico, segundo a idade. As barras representam um limite de classe de 1,5 anos.

Achados Histopatológicos:

Nos grupos GT1 E GT2 houve uma maior prevalência no número de ocorrências dos carcinomas túbulos papilíferos, com 16 ocorrências (oito tubulares e oito papilíferos), seguido dos carcinomas sólidos (três ocorrências) e anaplásico (uma ocorrência) (Figura 3). Nos grupos GT1, GT2 e GT3 houve uma maior incidência de tumores com grau II (13 ocorrências), seguidos pelos de grau I (10 ocorrências) e os de grau III (cinco ocorrências). Todos os tumores com grau III encontraram-se no grupo GT2 e os de grau I encontram-se nos grupos GT1 e GT3, grupos que não apresentaram metástases (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação e graduação histológica dos tumores dos animais dos grupos GT1, GT2 e GT3.

Grupo	Tumor	Graduação	Número de Animais
GT1	Carcinoma papilífero	I	3
	Carcinoma tubular	I	3
	Carcinoma sólido	II	2
	Carcinoma tubular	II	2
	Total		10
GT2	Carcinoma sólido	III	1
	Carcinoma anaplásico	III	1
	Carcinoma papilífero	II	3
	Carcinoma papilífero	III	2
	Carcinoma tubular	II	2
	Carcinoma tubular	III	1
Total		10	
GT3	Carcinoma em tumor misto	I	4
	Carcinoma em tumor misto	II	4
	Total		8

Grupo GT1: animais sem micrometástases detectadas.

Grupo GT2: animais com micrometástases.

Grupo GT3: animais com carcinoma em tumor misto, sem metástase detectada.

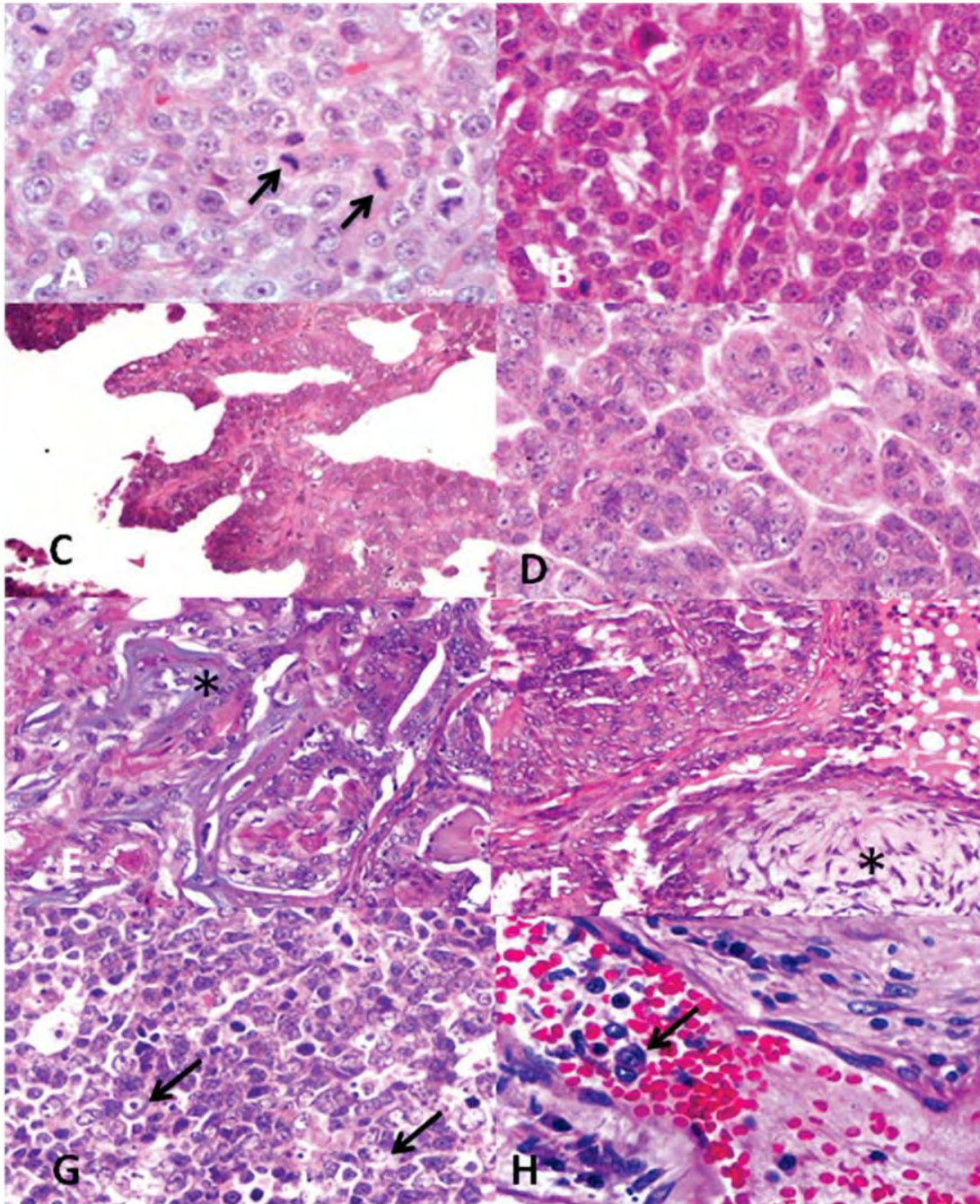


Figura 3. Fotomicrografia de carcinomas mamários. A) Carcinoma sólido grau III. Notar presença de figuras mitóticas (setas) e pleomorfismo nuclear moderado, HE, 400X. B) Carcinoma anaplásico grau III. Notar pleomorfismo nuclear acentuado, HE, 400X. C) Carcinoma papilífero grau II. Notar estruturas papilares, HE, 200X. D) Carcinoma tubular grau II. Notar formação acinar, HE, 400X. E) Carcinoma em tumor misto grau I. Notar a formação em paliçada com proliferação mioepitelial e presença de matriz mixoide (*), HE, 200X. F) Carcinoma em tumor misto grau II. Notar a presença de matriz cartilaginosa (*), HE, 200X. G) Linfonodo com presença de células metastáticas (setas), HE, 400X. H) Vaso sanguíneo com presença de célula tumoral em seu interior (seta), HE, 400X.

Tumor mamário, hemograma, ALT e creatinina:

Os grupos GC e GT apresentaram as médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dentro da faixa de valores de normalidade estabelecida e utilizada pelo laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV – UNESP Jaboticabal, SP, (Figura 4). (Anexo 1).

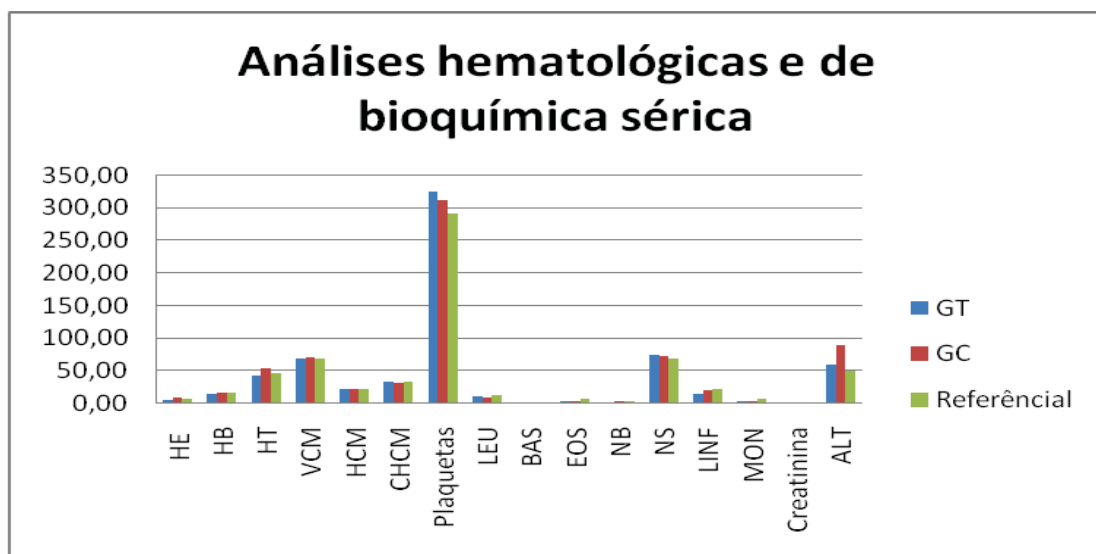


Figura 4. Número de hemácias $\times 10^6$ (HE), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), plaquetas $\times 10^3$, Leucócitos totais $\times 10^3$ (LEU), bastonetes (BAS), eosinófilos (EOS), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF), monócitos (MON), creatinina e alanina aminotransferase (ALT) de cães hígidos GC (colunas vermelha), com presença de tumores mamários GT (colunas azul) e a média dos valores referências do laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP (colunas verdes). Notar a coincidência entre os valores de cada parâmetro.

