

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

**ANÁLISE PROGNÓSTICA DA IMUNOEXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA NO
MICROAMBIENTE DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS ESPORÁDICOS DE
CADELAS**

LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção
do título de mestre em Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

BOTUCATU/SP

2013

LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO

**ANÁLISE PROGNÓSTICA DA IMUNOEXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA NO
MICROAMBIENTE DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS ESPORÁDICOS DE
CADELAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção
do título de mestre em Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

BOTUCATU/SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Monteiro, Lidianne Narducci.

Análise prognóstica da imunoexpressão de osteopontina no microambiente dos carcinomas mamários esporádicos de cadelas. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 40105008

1. Mamas – Câncer. 2. Cão - Doenças. 3. Câncer em cão. 4. Fosforilação.
5. Proteínas – Análise. 6. Glicoproteínas.

Palavras-chave: Cão; EGFR; HER2; MAPK; tumores mamários.

Dedicatória

À Deus, criador de todas as coisas

Aos meus pais, Joacy e Maria de Lurdes, pelo amor e incentivo

Dedico

Agradecimentos

*Agradeço à **Deus**, em primeiro lugar, por tudo que tem feito em minha vida, por me permitires chegar até aqui e me amparar nos momentos de dificuldade e me mostrar os caminhos nas horas incertas, pelo ar que respiro, pelos dons que me deste.*

*Agradeço à minha orientadora **Noeme Sousa Rocha** pela oportunidade, por acreditar em mim e aos ensinamentos passados, que com certeza me fizeram crescer muito.*

*Ao meu coorientador **Professor Deilson Elgui de Oliveira**, agradeço pelo apoio e colaboração neste projeto.*

*Aos Professores do Serviço de Patologia Veterinária, **Julio Lopes Sequeira e Renée Laufer Amorim**, que me acompanharam desde a residência e são parte fundamental na minha formação, obrigada por acreditarem no meu potencial.*

*À Professora e amiga **Louisiane de Carvalho Nunes**, agradeço por me apresentar à Patologia, por ser um exemplo de determinação e força, pelos ensinamentos e especialmente pela amizade, confiança e apoio durante esses anos.*

*À professora **Isabella Villena Martins**, minha primeira orientadora, obrigada pela amizade, pelo incentivo e pelos ensinamentos.*

*À professora **Fátima Gartner** e aos amigos da Universidade do Porto, **Irina Amorin, Celia Lopes e Fátima Carvalho** pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados.*

*Ao Dr. **Rafael Malagoli e Juliana Gadum de Lalla** pelo auxílio na análise estatística.*

*Aos funcionários da pós-graduação FMB/UNESP, em especial à secretária **Vânia Soler** e à coordenadora do programa de Patologia Professora **Márcia Guimarães da***

*Silva, e aos funcionários da pós-graduação FMVZ/UNESP, em especial **José Roberto de Lalla**, por toda prestatividade e auxílio durante meu mestrado..*

*Aos **membros do Departamento de Anatomia Patológica** - Hospital A.C. Camargo/Fundação Antônio Prudente, por todo o auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos funcionários do Serviço de Patologia, **Maury Raul, Claudinei Domingues, Maria Valéria M. Dalanezi e Noel Melo**, muitíssimo obrigada pela ajuda, pelos momentos de descontração, por todo incentivo e pela amizade.*

*.Aos residentes do Serviço de Patologia, **Priscila E. Kobayashi, Diogo Zanoni e Cláudia Cordioli**, e aos residentes da Ornitopatologia, **João Zamae e Milena Coppola**, pelos conhecimentos compartilhados e pela agradável convivência.*

*Aos pós-graduandos **Isabelle Ferreira, Francisco Pedraza, Maurício Montoya, Carlos Eduardo Fonseca, Cynthia Viana, Hugo Orsini, Ana Angelita S. Baptista, Taís Donato, Rafael Torres, Pedro Pinczowski, Ana Paula Masseno, Camila Dias Porto, Anita Menconi, Ticiane Rocha, Érica M. Terra, Elisane Milbradt, Paulo O. Bersano e Rodolfo Frankson**, agradeço pelo agradável convívio e troca de conhecimentos que tanto nos engrandece.*

*Aos pós-graduandos que me acompanharam desde a residência, **Didier Quevedo Cagnini, Arita Cremasco, Freddi Bardella de Souza e Fabrizio Grandi**, agradeço especialmente pelos conhecimentos compartilhados, pelo apoio e pelo convívio durante esses anos, vocês são parte especial da minha formação.*

Aos pós-graduandos **Raquel Beneton Ferioli, Gabriela Daniel, Marcela Marcondes, Luciano Fonseca e Mariana Marras Vidale** pela companhia divertida e agradável!

À pós-graduanda **Márcia Moleta Colodel**, agradeço pelas coletas das amostras e apoio na execução deste trabalho.

As minhas amigas-irmãs **Lalá, Thai e Carol**, não tenho palavras pra agradecer, obrigada pela amizade sincera, pelo amparo nos momentos difíceis e pelas boas gargalhadas, vocês foram minha família aqui e vou levá-las sempre comigo!

Aos amigos não menos queridos **Renata (Alfs), Aline e João Marcelo**, obrigada pela amizade e por todos os momentos bons compartilhados, e aos queridos **Fezinha, João Carlos e Margarete** por terem me acolhido de forma tão carinhosa.

Aos meus amigos de longa data **Leonita, Cida e Diego**, amigos especiais que mesmo distante sempre me apoiaram e estiveram presentes nessa jornada.

Ao meu cunhado **Rumenick** e sua família nas pessoas de **Edna, Amarildo, Cristiane e Vô**, obrigada pela amizade e apoio.