Não houve alterações significativas entre os parâmetros do hemograma e os níveis de creatinina e ALT, mas houve um ligeiro aumento no nível de ALT no GC em

relação à média do GT e à média dos valores de referência utilizados pelo Laboratório e um aumento na quantidade de plaquetas do GT em relação à GC e os valores médios de referência.

Correlação entre OPN, hemograma, ALT e creatinina:

A análise da correlação entre os níveis de OPN e os parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentaram, em nenhum parâmetro, significância estatística ($P < 0,05$), (Figura 5). (Anexo 2).

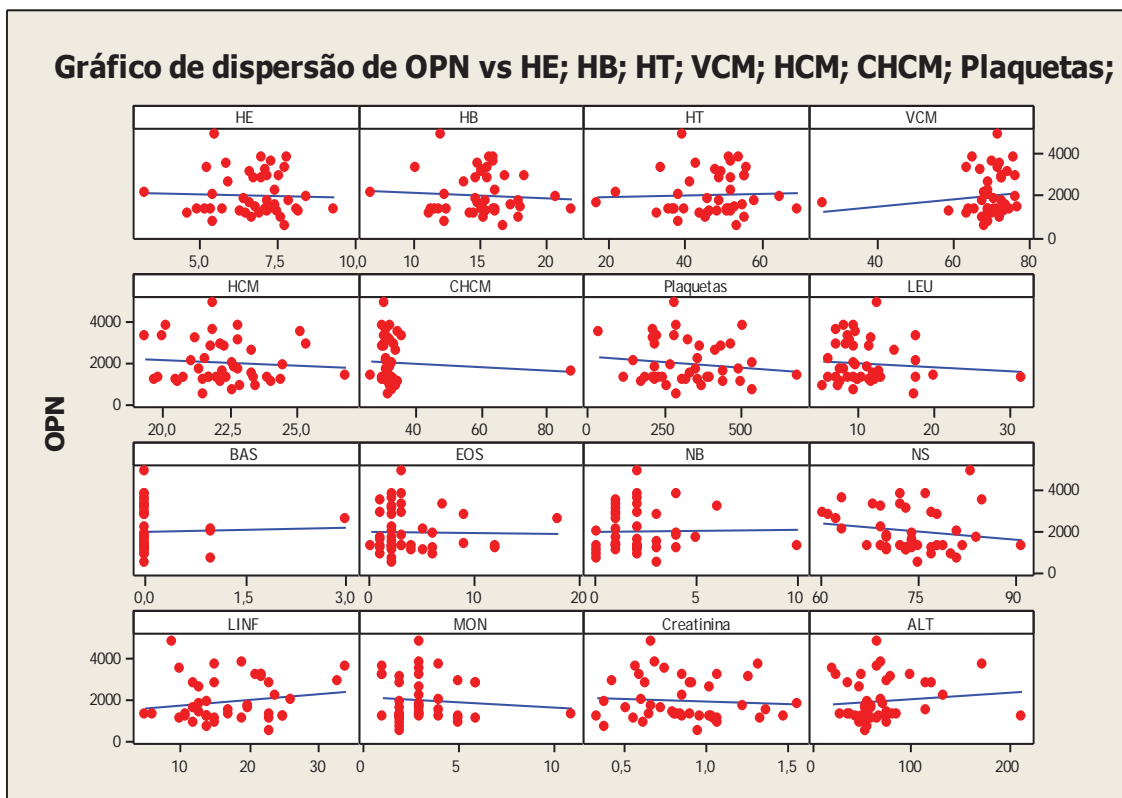


Figura 5. Gráfico de dispersão evidenciando a falta de correlação entre os níveis plasmáticos de OPN (ng/dL) e os parâmetros do hemograma e bioquímicos séricos. Notar a dispersão elevada em todos os parâmetros. Hemácias $\times 10^6$ (HE), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), plaquetas $\times 10^3$, Leucócitos totais $\times 10^3$ (LEU), bastonetes (BAS), eosinófilos (EOS), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmentados (NS), linfócitos (LINF), monócitos (MON), creatinina e alanina aminotransferase (ALT).

Elisa:

Os animais do grupo GC apresentaram valores de DO variando entre 241 e 667,5, com média de $392,9 \pm 132,95$ DO e valores de OPN variando entre 4893 e 1174, com média de 2499 ± 1159 ng/dL.

A amplitude de referência foi determinada pela fórmula $AR = \mu \pm 1,96 \times \sigma$, resultando em um intervalo entre 652,58 a 131,42 DO e 4770 e 227 ng/dL. Nenhuma amostra dos grupos GT1, GT2 e GT3 alcançou estes patamares. Os parâmetros estatísticos do grupo GC estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros estatísticos do grupo GC.

Parâmetro	Valor (DO)	OPN (ng/dL)
Média	392,9	2499
Desvio Padrão	132,95	1159
Máximo	667,5	4893
Mínimo	241,0	1174
Amplitude de referência	131,42 a 652,58	4770 a 227

Quando a comparação do grupo GC foi realizada com o grupo GT, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no teste de Tukey entre GC e GT tanto na colheita basal quanto na pós cirúrgica considerando os valores de DO, porém o meso não ocorreu quando considerado os valores de OPN em ng/dL.

À colheita basal o grupo GT apresentou média de $305,9 \pm 100,3$ DO e à colheita pós cirúrgica, $300,4 \pm 96,8$ DO e 1740 ± 874 e 1692 ± 844 ng/dL, respectivamente. Os testes de igualdade de variâncias não apresentaram significância, Bartlett $p = 0,331$ e Levene $p = 0,18$ para DO e $p = 0,33$ e $p = 0,18$ para ng/dL.

Embora haja um desvio da normalidade, tanto para DO quanto para ng/dL, esta não compromete as avaliações, posto que o teste de Tukey seja bastante robusto para esta variação (Figura 6).

Contrariamente do que se esperava ao iniciar-se este trabalho, houve uma diminuição nos níveis plasmáticos de OPN no GT em relação ao GC (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação de médias de DO pelo teste de Tukey dos grupos GC e GT.

Grupo	Colheita	Média
GT	1ª colheita	300,4 ^b
	2ª colheita	305,9 ^b
GC	-	392,9 ^a

Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes

As médias e os respectivos desvios padrões para os grupos GT1, GT2 e GT3 foram, respectivamente, $305,6 \pm 97,06$; $317,9 \pm 119,04$; e $291,3 \pm 89,42$ DO para a 1ª colheita e $299,9 \pm 89,40$; $315,7 \pm 112,43$; e $281,9 \pm 94,32$ DO para a 2ª colheita. Os valores em ng/dL foram 1738 ± 846 , 1844 ± 1038 e 1612 ± 780 para a 1ª colheita e 1688 ± 779 , 1826 ± 980 e 1531 ± 822 para a 2ª colheita, respectivamente. Não apresentando diferenças estatísticas, pelo teste de Tukey. (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros estatísticos de DO e OPN (ng/dL) em cães com carcinomas mamários sem metástase (GT1), com metástases (GT2), com carcinomas em tumor mamário misto (GT3) e cães hípidos (GC). A 1ª colheita realizada durante a primeira consulta do animal e a 2ª colheita realizada 10 dias após a exérese do tumor.

	Grupo	GT1		GT2		GT3		GC	
		Colheita	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª
DO	Média		305,6	299,9	317,9	315,7	291,3	281,9	392,9
	Desvio Padrão		97,06	89,40	119,04	112,43	89,42	94,32	132,95
OPN	Média		1738	1688	1844	1826	1612	1531	2499
	Desvio Padrão		± 846	± 779	± 1038	± 980	± 780	± 822	± 1159

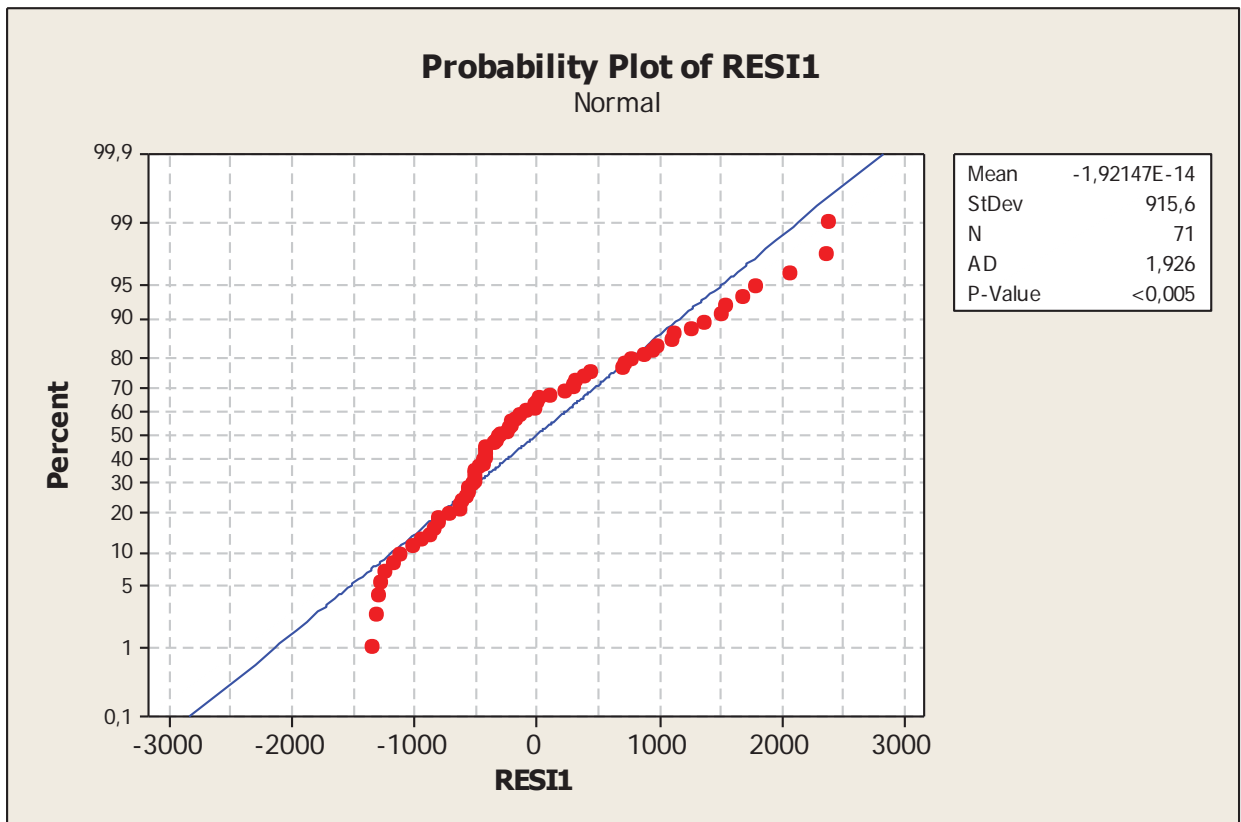


Figura 6. Gráfico de probabilidade de normalidade para os níveis OPN de GT. O valor de p indica a rejeição da hipótese dos valores terem uma distribuição normal.

Os cálculos de sensibilidade (SE), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (PPV) e valor preditivo negativo (NPV) para o teste Elisa apresentaram os seguintes resultados:

$$SE = TP / (TP + FN) = 0 / (0 + 28) = 0$$

$$Sp = TN / (TN + FP) = 15 / (15 + 0) = 1$$

$$PPV = TP / (TP + FP) \times 100 = 0 / (0 + 0) \times 100 = \#$$

$$NPV = TN / (TN + FN) \times 100 = 15 / (15 + 28) \times 100 = 34,88$$

Onde, TP=0, é o total de verdadeiros positivos, FN=28 é o total de falsos negativos, TN=15 é o total de verdadeiros negativos e FP=0 é o total de falsos

positivos. Indicando Mostrando que a OPN, em cães com tumores mamários, não apresenta efetividade para a avaliação diagnóstica e/ou prognóstica.

V Discussão

Os resultados deste ensaio mostram que a média da idade dos animais acometidos por algum tipo de neoplasia mamário e sua maior incidência ocorrendo entre os 7 e 10 anos, ainda como, a maior incidência em cães das raças Poodles e SRDs, estão de acordo, dentro da literatura nacional, especialmente representada por DE NARDI *et al.* (2009). Estas frequências, entretanto, não podem ser consideradas representativas da prevalência dos tumores mamários ou da frequência de idades da população canina da região em que este estudo se insere, posto que, ao longo deste ensaio houve proprietários que optassem pela não realização do tratamento ou não retornassem para a retirada dos pontos após a cirurgia, além do que o critério de seleção dos animais utilizados foi seletivo, descartando animais que não se adequavam ao experimento, o que pode ter alterado estas frequências.

As análises das médias hematológicas e dos níveis de creatinina não apresentam variações consideráveis, podendo, estas, serem explicadas pela presença de infecções concomitantes e pela variação fisiológica de cada animal. Já as variações mais evidentes dos níveis de ALT, com uma maior elevação dentro do grupo controle, podem indicar lesão celular hepática, sem presença de sinais clínicos ou alteração em hemograma, em alguns animais (Anexo 1).

Não foram encontradas na literatura, referências que confrontem ou corroborem o fato de não haver alteração nos valores de normalidade do hemograma, ALT e creatinina entre os animais do GC e do GT. Não havendo também trabalhos que correlacionem os níveis de OPN com os parâmetros hematológicos, ALT e creatinina.

Neste trabalho os níveis de DO apresentaram-se estatisticamente diminuídos nos animais portadores de neoplasia mamária (GT) quando comparados com animais hígidos (GC). Porém mostrou alterações quando se comparam o grupo GC e os grupos GT1, GT2 e GT3 separadamente, ou quando comparados os GC e GT após a transformação dos dados pela equação de regressão linear. Este fato possivelmente se deva ao número pequeno de amostras e ao alto desvio padrão dos grupos, sobretudo o GC, que se torna mais susceptível a variações individuais nos níveis de OPN.

Isso contraria, de forma geral, a literatura sobre a OPN em neoplasias humanas, que indicam um aumento nestes níveis, sobretudo em tumores metastáticos e em tumores agressivos (McALLISTER *et al.*, 2008; BRAMWELL *et al.*, 2006; ANG *et al.*, 2005; SINGHAL *et al.*, 1997). Adicionando-se que não houve neste trabalho, níveis significantes de diferença estatística entre os grupos com maior prevalência de tumores de grau I e não metastáticos (GT1 e GT3) em comparação com o grupo com maior prevalência de tumores de grau III e metastáticos (GT2).

A literatura sugere ainda que a supressão na expressão de OPN diminua a ação de invasão tumoral e proliferação de metástases (LIU *et al.*, 2010; JAN *et al.*, 2010; McALLISTER *et al.*, 2008).

Este trabalho não pode avaliar se os níveis de OPN influenciam no tempo de sobrevida, com indicado por BRAMWELL *et al.* (2006), MARTINETTI *et al.*, (2004) e SINGHAL *et al.* (1997) que evidenciaram que níveis de OPN aumentados estão relacionados com um menor tempo de sobrevida.

Há, na literatura, escasso material que relacione OPN e neoplasias em cães. Necessita-se de maiores estudos para determinar mecanismos que expliquem o

comportamento díspar desta proteína em neoplasias mamárias caninas quando comparadas com o comportamento em neoplasias humanas. KLOPFLEISCH *et al.* (2010), avaliando, entre outras, a expressão de OPN em cães com tumores de mama, benignos e malignos, não encontraram nenhuma alteração nos níveis de expressão para OPN. Assim como SOARES *et al.* (2009), avaliando a marcação imuno histoquímica de OPN em tumores mamários caninos, não evidenciaram marcações discrepantes entre os tumores mamários benignos e malignos avaliados. Os valores preditivos para o teste Elisa demonstraram pouca especificidade e nenhuma sensibilidade com grande possibilidade de resultados falsos negativos, carecendo mais uma vez, de um maior número de amostras para determinar sua eficiência diagnóstica.