À minha segunda família **Elme, Victor, Angel, José, Ellen e vó Branca**, obrigada por me receberem com tanto carinho.

À minhas tias-mães **tia Cida, tia Deli e tia Bel**, obrigada por tudo, pelo incentivo, por todo carinho e cuidado que sempre tiveram comigo, e aos meus tios **tio Pedro, Antero e tio Daniel** pelo apoio.

Agradeço de forma especial aos tios **Luis, Dedê, Bingo e Ângela**, por todo cuidado e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus primos-irmãos **Manu, Mari, João Victor e Dani**, obrigada por sempre estarem presentes na minha vida, vocês são parte essencial dela.

À minha **vó Madalena e vô Domingos**, obrigada pelo exemplo de vida, por todo carinho e todo amor que sempre tiveram comigo, são meu porto seguro!

À minha irmã **Lorennna**, não tenho palavras para agradecer, obrigada por sempre estar do meu lado, por toda cumplicidade, por me ajudar a suportar os momentos difíceis e por todos os momentos bons vividos, e principalmente pelas gargalhadas juntas. Te amo!

Agradeço de modo muito especial ao meu pai **Joacy** e à minha mãe **Maria de Lurdes**, responsáveis por mais essa conquista, obrigada pelo amor incondicional e dedicação que sempre tiveram comigo, por sempre batalharem pra que eu pudesse chegar até aqui, e por acreditarem nos meus sonhos e na minha capacidade, sem vocês nada disso seria possível. E quero agradecer aqui de forma mais que especial à minha mãe, uma guerreira, batalhadora, exemplo de vida, de superação e força. Amo vocês!

Ao meu amor, amigo e companheiro **Breno**, por todo amor, carinho, dedicação e cuidado que sempre teve comigo, é parte essencial na minha vida. Obrigada por ter me apoiado sempre durante toda essa etapa, pelo auxílio na execução deste projeto, pela orientação e pelo cuidado pra que tudo desse certo. Te amo infinitamente!

Agradeço aos meus amorzinhos, **Shiva, Valente, Malhado, Pitico e Roni**, e especialmente aos tinenéns **Tetela-málinda! e Amarelo-meu príncipe**, por me fazerem rir sempre!

Ao **Thor** (in memorian), meu eterno filhote e companheiro, mãezinha te ama!

*Ao **Nick**, muito mais que meu cão, meu companheirinho e amigo fiel, amor incondicional. Lili te ama!*

*Aos cães e **proprietários** que participaram deste projeto, minha gratidão.*

*À **FAPESP** e **CAPES**, pelo auxílio financeiro para a execução deste projeto.*

À todos que não citei, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Sinceramente.

**Quando se sonha sozinho é apenas um sonho.
Quando se sonha juntos é o começo da realidade.**

D. Quixote

"O Guerreiro da Luz se vê, de vez em quando, andando pelas ruas sem qualquer destino. Nestes momentos, ele pensa: "Nada do que planejei esta acontecendo. Dei o melhor de mim, segui os meus sonhos, fui fiel a DEUS. Entretanto, as coisas não parecem caminhar para frente, meus esforços não estão sendo recompensados. DEUS parece que está surdo porque ele não escuta minha voz", diz o guerreiro, com uma certa amargura na voz. Neste momento, a melhor coisa que ele deve fazer é sentar-se num bar e pedir um café. Depois de alguns momentos, ele irá ele irá entender que o tempo de DEUS não é seu próprio tempo. Em algum lugar do Universo, milhares de anjos estão se movendo e caminhando para ajudar todos aqueles que seguem seu coração. "

Paulo Coelho

O Guerreiro da Luz

RESUMO

A osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína secretável que tem sido relacionada com diferentes processos fisiológicos e de doença nos seres humanos. Sabe-se que a OPN está relacionada com a progressão neoplásica e metástase em diversos cânceres humanos, porém esta relação ainda é pouco explorada na literatura veterinária. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de osteopontina nos carcinomas mamários caninos e sua relação com biomarcadores tumorais bem estabelecidos nessas neoplasias. Para isso, a expressão de OPN, EGFR, HER2 e c-Kit foi avaliada em conjunto com a análise da taxa de Ki67 em 43 carcinomas mamários provenientes de cadelas diferentes. Demonstrou-se que a expressão acentuada de OPN está relacionada com a expressão de EGFR ($P < 0.001$) e com a superexpressão de HER2 ($P = 0.012$). Em conclusão, a osteopontina aparenta estar relacionada com prognóstico ruim e ativação da via MAPK, este último fato podendo implicar na futura utilização de tratamentos baseados em drogas direcionadas para esta via de sinalização particular nas neoplasias mamárias de cadelas com expressão acentuada de osteopontina.

Palavras-chave: EGFR, HER2, MAPK, tumores mamários, cão.

ABSTRACT

Osteopontin (OPN) is a secreted glycoposphoprotein that has been implicated in a number of different normal physiologic and pathologic processes in humans. OPN is known to be involved in the progression and metastasis of various humans cancers, but this relation is still little explored in the veterinary literature. The aim of this study was to evaluate the expression of osteopontin in canine mammary carcinomas and its relation with well established canine mammary tumor biomarkers. For that, the expression of OPN, EGFR, HER2, and c-Kit were evaluated along with Ki67 rate in 43 mammary carcinomas from different female dogs. OPN was demonstrated to be expressed by neoplastic epithelial cells in all carcinomas as well as in stromal cells from the tumor microenvironment. Relation between OPN high expression and EGFR positivity ($P < 0.001$) and high HER2 expression ($P = 0.012$) was demonstrated. In conclusion, osteopontin seems to be related to poor prognosis and MAPK pathway activation, the latter a feature that could imply in the future use of treatments with drugs directed against this particular signaling pathway in highly OPN expressing canine mammary tumors.