VI Conclusões

Este trabalho permite concluir que:

1. Não há alterações entre os valores de hemograma, ALT e creatinina entre animais com neoplasia mamária e animais hígidos. Também não há correlações entre os níveis plasmáticos de OPN e os parâmetros do hemograma, ALT e creatinina.
2. Considerando-se o menor nível plasmático de OPN no grupo de fêmeas caninas portadoras de neoplasias mamárias, abre-se uma nova perspectiva de pesquisa tendo em vista o fato de ser um resultado contrário ao observado em mulheres
3. O nível plasmático de OPN, diferentemente do que ocorre em humanos, não apresenta valor preditivo relevante para a presença de metástase de neoplasia mamária.
4. A OPN não mostrou valor preditivo para resultado do tratamento cirúrgico.

VII Referências

- ALLAN, A. L.; GEORGE, R.; VANTYGHM, S. A.; LEE, M. W., HODGSON, N. C.; ENGEL, C. J.; HOLLIDAY, R. L.; GIRVAN, D. P.; SCOTT, L. A.; POSTENKA, C. O.; AL-KATIB, W.; STITT, L. W.; UEDE, T.; CHAMBERS, A. F.; TUCK, A. B. Role of the Integrin-Binding Protein Osteopontin in lymphatic metastasis of Breast Cancer. **American Journal of Pathology**, v. 169, n.1, p. 233-46, 2006.
- ANG, C., CHAMBERS, A. F.; TUCK, A. B.; WINQUIST, E.; IZAWA, J. Plasma Osteopontin levels are predictive of disease stage in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. **BJU Internacional**, v. 96, p.803-05, 2005.
- BAUTISTA, D. S.; SAAD, Z.; CHAMBERS, A.F.; TONKIN, K. S.; O'MALLEY, F.P.; SINGHAL, H.; TOKMAKEJIAN, S.; BRAMWELL, V.; HARRIS, J.F. Quantification of Osteopontin in human plasma with an ELISA: Basal levels in Pre- and postmenopausal women. **Clinical Biochemistry**, v. 29, p.231-39, 1996.
- BRAMWELL, V. H. C.; DOIG, G. S.; TUCK, A. B.; WILSON, S. M.; TONKIN, K. S.; TOMIAK, A.; PERERA, F.; VANDENBERG, T. A.; CHAMBERS, F. Serial plasma Osteopontin levels have prognostic value in metastatic Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n.11, p. 3337-43, 2006.
- CASSALI G. D. *et al.* Consenso para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias mamárias da cadela. **Em fase de elaboração**, 2011.
- CHAKRABORTY, G.; JAIN, S.; KUNDU, G.C. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. **Cancer Research**, v. 68, n. 1, p.152-61, 2008.

- COOK, A.C.; CHAMBERS, A.F.; TURLEY, E.A.; TUCK, A.B. Osteopontin induction of hialuronansynthase 2 expression promotes breast cancer malignancy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n.34, p.24381-89, 2006.
- DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S.C. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, R.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. Ed. Roca, São Paulo. 1ª ed. p. 372-83, 2009.
- DENHARDT, D.T. & GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **The Faseb Journal**, v.7, p.1475-82, 1993.
- EL-TANANI, M.; CAMPBELL, F.C.; KURISSETTY, V.; JIN, D.; MCCANN, M.; RUDLAND, P.S. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. **Cytokine & Growth Reviews**, v. 17, p. 463-74, 2006.
- EL-TANANI, M.; CAMPBELL, F.C.; CROWE, P.; ERWIN, P.; HARKIN, D.P.; PHAROAH, P.; PONDER, B.; RUDLAND, P.S. BRCA1 suppresses osteopontin-mediated breast cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p.26587-601, 2006.
- ESLTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of histological grade. In: ESLTON, C.W.; ELLIS, I.O. Systemic Pathology. The breast. London: **Churchill Livingstone**, 1998. P. 365-84.
- FEDARKO, N.S.; JAIN, A.; KARADAG, A.; EMAN, M.R.V.; FISHER, L.W. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 4060-66, 2001.
- HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHIMIDT, M.H.; HOLT, D.E.; SHOFER, F.S.; SMITH, A.; SORENMO, K.U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, p.776-80, 2005

- JAN, H.J.; LEE, C.C.; SHIH, Y.L.; HUENG, D.Y.; MA, H.I.; LAI, J.H.; WEI, H.W.; LEE, H.M. Osteopontin regulates human glioma cell invasiveness and tumor growth in mice. **Neuro-Oncology**, v. 12, n.1, p. 58-70, 2010.
- KENNEDY, P.C. & MILLER, R.B. The Female Genital system, In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4th ed., cap.4, p.349-469, 1993.
- KLOPFLEISH, R.; KLOSE, P.; GRUBER, A.D. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4 and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**. v. 47, n. 3, p.446-54, 2010.
- KHODAVIRDI, A.C.; SONG, Z.; YANG, S.; ZHONG, C.; WANG, S.; WU, H.; PRITCHARD, C.; NELSON, P.S.; ROY-BURMAN, P. Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 883-888, 2006.
- KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MURALI MANOAR, B.; NAGINI, S. Of humans and canines: A comparative evaluation of Heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, p. 168-76, 2006.
- KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of human and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 218-24, 2006.
- KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; BALACHANDRAN, C.; MURALI MANOAR, B.; THANGADURAI, A.; NAGINI, S. Xenobiotic-metabolizing enzymes in canine mammary tumours. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 364-68, 2006.

KUSEWITT, D.F. & RUSH, L.J. Neoplasia and tumor biology. In: McGavin, M.D. & Zachary, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, p.294-295.

LIU, H.; CHEN, A.; GUO, F.; YUAN, L. A short-hairpin RNA targeting osteopontin downregulates MMP-2 and MMP-9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. **Cancer Letters**, DOI 10.1016, 2010. Acessado em 02/12/2010.

McALLISTER, S.S.; GIFFOD, A.M.; GREINER, A.L.; KELLEHER, S.P.; SAELZIER, M.P.; INCE, T.A.; REINHART, F.; HARRIS, L.N.; HYLANDER, B.L.; REPASKY, E.A.; WEINBERG, R.A. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. **Cell**, v. 133, p.994-1005, 2008.

MARTINETTI, A.; BAJETTA, E.; FERRARI, L.; ZILEMBO, N.; SEREGNI, E.; DEL VECCHIO, M.; LONGARINI, R.; LA TORRE, I.; TOFOLLATI, L.; PALEARI, D.; BOMBORDIERI, E. Osteoprotegerin and osteopontin serum values in postmenopausal advanced breast cancer patients treated with anastrozole. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, p.771-79, 2004.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4^a ed. Iowa State Press, 2002, p. 575-606.

NATASHA, T.; KUHN, M.; KELLY, O.; RITTLING, S.R. Override of the osteoclast defect in osteopontin deficient mice by metastatic tumor growth in the bone. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 2, p.551-61, 2006.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R.H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature**, V. 4, p.448-56, 2004.

- PORRELLO, A.; CARDELLI, P.; SPUGNINI, E.P. Pet models in cancer research: General principles. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 23, n.2, p. 181-93, 2004.
- RITTLING, S.R.; NOVICK, K.E. Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis. **Cell Growth & Differentiation**, v. 8, p.1061-69, 1997.
- RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; SCHMITT, F.L.; PAULSSON, M.; LINDMARK-MÄNSSON, H. The roles of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.16, n.6, p.1087-97, 2007.
- RUDLAND, S. S.; MARTIN, L.; ROSHANLALL, C.; WINSTANLEY, J.; LEINSTER, S.; PLATT-HIGGINS, A.; CARROLL, J.; WEST, C.; BARRACLOUGH, R.; RUDLAND, P. Association of S100A4 and Osteopontin with specific prognostic factors and survival of patients with minimally invasive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.4, p.1192-200, 2006.
- RUDLAND, P. S.; PLATT-HIGGINS, A.; EL-TANANI, M.; RUDLAND, S.S.; BARRACLOUGH, R.; WINSTANLEY, J.;HOWITT, R.; WEST, C.R. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 62, p. 3417-27, 2002.
- SAMANT, R.S.; CLARK,D.W.; FILLMORE, R.A.; CICEK, M.; METGE, B.J.; CHANDRAMOULI, K.H.; CHAMBERS, A.F.; CASEY, G.; WELCH, D. R.; SHEVDE, L.A. Breast cancer metastasis suppressor I (BRMSI) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF-κB activation. **Molecular Cancer**, v.6, n.6, 2007. Disponível em <http://www.molecular-cancer.com/content/6/1/6>. Acesso em [22/07/2008](http://www.molecular-cancer.com/content/6/1/6).

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P.S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumours. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 25-34, 2002.

SINGHAL, H.; BAUTISTA, D.S.; TONKIN, K.S.; O'MALLEY, F.P.; TUCK, A.B., CHAMBERS, A.F.; HARRIS, J.F. Elevated plasma Osteopontin in metastatic Breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. **Clinical Cancer Research**, v. 3, p.605-11, 1997.

SOARES, L.M.C. ; MAGALHÃES, G. M. ; SILVEIRA, A.,C.,T ; Garrido, E. ; ALESSI, A.C. Osteopontina em tumores mamários benignos e malignos de cadelas. Estudo imuno-histoquímico. In: XIV **Enapave, 2009**, Águas de Lindóia. Anais do XIV Enapave, 2009.

TAKAMI, Y.; RUSSEL, M.B.; GAO, C.; MI, Z.; GUO, H.; MANTYH, C.R.; KUO, P.C. Sp 1 regulates osteopontin expression in SW 480 human colon adenocarcinoma cells. **National Institute of Health Public Access**, v.142, n. 2, p.163-169, 2007.

Anexo 1
Tabela 1. Dados hematológicos de animais portadores de tumores mamários.

HE	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaquetas	LEU	BAS	EOS	NB	NS	LINF	MON	Creatinina	ALT
6,66	14,8	16,9	25,38	22,22	87,57	440	12,6	0	1	2	74	20	3	0,72	52
7,24	18,4	55,2	76,24	25,41	33,33	218	8,1	0	3	2	77	12	6	0,91	115,6
7,67	18	55,6	72,49	23,47	32,37	253	5	0	1	2	77	15	5	0,61	75,11
7,46	17,4	55	73,73	23,32	31,64	329	11,8	0	2	3	74	17	4	1,36	115,6
5,92	14,9	42,7	72,13	25,17	34,89	30,8	9,5	0	1	1	85	10	3	0,74	17,33
6,69	15,3	45,1	67,41	22,87	33,92	370	7	0	6	0	80	12	2	1,06	46,22
8,45	20,7	64,5	76,33	24,5	32,09	265	9,5	0	6	4	74	13	3	1,55	70,26
6,53	14,5	45,9	70,29	22,21	31,59	493	7,4	0	4	2	70	19	5	0,55	52,45
4,97	11,9	37,2	74,85	23,94	31,99	391	5,8	0	12	1	67	17	3	0,84	81,2
7,2	15,4	48,8	67,78	21,39	31,56	487	7,4	0	1	1	84	12	2	0,51	57,78
7,18	16,1	51,4	71,59	22,42	31,32	181	17,5	0	2	10	79	6	3	0,65	85,32
7,8	16,8	53,3	68,33	21,54	31,52	287	17,3	0	2	3	75	23	2	0,95	53,1
5,48	12,4	38	69,34	22,63	32,63	533	9,3	1	2	0	81	14	2	0,38	54,48
5,95	13,9	41,2	69,24	23,36	33,74	411	14,8	3	18	1	62	13	3	1,02	46,22
5,75	12,5	39,8	69,22	21,74	31,41	242	12,9	0	2	1	82	11	4	0,96	48,36
5,39	11,7	35,4	65,68	21,71	33,05	115	6,8	0	3	0	75	11	11	0,9	26,19
6,31	15,4	46,3	73,38	24,41	33,26	352	11,2	0	6	3	73	14	5	1,03	43,22
8,15	16,2	52	63,8	19,88	32,1	215	10,1	0	3	2	69	25	1	0,85	55,8
7,84	15,8	51,2	65,31	20,15	32,41	284	9,2	0	2	4	72	19	3	0,69	68,9
6,65	15,2	49,3	74,14	22,86	32,43	326	8,6	0	2	1	73	22	2	1,26	78,2
6,94	14,3	43,9	63,26	20,61	32,57	438	7,4	0	5	1	73	15	6	1,33	63,56
3,23	6,8	22	68,11	21,05	30,91	148	17,5	1	5	1	63	26	4	0,6	69,16
4,65	11,2	32,4	69,68	24,09	34,57	174	11,4	0	2	0	73	23	2	1,06	46,22
6,47	14,7	45,9	70,94	22,72	32,03	215	11	0	3	4	70	20	3	1,22	52,3
5,17	11,4	36,6	70,79	22,05	31,15	388	31,7	0	0	2	91	5	2	0,8	34,67
5,27	10,2	33,6	63,76	19,35	30,36	277	17,5	0	7	1	68	21	3	1,06	23,11
6,86	18,1	52,7	76,82	26,82	26,38	678	19,8	0	9	1	74	13	3	0,79	75,11
5,48	12,4	38	69,34	22,63	32,63	533	9,3	1	2	0	81	14	2	0,38	54,48

Tabela 2. Dados hematológicos de animais hígidos.

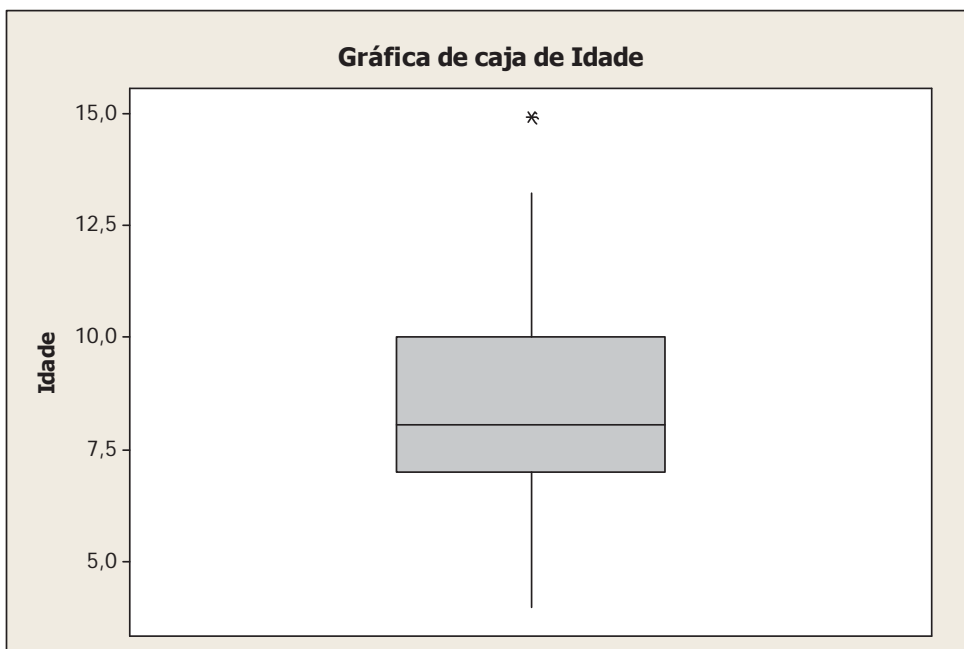
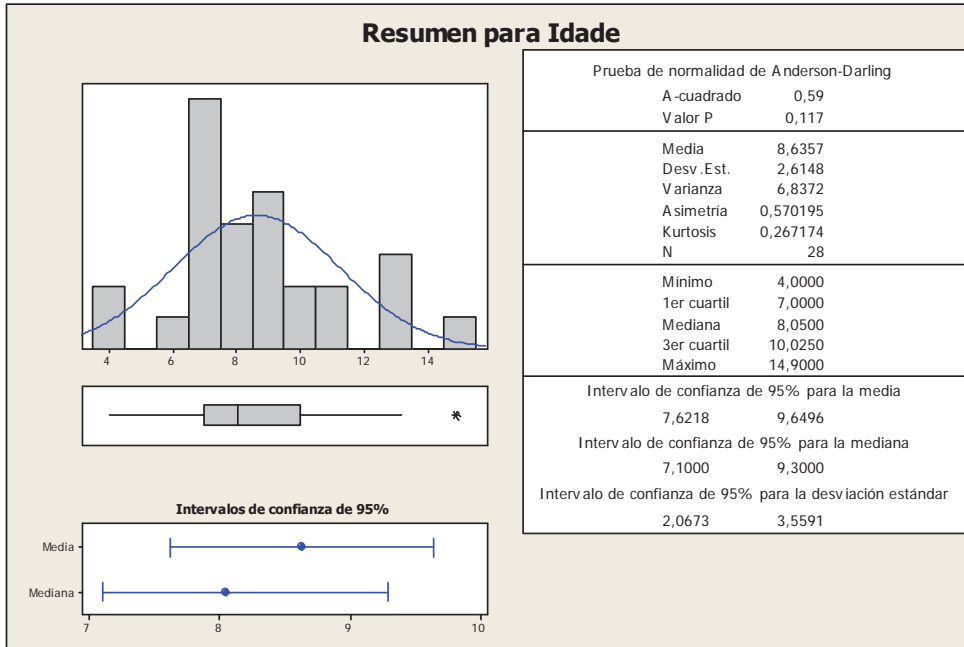
HE	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaquetas	LEU	BAS	EOS	NB	NS	LINF	MON	Creatinina	ALT
7,5	16,2	51,9	69	21,6	31,2	357	5,8	0	2	2	69	24	3	0,85	132,9
7,06	16,1	53,8	76	22,8	29,9	499	7,8	0	3	2	76	15	4	1,32	173,34
7,62	16,9	55,3	73	22,2	30,6	460	6,8	0	1	1	60	33	5	0,42	75,11
5,49	12	39,3	72	21,9	30,5	279	12,3	0	3	2	83	9	3	0,66	63,59
7,89	18	57,7	73	22,8	31,2	350	7,9	0	2	5	70	20	3	0,66	57,78
7,03	15,6	51,6	73	22,3	30,3	430	11,3	0	9	1	61	23	6	0,63	121,3
7,3	15,2	50,8	69	20,8	29,9	226	9,2	0	1	2	72	23	2	0,82	35,71
9,37	21,9	69	74	23,4	31,7	207	8,4	0	4	2	78	14	2	1,47	75,11
7,23	15,5	50,8	70	21,5	30,6	303	9,6	0	2	4	77	14	3	0,33	213,8
7,34	16,1	51,6	70	21,9	31,3	212	6,9	0	2	2	63	34	1	0,56	63,56
6,75	14,7	49	73	21,8	30	363	9,3	0	2	3	78	15	2	0,9	34,67
7,56	15,5	52	69	20,5	29,8	315	9,6	0	12	2	74	10	2	1,04	57,78
7,8	15,6	56	72	20	35,9	223	8,3	0	3	2	72	22	1	0,85	49,25
7,17	15,2	47,9	67	21,2	31,7	212	11,6	0	2	6	69	22	1	0,59	99,52
8,2	16,2	48,3	59	19,7	33,5	215	12	0	1	2	70	25	2	1,02	65,84