Keywords: EGFR, HER2, MAPK, mammary tumors, dog.

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

MANUSCRITO

Table 1. Antibodies used in the immunohistochemical study	44
Table 2 – Relation between OPN immunostaining in neoplastic cells and other markers in canine mammary carcinoma.....	50
Figure 1. Osteopontin immunoexpression in canine mammary neoplasms. A) intermediate osteopontin immunoexpression ; B) High osteopontin immunoexpression. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 20µm).....	47
Figure 2. A –B) Osteopontin positive stromal cells, including inflammatory cells, can be observed within the neoplastic microenvironment. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 50µm).....	48
Figure 3. More intense OPN expression can be observed in necrotic areas (asterisk). DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 200µm)	49
Figure 4. Osteopontin positive macrophages. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 20µm).....	49
Figure 5. Osteopontin expression in normal (asterisk) tissue, neoplastic foci (arrows) and invasive tumors borders (arrowhead) (bar = 100µm).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR - taxa de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas

CD44 – grupamento de diferenciação 44

CK5- citoqueratina 5

EGF - fator de crescimento epidérmico

EGFR – receptor de fator de crescimento epidérmico1

erbB1- receptor de fator de crescimento epidérmico1

erbB2- receptor de fator de crescimento epidérmico2

erbB3- receptor de fator de crescimento epidérmico3

erbB4- receptor de fator de crescimento epidérmico4

HER-1 - receptor de fator de crescimento epidérmico 1

HER-2 – receptor de fator de crescimento epidérmico 2

HER3- receptor de fator de crescimento epidérmico 3

HER4- receptor de fator de crescimento epidérmico 4

HGF - fator de crescimento de hepatócitos

IHC - imunoistoquímica

MAPK – via de sinalização intracelular da quinase protéica ativada por mitógeno

ME – matriz extracelular

MMP – metaloproteinase

MMP – metaloproteinase 2

NF- κ B – fator nuclear kappa

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPN – osteopontina

PKC – proteína quinase C

RE – receptor de estrógeno

RGD - arginina-glicina-asparagina

RNA – ácido ribonucléico

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

RTK – receptor tirosina quinase

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com a transcriptase reversa

SIBLING - família das glicoproteínas pequenas ligantes de integrina ligada ao N

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

uPA- fator do ativador de plasminogênio tipo uroquinase

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
REVISÃO DA LITERATURA	2
1- NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS: ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS, PROGNÓSTICOS E BIOMARCADORES	3
1.1-Apresentação clínica e diagnóstico	3
1.2-Fatores prognósticos	5
1.3-Biomarcadores.....	7
2- POTENCIAIS NOVOS BIOMARCADORES: OSTEOPONTINA	9
2.1-OPN e a progressão tumoral	13
2.1.1-Adesão celular e proliferação.....	14
2.1.2-Invasão e remodelamento da matriz extracelular.....	15
2.1.3-Inflamação e evasão.....	15
2.1.4-Neoangiogênese	16
2.2-A OPN e o câncer de mama	17
3-REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2	38
MANUSCRITO.....	39
CONCLUSÕES GERAIS	60
ANEXOS	62

Capítulo 1

Revisão da Literatura

1. NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS: ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS, PROGNÓSTICO E BIOMARCADORES

1.1 Apresentação clínica e diagnóstico

Em cães, as neoplasias mamárias esporádicas representam as neoplasias que mais afetam as cadelas, constituindo cerca de 50% de todas as neoplasias nessa espécie, dos quais cerca de 60% são benignas e 40% malignas (Brodey *et al.*, 1983; Kurzman e Gilbertson, 1986; Misdorp, 2002). A incidência dessas neoplasias em cadelas é aproximadamente três vezes maior do que nas mulheres (Brodey *et al.*, 1983).

Os tumores malignos de glândula mamária afetam principalmente as cadelas com idade entre os nove e 11 anos, e um aumento na incidência é observado a partir dos seis anos de idade (Fowler *et al.*, 1974; Alenza *et al.*, 2000; Zatloukal *et al.*, 2005). O desenvolvimento de tumores em cadelas antes dos cinco anos de idade é raro, e quando ocorrem, geralmente são de natureza benigna (Alenza *et al.*, 2000). É descrito que cães de raças puras, reconhecidamente os das categorias *spaniel* e *pointer*, e cães da raça *daschund*, aparentemente são predispostos ao seu desenvolvimento (Rutteman *et al.*, 2001; Misdorp, 2002; Zatloukal *et al.*, 2005).

A apresentação clínica das neoplasias mamárias é variável: apresentam-se como nódulos únicos ou múltiplos, de tamanhos e consistência variáveis, que podem afetar uma única glândula mamária ou várias simultaneamente. Os tumores podem ser aderidos ou não aos planos muscular e epitelial, e também podem apresentar ulceração da pele ou reação inflamatória local (Kurzman e Gilbertson, 1986; Misdorp *et al.*, 1999).

A ocorrência de múltiplos tumores mamários sincrônicos é comum e podem representar neoplasias primárias independentes uma das outras com diferentes tipos histogênicos, por isso recomenda-se que todos os tumores sejam biopsiados de modo a determinar sua malignidade (Fowler *et al.*, 1974; Misdorp *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2009), já que a biópsia excisional é o método de diagnóstico recomendado para os tumores mamários caninos (Cassali *et al.*, 2011).