Tabela 3. Valores de referências mínimos e máximos utilizados pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária "Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto" do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", da FCAV – UNESP Jaboticabal, SP

Valor	HE	HB	HT	VCM	HCM	CHCM	Plaquetas	LEU	BAS	EOS	NB	NS	LINF	MON	Creatinina	ALT
Mínimo	5,5	12	37	60	19	31	180	6	0	2	0	60	13	3	0,5	10
Máximo	8,5	18	55	77	23	34	400	18	1	10	3	77	30	10	1,5	88

Anexo 2

Análise dos dados relativos à idade



Correlations: OPN; HE; HB; HT; VCM; HCM; CHCM; Plaquetas; ...

	OPN	HE	HB	HT	VCM
HE	-0,044 0,778				
HB	-0,067 0,668	0,918 0,000			
HT	0,037 0,815	0,844 0,000	0,863 0,000		
VCM	0,135 0,386	0,046 0,768	0,196 0,207	0,573 0,000	
HCM	-0,078 0,619	-0,090 0,567	0,308 0,045	0,136 0,383	0,375 0,013
CHCM	-0,060 0,700	-0,025 0,872	-0,029 0,854	-0,483 0,001	-0,878 0,000
Plaquetas	-0,124 0,428	-0,009 0,956	0,059 0,706	-0,017 0,912	-0,017 0,912
LEU	-0,094 0,549	-0,340 0,026	-0,320 0,037	-0,320 0,036	-0,078 0,619
BAS	0,030 0,848	-0,336 0,028	-0,288 0,061	-0,276 0,074	-0,006 0,968
EOS	-0,022 0,886	-0,159 0,308	-0,081 0,606	-0,045 0,773	0,158 0,312
NB	0,032 0,836	0,395 0,009	0,356 0,019	0,358 0,018	0,064 0,682
NS	-0,167 0,285	-0,082 0,600	-0,006 0,971	-0,046 0,770	0,044 0,779
LINF	0,176 0,260	0,160 0,306	0,015 0,926	0,041 0,793	-0,164 0,295
MON	-0,073 0,640	-0,188 0,228	-0,093 0,553	-0,116 0,458	0,046 0,767
Creatinina	-0,082 0,600	0,229 0,139	0,289 0,060	0,259 0,093	0,120 0,444
ALT	0,114 0,467	0,276 0,073	0,299 0,051	0,337 0,027	0,201 0,197

Cell Contents: Pearson correlation
P-Value

Análise estatística de OPN entre os grupos GC (7) e às 1^{as} e 2^{as} colheitas dos grupos GT1 (1 e 2 respectivamente), GT2 (3 e 4) e GT3 (5 e 6)

Descriptive Statistics: DO

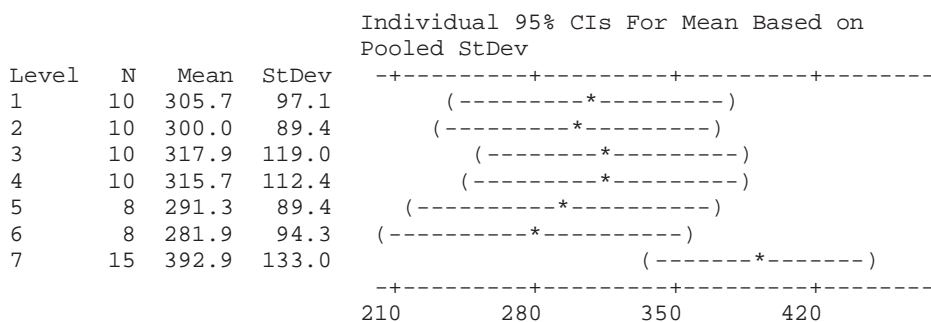
Variable	Trat	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
DO	1	10	305.7	30.7	97.1	211.5	230.3	286.3	348.0
	2	10	300.0	28.3	89.4	202.5	238.8	280.3	329.3
	3	10	317.9	37.6	119.0	162.0	248.6	260.0	422.9
	4	10	315.7	35.6	112.4	195.0	246.4	271.8	392.6
	5	8	291.3	31.6	89.4	192.0	236.4	265.5	334.5
	6	8	281.9	33.3	94.3	173.5	236.6	247.8	334.9
	7	15	392.9	34.3	133.0	241.0	251.5	428.5	483.0

Variable	Trat	Maximum	Skewness	Kurtosis
DO	1	512.5	1.36	1.28
	2	496.0	1.41	1.71
	3	545.5	0.87	-0.10
	4	573.5	1.52	2.25
	5	480.5	1.49	2.63
	6	479.5	1.48	2.46
	7	667.5	0.41	-0.67

One-way ANOVA: DO versus Trat

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	6	103910	17318	1.45	0.209
Error	64	763784	11934		
Total	70	867694			

S = 109.2 R-Sq = 11.98% R-Sq(adj) = 3.72%

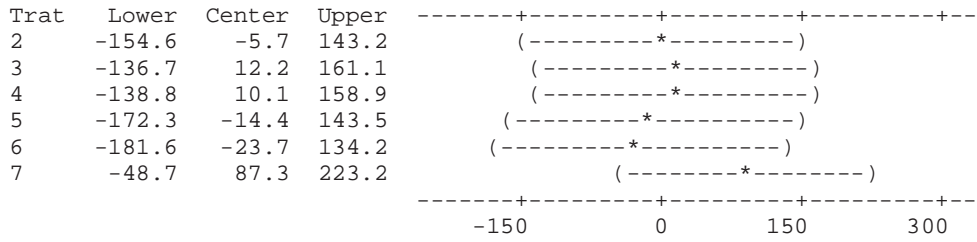


Pooled StDev = 109.2

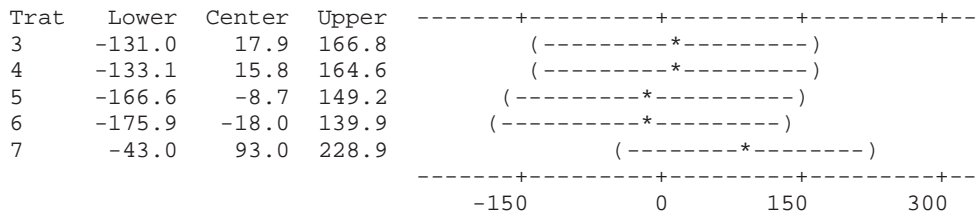
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Trat