O exame citológico pode ser utilizado como um método adicional, e tem sido aplicado ao diagnóstico de lesões da glândula mamária em cães, mostrando uma boa acurácia diagnóstica, com uma correlação em torno de 70% entre o diagnóstico estabelecido no exame citológico e o diagnóstico histológico (Zuccari *et al.*, 2001; Simeonov e Stoikov, 2006; Sangha *et al.*, 2011). O exame citológico também pode ser utilizado para excluir diagnósticos diferenciais como mastite, lipomas e mastocitomas, dentre outros, além da inspeção de linfonodos regionais para a detecção de possíveis metástases (Cassali *et al.*, 2011). Mas devido às limitações da técnica, a confirmação do diagnóstico e a classificação da neoplasia exigem o exame histológico (Simeonov e Stoikov, 2006; Sangha *et al.*, 2011). A histopatologia permite que se realize uma análise morfológica mais detalhada, assim como a análise de pleomorfismos celulares, grau de diferenciação, índice mitótico e margens cirúrgicas (Misdorp *et al.*, 1999).

Apesar da remoção cirúrgica, o prognóstico para cães com tumores malignos é reservado. Até 48% dos cães tratados cirurgicamente morrem ou são sacrificados no prazo de um ano de sua cirurgia por causa da recorrência do tumor ou pela ocorrência de metástases (Fowler *et al.*, 1974). Tendo em vista a alta taxa de ocorrência das neoplasias mamárias, o aparecimento e crescimento rápidos, e a escassez de estatísticas de sobrevida, vários estudos têm avaliado diversos fatores com significado prognóstico em cães com tumores mamários. No entanto o comportamento biológico dos tumores

mamários caninos continua difícil de prever, e por isso, estudos de fatores prognósticos mais precisos são necessários para identificar pacientes com alto risco de recorrência da doença e de morte (Graham e Myers, 1999).

1.2 Fatores prognósticos

A análise dos fatores prognósticos tem por objetivo prever de forma mais acurada possível o comportamento biológico das neoplasias mamárias, e são importantes na tomada de decisões relacionadas ao tratamento e procedimentos relevantes à qualidade de vida do animal. Diversos estudos têm reconhecido alguns fatores prognósticos para as neoplasias mamárias, dentre eles o tamanho do tumor, tipo e grau histológico, e acometimento de linfonodos (Misdorp e Hart, 1976; Misdorp *et al.*, 1999).

O tamanho do tumor é considerado um fator prognóstico independente nas neoplasias mamárias de cadelas (Yamagami *et al.*, 1996, Ferreira *et al.*, 2009). Tumores com dimensões de até três centímetros estão diretamente relacionados com um melhor prognóstico em relação àqueles de dimensões maiores. Este parâmetro pode ser facilmente obtido durante o exame clínico do paciente e deve ser considerado na tomada de decisão sobre o tratamento a ser estabelecido (Sorenmo, 2003).

Além do tamanho tumoral, o padrão de crescimento também é importante como característica determinante do prognóstico. Assim, tumores com crescimento invasivo, infiltrando tecidos subjacentes à ele, e de grandes dimensões estão relacionados a um prognóstico ruim. O tamanho do tumor (T), a avaliação dos linfonodos (N) e de metástases distantes (M) são critérios utilizados para o estabelecimento do prognóstico e estadiamento clínico (Alenza *et al.*, 2000). Esse sistema, denominado TNM foi estabelecido pela OMS - Organização Mundial de Saúde

(*World Health Organization* – WHO) para o estadiamento clínico das neoplasias mamárias em cadelas (Owen, 1980). A determinação do estágio clínico permite a definição da extensão do tumor, e consequentemente, permite que um prognóstico seja estabelecido e o tratamento seja planejado (Sobin e Wittekind, 1997).

O histotipo e o grau de diferenciação histológica também são reconhecidos como importantes fatores prognósticos. Os sarcomas são descritos como os tumores com pior prognóstico comparado com aqueles de origem epitelial, com exceção dos carcinomas inflamatórios (Hellmén *et al.*, 1993). Os sarcomas mamários primários se comportam como sarcomas de alto grau e são associados com metástases precoces por via hematogêna e alta incidência de recorrência local (Misdorp *et al.*, 1999). Os carcinomas sólidos têm sido relacionados com uma menor sobrevida do que os carcinomas tubulopapilares (Bostock, 1975). De acordo com a classificação histológica descrita pela OMS, o comportamento biológico da neoplasia corresponde ao grau de diferenciação histológica, havendo comportamento mais agressivo a partir de carcinomas não invasores (carcinoma *in situ*) até carcinomas complexos, passando por carcinomas simples, tubulopapilares, sólidos, até carcinomas anaplásicos (Misdorp *et al.*, 1999).

A graduação histológica também tem grande importância prognóstica nas neoplasias mamárias, pois permite avaliar a arquitetura da neoplasia e a morfologia dos núcleos, e posteriormente o grau histológico, que apresenta uma correlação significativa com a agressividade do tumor (Elston e Ellis, 1991). Portanto, a graduação histológica dos tumores determinada pelo sistema Nottingham e modificado por Elston e Ellis (1998), representa uma ferramenta sensível que pode ser incorporada na rotina veterinária.

Outras características anatomopatológicas também podem estar associadas com um prognóstico reservado a ruim, como infiltração estromal (Itoh *et al.*, 2008), ausência de resposta inflamatória (Estrela-Lima *et al.*, 2010) taxa de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) (Kumar *et al.*, 2010) e microdensidade vascular (Graham *et al.*, 1999).