Individual confidence level = 99.66%

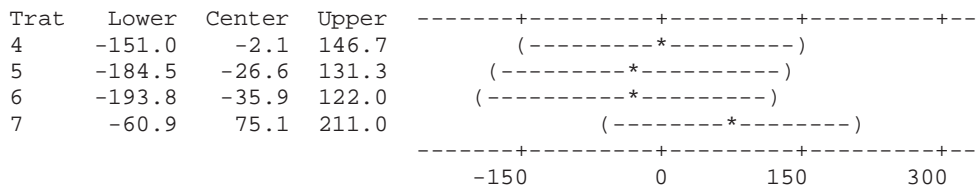
Trat = 1 subtracted from:



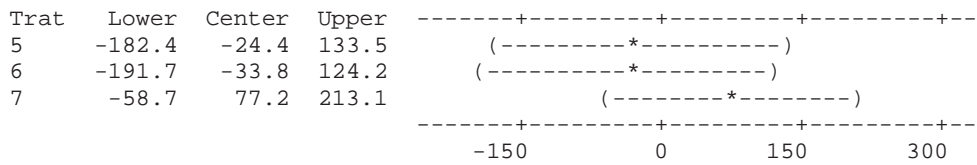
Trat = 2 subtracted from:



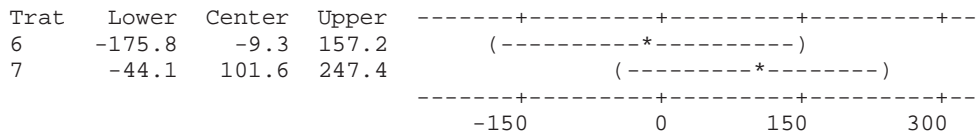
Trat = 3 subtracted from:



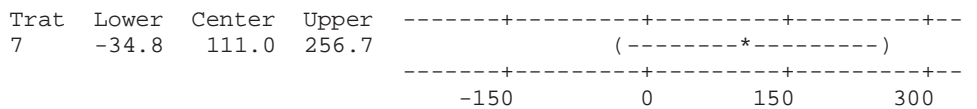
Trat = 4 subtracted from:



Trat = 5 subtracted from:



Trat = 6 subtracted from:



Test for Equal Variances: DO versus Trat

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Trat	N	Lower	StDev	Upper
1	10	58.8247	97.064	230.982
2	10	54.1827	89.405	212.755
3	10	72.1447	119.043	283.285
4	10	68.1403	112.435	267.561
5	8	51.4624	89.428	250.967
6	8	54.2815	94.326	264.715
7	15	87.4634	132.953	254.350

Bartlett's Test (normal distribution)
Test statistic = 2.90; p-value = 0.821

Levene's Test (any continuous distribution)
Test statistic = 0.70; p-value = 0.653

GC+GT1+GT2+GT3 -Estadísticas descriptivas: OPN; HE; HB; HT; VCM; HCM; CHCM; Plaquetas; ...

Variable	N	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3
OPN	43	336,2	18,1	118,8	162,0	245,5	292,0	435,0
HE	43	6,760	0,179	1,172	3,230	5,920	7,030	7,560
HB	43	15,049	0,415	2,722	6,800	13,900	15,400	16,200
HT	43	46,86	1,52	9,97	16,90	39,80	49,00	52,70
VCM	43	69,26	1,20	7,85	25,38	68,11	70,00	73,00
HCM	43	22,300	0,242	1,589	19,350	21,390	22,210	23,320
CHCM	43	33,11	1,32	8,66	26,38	30,91	31,70	32,63
Plaquetas	43	319,2	19,8	129,8	30,8	215,0	303,0	411,0
LEU	43	10,795	0,731	4,793	5,000	7,800	9,500	12,000
BAS	43	0,1628	0,0810	0,5314	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
EOS	43	3,512	0,438	2,873	0,000	2,000	2,000	5,000
NB	43	2,163	0,278	1,825	0,000	1,000	2,000	3,000
NS	43	73,860	0,978	6,413	60,000	70,000	74,000	78,000
LINF	43	17,140	0,965	6,331	5,000	13,000	15,000	22,000
MON	43	3,209	0,274	1,794	1,000	2,000	3,000	4,000
Creatinina	43	0,8581	0,0457	0,2998	0,3300	0,6300	0,8500	1,0400
ALT	43	69,33	5,76	37,76	17,33	48,36	57,78	75,11

Variable	Máximo	Asimetría	Kurtosis
OPN	667,5	0,86	-0,12
HE	9,370	-0,63	0,85
HB	21,900	-0,35	1,62
HT	69,00	-0,78	1,51
VCM	76,82	-4,34	23,84
HCM	26,820	0,51	0,57
CHCM	87,57	6,20	39,84
Plaquetas	678,0	0,42	0,26
LEU	31,700	2,31	7,69
BAS	3,0000	4,16	19,78

EOS	12,000	1,60	2,15
NB	10,000	2,14	7,26
NS	91,000	0,16	0,50
LINF	34,000	0,57	0,47
MON	11,000	2,19	7,42
Creatinina	1,5500	0,37	-0,33
ALT	213,80	1,96	4,99

Tabela 4. Níveis plasmáticos de OPN (ng/dL) em cães com carcinomas mamários sem metástase (GT1), com metástases (GT2), com carcinomas em tumor mamário misto (GT3) e cães hípidos (GC). A 1ª colheita realizada durante a primeira consulta do animal e a 2ª colheita realizada 10 dias após a exérese do tumor.

Grupo	GT1		GT2		GT3		GC	
	Colheita	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	
OPN		1619	1505	1340	1693	1143	1152	2216
		2865	2656	485	773	2059	1505	3768
		956	991	1980	1488	1130	1130	2909
		1518	1353	2639	2429	1780	1200	4892
		3541	3397	1257	1292	1344	2155	1706
		917	838	1340	1396	3262	3253	2839
		1854	1209	1191	1178	1431	1265	1344
		1122	1706	1257	1235	747	585	1265
		1318	1697	3829	4073			1200
		1666	1527	3122	2695			3641
								2809
								1174
								3284
							3214	
							1213	
Média	1738	1688	1844	1826	1612	1531	2499	
Desvio Padrão	±846	±779	±1038	±980	±780	±822	±1159	

Descriptive Statistics: GT; GT 2; GC

Variable	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
GT	28	1740	165	874	486	1156	1388	2040	3829
GT 2	28	1692	160	844	586	1184	1442	2043	4073
GC	15	2499	299	1159	1174	1266	2809	3284	4893

Variable	Skewness	Kurtosis
GT	1,07	0,27
GT 2	1,36	1,40
GC	0,41	-0,67

One-way ANOVA: GT; GT 2; GC

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	7273787	3636894	4,21	0,019
Error	68	58680021	862941		
Total	70	65953808			

S = 928,9 R-Sq = 11,03% R-Sq(adj) = 8,41%

Individual 95% CIs For Mean Based on
Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	CI
GT	28	1740,1	874,2	(-----*-----)
GT 2	28	1692,5	844,1	(-----*-----)
GC	15	2498,7	1159,1	(-----*-----)

1500 2000 2500 3000

Pooled StDev = 928,9

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,07%

GT subtracted from:

	Lower	Center	Upper	CI
GT 2	-642,8	-47,6	547,5	(-----*-----)
GC	46,1	758,6	1471,1	(-----*-----)

-800 0 800 1600

GT 2 subtracted from:

	Lower	Center	Upper	CI
GC	93,7	806,2	1518,7	(-----*-----)

-800 0 800 1600

Statistics

Variable	N	StDev	Variance
GT	28	874	764216
GC	15	1159	1343607
GT 2	28	844	712433

95% Confidence Intervals

Variable	Method	CI for StDev	CI for Variance
GT	Standard	(691; 1190)	(477696; 1415858)
	Adjusted	(682; 1217)	(465459; 1481698)
GC	Standard	(849; 1828)	(720186; 3341875)
	Adjusted	(888; 1668)	(789277; 2782965)
GT 2	Standard	(667; 1149)	(445327; 1319919)
	Adjusted	(629; 1282)	(396037; 1642903)

Results for: Worksheet 1

Test for Equal Variances: OPN versus Grupo

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Grupo	N	Lower	StDev	Upper
GC	15	795,538	1159,14	2045,46
GT 1 ^a	28	657,838	874,19	1280,62
GT 2 ^a	28	635,159	844,06	1236,47