1.3 Biomarcadores

Embora diversas proteínas tenham sido identificadas por serem diferencialmente expressas entre grandes grupos de tumores benignos e malignos, a detecção imunoistoquímica de biomarcadores ainda não se tornou uma rotina no diagnóstico de neoplasias mamárias caninas. Uma vez que mudanças genéticas podem estar associadas com diversos tipos de câncer, a expressão de diversos genes e as proteínas originadas a partir destes têm sido determinada de modo a detectar associações com o aumento na agressividade e um pior prognóstico. Recentemente, observa-se crescente aumento na busca por marcadores prognósticos para as neoplasias mamárias na cadela, incluindo aqueles de proliferação celular (Matos *et al.*, 2006; Penã *et al.*, 1998), receptores hormonais (Martín de las Mulas *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2000), p53 (Lee *et al.*, 2004) e receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) (Martin de las Mulas *et al.*, 2003) e ainda moléculas de adesão celular (Gama *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2007).

O papel dos hormônios esteróides, estrógeno e progesterona, na patogênese dos carcinomas mamários da cadela é bem estabelecido. Esses receptores estão presentes em altas proporções nas mamas normais e nos tumores benignos comparado aos tumores malignos (Rutteman *et al.*, 1988), e nos sítios metastáticos os receptores geralmente são negativos (Alenza *et al.*, 2000). Assim, acredita-se que existe uma relação inversa entre o número de receptores hormonais e a capacidade proliferativa das células neoplásicas

(Cassali, 2000; Geraldles *et al.*, 2000). Este fato é importante uma vez que neoplasias com altos índices de proliferação celular possuem um comportamento clínico mais agressivo e risco aumentado de metástase (Nieto *et al.*, 2000; Dutra *et al.*, 2008). Nos cães, resultados semelhantes aos descritos em mulheres foram observados em termos de aumento da expressão de Ki67 nos tumores malignos, particularmente nas neoplasias menos diferenciadas (Cassali, 2000).

A neoangiogênese tem sido descrita como um indicador prognóstico independente e altamente significativo em mulheres com câncer de mama (Weidner *et al.*, 1991; Weidner *et al.*, 1992; Bosari *et al.*, 1992). Nas cadelas, há uma correlação significativa entre o aumento do número microvasos (microdensidade vascular) nas neoplasias mamárias e a presença de metástases (Weidner *et al.*, 1991; Graham e Myers, 1999). Outras investigações concluíram que a densidade de microvasos em tumores de mama mostrou uma correlação significativa com intervalos livres de doença e tempo de sobrevida (Weidner *et al.*, 1992; Bosari *et al.*, 1992).

A família de receptores erbB compreende quatro membros, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, também conhecido como erbB-1/HER-1), erbB-2/Neu/HER-2, erbB-3/HER-3 e erbB-4/HER-4, que pertencem a classe tipo I de receptores tirosina quinase (RTK). Eles desempenham um papel importante na mediação de sinalização de fatores de crescimento (Yarden e Sliwkowski, 2001). A sinalização anormal destas vias resulta em proliferação celular desregulada, evasão de apoptose, angiogênese, migração e metástase (Eccles *et al.*, 1995). Vários estudos demonstram que a superexpressão da proteína HER-2 se correlaciona com menor sobrevida, fenótipo de maior agressividade e de prognóstico ruim em mulheres com câncer de mama (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2003). As neoplasias mamárias de cadelas superexpressas para HER-2 geralmente estão associadas com indicadores bem

estabelecidos de prognóstico ruim, como maior tamanho tumoral, grau histológico elevado, invasão e altas taxas proliferativas (Martín de las Mulas *et al.*, 2003; Gama *et al.*, 2008). Entretanto, a superexpressão de HER2 nos carcinomas mamários caninos ainda não está totalmente clara (Gama *et al.*, 2008).

Na mulher, foram identificados subtipos moleculares em carcinomas mamários a partir do perfil de expressão de alguns genes, e estes subtipos se diferem quanto ao seu comportamento biológico e desfecho clínico (Perou *et al.*, 2000, Sorlie *et al.*, 2001). Os subtipos foram estabelecidos por meio da técnica de microarranjos de acordo com grupos de perfis de expressão gênica, a saber: subtipo luminal A e luminal B, que expressam receptor de estrógeno (RE), sendo que o subtipo luminal A geralmente apresenta baixo grau de agressividade com bom prognóstico, e luminal B, de alto grau de agressividade e possui prognóstico reservado; subtipos basal-símile, que não expressam RE e possuem prognóstico ruim; subtipos que apresentam superexpressão do gene *erbB2* ou da proteína gerada a partir deste – o receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2), que também possuem prognóstico ruim (Morris, 2010).

Na cadela, Gama e colaboradores (2008) também identificaram subtipos fenotípicos distintos utilizando um painel imunohistoquímico, que inclui os marcadores moleculares ER, HER2, CK5, p63 e Caderina-P, e baseados na classificação molecular da expressão de ER/HER2 os grupos foram classificados em: luminal A (ER+/HER2–), luminal B (ER+/HER2+), basal-símile (ER–/HER2–) que foi considerado o subtipo com o comportamento clínico mais agressivo e superexpressão de HER2 (ER–/HER2+).

2. POTENCIAIS NOVOS BIOMARCADORES: OSTEOPONTINA

Uma das melhores estratégias de combate ao câncer é o diagnóstico precoce e administração de tratamento eficaz (Etzioni *et al.*, 2003). Outra abordagem inclui um controle rigoroso do paciente após o tratamento inicial (geralmente a cirurgia) para detectar possíveis recidivas precocemente e em seguida, prescrever uma terapia adicional (Rodrigues *et al.*, 2007). Para tal, biomarcadores do câncer estabelecidos previamente são utilizados para monitorar a condição do paciente que apresenta a neoplasia.

Na medicina veterinária, novos biomarcadores são necessários para melhorar ainda mais a capacidade dos profissionais para avaliar o prognóstico, já que a neoplasia mamária em cadelas é um dos tumores diagnosticados com maior frequência e representam um problema de grande impacto na prática veterinária mundial e é assunto preocupante tanto para oncologistas quanto patologistas veterinários.

Recentemente, o uso de biomarcadores tumorais para prever os padrões futuros da doença tem sido uma questão emergente, especialmente pelos avanços positivos no tratamento do câncer nos últimos anos. Neste contexto, a osteopontina (OPN) constitui um possível biomarcador, pois tem sido demonstrado seu papel funcional na progressão e malignidade das neoplasias em humanos (Rodrigues *et al.*, 2007). A OPN é considerada uma molécula que faz mediação na comunicação célula-matriz e célula-célula, e em muitos casos, essa comunicação resulta na adesão ou orienta a migração celular (Weber e Cantor, 1996).

Observou-se que a OPN desempenha diferentes papéis em diversos processos de desenvolvimento e diferenciação de tecidos, incluindo a glândula mamária (Rittling e Novick, 1997) e osso (Yamate *et al.*, 1997), bem como na reparação de feridas (Liaw *et al.*, 1998). Além disso, já é conhecido o seu envolvimento na resposta inflamatória, a remodelação vascular e mineralização/calcificação (Tuck e Chambers, 2001; Wai e

Kuo, 2004). A OPN também tem sido implicada numa variedade de processos patológicos, tais como septicemia e resposta inflamatória (incluindo inflamação granulomatosa) para uma variedade de agentes diferentes, reparação de fraturas, regulação da formação de cálculos e de mineralizações mamárias e renais, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (Tuck e Chambers, 2001; Wai e Kuo, 2004). Além disso, a OPN tem sido associada a processos neoplásicos de diferentes origens (Sodek et al., 2000; Tuck e Chambers, 2001; Weber, 2001; Wai e Kuo, 2004; Tuck et al., 2007; Cho et al. 2009; Shevde et al., 2010) . Nos últimos anos, diversos estudos têm dado atenção para a expressão de OPN nas células neoplásicas e também no microambiente tumoral (Anborgh et al., 2010).

A OPN é uma glicofosfoproteína encontrada em todos os fluidos corporais, componentes da matriz extracelular (ME) e matrizes proteináceas de tecidos mineralizados (Zohar et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Sodek et al., 2002; Furger et al., 2001; Weber, 2001). Em conjunto com a sialoproteína óssea, proteína da matriz dentinária I, sialofosfoproteína da dentina e fosfoglicoproteína da matriz extracelular, a OPN forma a família das glicoproteínas pequenas ligantes de integrina ligadas ao N (*small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein* - SIBLING) (Fisher et al., 2001), que pode tanto modular o comportamento celular por mecanismos autócrinos e parácrinos, como pela sua interação com receptores de superfície celular tais como as integrinas (Bellahcène et al., 2008).

A OPN contém diversos domínios de ligação celular, sendo particularmente evidenciados aqueles com afinidade pelas integrinas, tais como $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ e $\alpha 9\beta$. Essas proteínas são as maiores proteínas transmembrânicas que atuam na cascata de adesão (em conjunto com CD44), por meio de mecanismos RGD (arginina-glicina-asparagina) dependentes e independentes (Fisher

et al., 2001; Wai e Kuo 2004; Rodrigues *et al.*, 2007; Tuck et al., 2007; Bellahcène *et al.*, 2008). A sequência RGD facilita as interações RGD-dependentes com os receptores de integrina e media as sinalizações/ligações celulares (Sodek, 2000; Denhardt *et al.*, 2001). Normalmente as células aderem à OPN via integrinas e, mesmo interagindo com um número diferente de integrinas via sequência RGD, o que melhor caracteriza o receptor de OPN é a integrina $\alpha v \beta 3$, a qual facilita a adesão da OPN mediada por RGD para células neoplásicas (Senger *et al.*, 1995; Senger *et al.*, 1996).

A OPN intracelular é parte integrante de um complexo de ligação ácido hialurônico-CD44-ERM (ezrina/radixina/moesina), complexo envolvido na fixação dos fibroblastos, macrófagos, e a migração de células de tumorais, o que sugere que OPN estimula ou participa na atividade mitogênica das células (Zohar *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Sodek *et al.*, 2002). A família CD44 inclui várias isorformas da proteína, codificadas por um único agente e gerada por *splicing* alternativo, e várias dessas isoformas tem-se mostrado superexpressos em células malignas (Ponta *et al.*, 1998; Goodison *et al.*, 1999).

Essas interações da OPN com os diversos receptores de superfície celular pode induzir a ativação de várias vias de transdução de sinal, resultando em mudanças na expressão de uma série de genes e proteínas que contribuem para o comportamento de células alteradas, incluindo a migração e invasão. Esse efeitos da OPN provavelmente variam entre os tipos celulares, dependendo, por exemplo, de qual integrina é expressada e qual via de sinalização pode ser ativada (Rodrigues *et al.*, 2007; Anborgh *et al.*, 2010).