Bartlett's Test (Normal Distribution)
Test statistic = 2,21; p-value = 0,331

Levene's Test (Any Continuous Distribution)
Test statistic = 1,71; p-value = 0,189

Descriptive Statistics: GT1 1; GT1 2; GT2 1; GT2 2; GT3 1; GT3 2; GC

Variable	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
GT1 1	10	1738	268	846	917	1081	1569	2107	3541
GT1 2	10	1688	246	779	839	1155	1517	1944	3398
GT2 1	10	1844	328	1038	486	1241	1340	2760	3829
GT2 2	10	1826	310	980	773	1221	1442	2496	4073
GT3 1	8	1612	276	780	747	1134	1388	1990	3262
GT3 2	8	1531	291	822	586	1136	1233	1993	3254
GC	15	2499	299	1159	1174	1266	2809	3284	4893

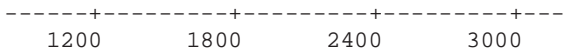
Variable	Skewness	Kurtosis
GT1 1	1,36	1,28
GT1 2	1,41	1,71
GT2 1	0,87	-0,10
GT2 2	1,52	2,25
GT3 1	1,49	2,63
GT3 2	1,48	2,46
GC	0,41	-0,67

One-way ANOVA: GT1 1; GT1 2; GT2 1; GT2 2; GT3 1; GT3 2; GC

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	6	7898246	1316374	1,45	0,209
Error	64	58055562	907118		
Total	70	65953808			

S = 952,4 R-Sq = 11,98% R-Sq(adj) = 3,72%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
GT1 1	10	1738,0	846,2	(-----*-----)
GT1 2	10	1688,3	779,5	(-----*-----)
GT2 1	10	1844,4	1037,9	(-----*-----)
GT2 2	10	1825,6	980,3	(-----*-----)
GT3 1	8	1612,5	779,7	(-----*-----)
GT3 2	8	1531,3	822,4	(-----*-----)
GC	15	2498,7	1159,1	(-----*-----)

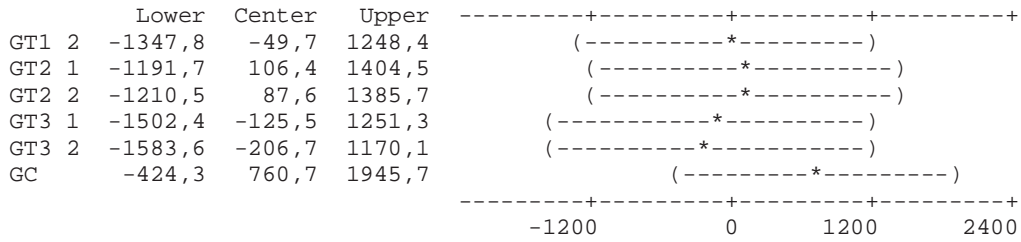


Pooled StDev = 952,4

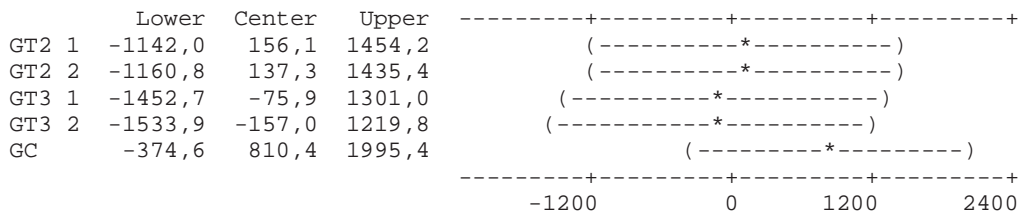
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,66%

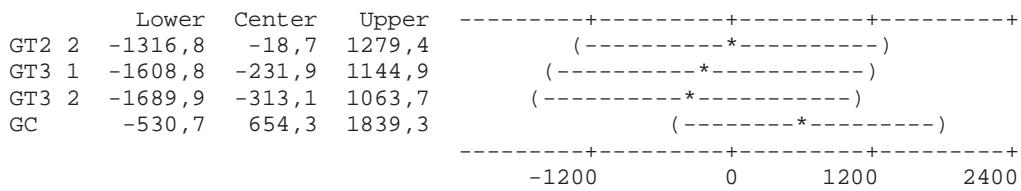
GT1 1 subtracted from:



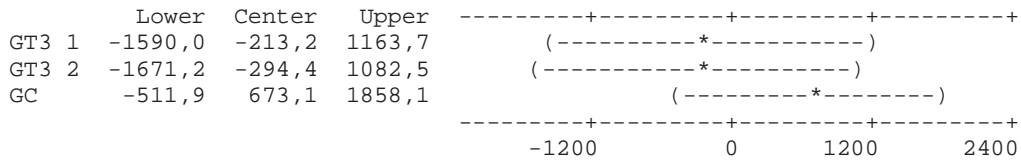
GT1 2 subtracted from:



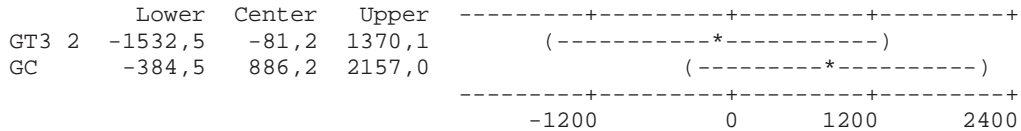
GT2 1 subtracted from:



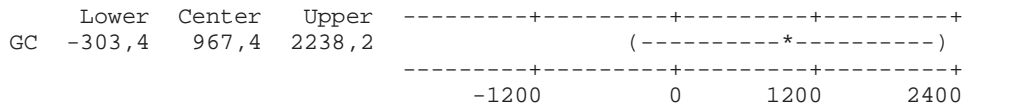
GT2 2 subtracted from:



GT3 1 subtracted from:



GT3 2 subtracted from:



Anexo 3

Artigos relacionados a OPN e tumor em cão (fonte PUBMED)

NCBI Resources How To

PubMed.gov
U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

Search: PubMed
RSS Save search Limits Advanced search Help

Search: PubMed
((complete blood count) AND Breast tumors) AND Dog Search Clear

Display Settings: Abstract

Cancer Invest. 2001;19(3):256-60.

Hepatic lymphatic mapping: a pilot study for porta hepatis lymph node identification.

Kahlenberg MS, Kane JM 3rd, Kanter PM, Weber TK, Gibbs JF, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ.

Department of Surgery, Section of Oncology, University of Texas, Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, TX 78299-3900, USA. Kahlenberg@uthsc

Abstract

The status of the porta hepatis lymph nodes in patients with hepatic metastases from colorectal cancer affects their prognosis and management. Lymphatic mapping in a melanoma animal model consisting of three dogs receiving general anesthesia was utilized. Each dog underwent a laparotomy and increasing doses of isosulfan blue dye intraoperatively, the presence of blue dye in the porta hepatis region was determined and the lymph node identified. Continuous physiological monitoring was performed preoperatively and on postoperative days 1, 2, 4, and 7. The animals were sacrificed on day 7. A portal lymph node was identified. There were no significant alterations in blood pressure or heart rate in the animals. There was a dose-responsive decrease in the O₂ saturation as measured by transcutaneous pO₂ levels remained stable. There were no significant changes in the liver function tests, amylase levels, or white blood cell counts. There was a small increase in hepatic injection of isosulfan blue dye appears to be safe and effective in identifying porta hepatis lymph nodes in the animal model and sets the basis for further studies.

PMID: 11338882 [PubMed - indexed for MEDLINE]

MeSH Terms, Substances

NCBI Resources How To

PubMed.gov
U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

Search: PubMed
Save search Limits Advanced search Help

Search: PubMed
((complete blood count) AND osteopontin) AND dog Search Clear

See the search details.

No items found.

NCBI Resources How To

PubMed.gov
U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

Search: PubMed
RSS Save search Limits Advanced search Help

Search: PubMed
((Osteopontin) AND dog) AND tumors Search Clear

Display Settings: Summary, Sorted by Recently Added

Results: 2

- [The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors.](#)

1. Klopffleisch R, Klose P, Gruber AD.
Vet Pathol. 2010 May;47(3):446-54. Epub 2010 Apr 7.
PMID: 20375427 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)
- [Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases.](#)

2. Loukopoulos P, O'Brien T, Ghoddusi M, Mungall BA, Robinson WF.
Res Vet Sci. 2004 Oct;77(2):131-41.
PMID: 15196903 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)