No homem, uma grande variedade de tipos celulares expressa a OPN. A OPN pode ser produzida pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, urinário e reprodutivo, além da vesícula urinária, pâncreas, brônquios, mama lactante, glândula

salivar, ductos de glândulas salivares (Brown, *et al.* 1992), células do ouvido interno (Sodek *et al.*, 2000), osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, células musculares lisas, células do sistema nervoso (neurônios, células da glia e do neurilema – Schwann) (Wai e Kuo, 2004; Rangaswami *et al.*, 2006; Wai e Kuo, 2008) e células do sistema imunitário ativadas (linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, linfócitos *natural killer* e células de Kupffer) (Patarca *et al.*, 1989; Santana e Rosenstein, 2003; Wai e Kuo, 2004; Xu *et al.*, 2005; Rangaswami *et al.* 2006; Wai e Kuo, 2008) e fibroblastos do estroma embrionário (Liaw *et al.*, 1998). A OPN também foi detectada em secreções de alguns órgãos como os rins (Shiraga *et al.*, 1992; Yagisawa *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2002), tireóide (Castellone *et al.*, 2004), útero (Yagisawa *et al.*, 1998), placenta e testículos (Siiteri *et al.*, 1995; Luedtke *et al.*, 2002), leite e sangue (Senger *et al.*, 1989; Senger *et al.*, 1988), fluido seminal e bile (Wai e Kuo, 2004; Rangaswami *et al.*, 2006).

A expressão da OPN nas células tumorais tem sido mostrada também em uma grande variedade de tumores (Brown *et al.*, 1994; Coppola *et al.*, 2004) incluindo o carcinoma mamário (Tuck *et al.*, 1998), neoplasias prostáticas (Hotte *et al.*, 2002), colônicas (Agrawal *et al.*, 2002), dos ovários (Bao *et al.*, 2007), gástricas (Imano *et al.*, 2009), hepáticas (Ye *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010) e pulmonares (Chambers *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2011), além de mesoteliomas (Pass *et al.*, 2005), carcinomas de células escamosas cutâneas (Chien *et al.*, 2009), sarcomas (Sulzbacher *et al.*, 2002) e mieloma múltiplo (Saeki *et al.*, 2003).

A expressão de OPN nas neoplasias nos seres humanos foi inicialmente demonstrada por Brown e colaboradores em diversos tipos de carcinomas (Brown *et al.*, 1992), e o seu potencial para prever o prognóstico foi primeiramente descrito por Chambers e colaboradores (1996). A associação da OPN com a progressão tumoral nas neoplasias mamárias da mulher foi descrita por Tuck e colaboradores (1997), que

sugeriram que a OPN, tanto nas células tumorais quanto avaliada como presente no plasma, pode ser considerada um marcador prognóstico nas neoplasias mamárias nas mulheres. Ademais, seus níveis elevados no tumor primário podem predizer um futuro desenvolvimento de metástases. Esses resultados sugerem que a superexpressão de OPN pode representar um evento molecular chave na progressão tumoral e metástase, particularmente na mama da mulher (Rodrigues *et al.*, 2007).

2.1 OPN e progressão tumoral

A progressão do tumor implica uma sequência de eventos que confere uma vantagem de sobrevivência de células transformadas. Estes eventos começam com a transformação neoplásica e continuam através da subversão de bloqueios de proliferação, restrição de crescimento, barreiras físicas e sistemas de defesa do hospedeiro. A sobrevivência das células tumorais requer a proliferação e interação com a matriz extracelular a fim de proporcionar espaço para seu crescimento, vias para o acesso de nutrientes e de fuga das células para um novo ambiente. Ainda, a progressão bem sucedida também envolve respostas celulares e evasão da vigilância imune (Bellahcène *et al.*, 2008). As interações entre a OPN, células inflamatórias/sistema imunitário e o microambiente provavelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão do tumor (Anborgh *et al.*, 2010).

2.1.1 Adesão celular e proliferação

As células tumorais se ligam a OPN e a seus fragmentos proteolíticos através de uma variedade de receptores de integrina, tanto por interações RGD-dependentes quanto independentes, e também podem interagir com variantes específicos de CD44 que podem ser expressas pelas células tumorais (Bellahcène *et al.*, 2008). Em um

estudo realizado por Lee e colaboradores (2007), observou-se que a OPN ligada ao CD44 resulta na propagação de sinais citoplasmáticos que aumentam a ativação das integrinas e, assim, a migração de células da linhagem HT29 em neoplasias de cólon. As células tumorais podem ser estimuladas a se propagarem após a interação do CD44 e OPN provavelmente através de integrinas, as quais têm funções bem caracterizadas na célula permitindo a adesão (Katagiri *et al.*, 1999).

A resposta proliferativa induzida pela OPN pode ocorrer através da ativação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e seu receptor Met, e sinalização de Ca^{+2} intracelular mediado por integrinas (Tuck *et al.*, 2007; Bellahcène *et al.*, 2008). Essas interações da OPN com as vias de receptor de crescimento podem influenciar no comportamento das células do tumor. A migração de células tumorais também pode ser influenciada pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e seu receptor, Met. Além disso, a via HGF foi recentemente relacionada à aderência e invasão de células tumorais (Trusolino *et al.*, 2000; Tuck *et al.*, 2000). Luo e colaboradores (2011) demonstraram que a OPN promove a proliferação e sobrevivência celular de queratinócitos pré-neoplásicos através de receptores celulares CD44 e ativação da via MAPK, sugerindo que a OPN derivada do estroma tumoral têm grande importância na tumorigênese.

2.1.2 Invasão e remodelamento da matriz extracelular

A capacidade de invasão depende que as células tumorais tornem-se providas de alta motilidade e aumentem a expressão de proteases que remodelam a matriz extracelular (Thompson e Price, 2002). As integrinas presentes em diversas localidades são capazes de interagir com diversos receptores de membrana, por exemplo, o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (*urokinase-type plasminogen activator* - uPA). A uPA, como outras enzimas expressas por células tumorais, podem contribuir com o

fenótipo maligno através da degradação dos componentes da matriz extracelular favorecendo a migração e invasão, ou também pela ativação de outras proteases (Furger *et al.*, 2001).

Em vários tipos celulares a OPN foi capaz de induzir a expressão e atividade de proteases, como os membros da família das metaloproteinases de matriz (MMP), que podem contribuir para o processo de metástase por meio de múltiplos mecanismos (Chambers e Matrisian, 1997; Teti *et al.*, 1998, Bendeck *et al.*, 2000). A MMP2 é capaz de degradar vários componentes da ME e se correlaciona com a capacidade de invasão e metástase (Nagase *et al.*, 1992).

2.1.3 Inflamação e evasão

As atividades biológicas conhecidas da OPN apoiam o seu papel na ocorrência do processo de metástase para o tecido ósseo e também a outros órgãos, provavelmente influenciado pelas células do microambiente neoplásico que estão intimamente associados com sítios neoplásicos primários e metastáticos (Bellahcène *et al.*, 2008). A OPN também tem mostrado um importante papel no câncer ao aumentar a sobrevivência de diversos tipos celulares através de interações com diferentes sistemas de defesa do hospedeiro. O grupo de células que passa por esse processo inclui células neoplásicas, células endoteliais vasculares e células do sistema imunitário associadas ao tumor, sendo que os efeitos pró-sobrevivência podem ter influências conflitantes no crescimento e na agressividade do tumor. Isso acontece, por exemplo, nas ocasiões nas quais a OPN indiretamente favorece a sobrevivência de células tumorais por meio da ligação com macrófagos, os quais podem ter sua produção de óxido nítrico alterada devido à interações entre a OPN e integrina $\alpha\beta3$ (Denhardt e Chambers, 1994; Denhardt e Guo, 1993; Bellahcène *et al.*, 2008). Assim, a OPN produzida pelas células

tumorais pode promover uma evasão ao sistema imunitário ao tornar deficiente a produção de óxido nítrico pelas células por vezes passíveis de realizar o combate às células neoplásicas/alteradas (Denhart e Chambers, 1994; Feng *et al.*, 1995).

A OPN é secretada por leucócitos ativados, como macrófagos e linfócitos T (Weber *et al.*, 1996) e também funciona como uma fator quimiotático para macrófagos (Giachelli *et al.*, 1998), células dendríticas (Lee *et al.*, 2007) e neutrófilos (Koh *et al.*, 2007). Possivelmente a expressão da OPN pelos tumores promove o crescimento do tumor promovido pela inflamação e culmine na progressão, por exemplo, pela atuação de macrófagos e de neutrófilos no microambiente neoplásico. As células do tumor que secretam OPN podem induzir um quadro de inflamação crônica, a qual pode acelerar o processo de transformação e a progressão do tumor (Feng *et al.*, 1995; Rittling *et al.*, 2002; Bellahcène *et al.*, 2008).

2.1.4 Neoangiogênese

Um estudo recente demonstrou que a OPN desencadeia o crescimento de neoplasias mamárias por meio da ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da indução de neoangiogênese por meio de mecanismos autócrinos e parácrinos (Chakraborty *et al.*, 2008). As integrinas $\alpha\beta3$ medeiam a migração de células endoteliais ativadas durante a formação de novos vasos (Liaw *et al.*, 1995). É também possível que a modulação da atividade de proteases gere fragmentos bioativos de componentes da ME responsáveis pela neoangiogênese (Cui *et al.*, 2007). A OPN tem demonstrado ser eficaz na proteção de células endoteliais contra o fenômeno de apoptose, sendo que este efeito pode ser mediado pela ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa B (*nuclear factor-kappa B* - NF- κ B) (Scatena *et al.*, 1998). Ademais, a proliferação e a capacidade de invasão mediada pela expressão de OPN estão ligados a

ocorrência de *splicing* alternativo, gerando diferentes subtipos de OPN, a dizer OPN-a, OPN-b e OPN-c; a OPN-b pode afetar a proliferação celular, enquanto a OPN-c apresenta uma forte correlação com o comportamento invasivo por parte das células neoplásicas (Zhao *et al.*, 2011).

Mirza e colaboradores (2008) analisaram amostras de neoplasias mamárias e tecido mamário normal em mulheres por meio da utilização de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), verificando que o RNAm de OPN-c é expresso em neoplasia mamárias, porém o mesmo não é expresso nos tecidos mamários normais. Adicionalmente, os níveis de OPN-c se mostram relacionados com a graduação histológica do tumor. As características supracitadas fazem com que a OPN-c seja, consequentemente, um marcador candidato para avaliação do potencial invasivo de tumores da mama, fato este que poderia abrir precedentes para a intuição de novas abordagens diagnósticas.

2.2 A OPN e o câncer de mama

Embora os mecanismos exatos ainda não tenham sido elucidados, a OPN tem sido associada ao desenvolvimento da glândula mamária normal e na sua diferenciação (Tuck e Chambers, 2001). Estudos recentes têm abordado o padrão de expressão e o possível papel de OPN no desenvolvimento da glândula mamária normal. Rittling e Novick (1997) examinaram o padrão de expressão da OPN em glândulas mamárias de ratas em diferentes estádios de desenvolvimento pós-natal. Os autores deste estudo descobriram que enquanto a OPN é expressa em níveis baixos a moderados nas glândulas mamárias de ratas não-prenhes e prenhes, os níveis de OPN são mais altos na glândula mamária em lactação desses animais.

Na glândula mamária neoplásica, por sua vez, a OPN afeta o comportamento das células neoplásicas de diversas maneiras, tanto *in vivo* como *in vitro* (Tuck e Chambers, 2001). Os trabalhos de Brown e colaboradores (Brown *et al.*, 1994) e Bellahcène e Castronovo (1995), estabeleceram que, em geral, maiores níveis de mRNA ou da proteína OPN, respectivamente, são normalmente encontrados em neoplasias mamárias e outros tipos de tumor do que nos seus correspondentes tecidos normais, e alterações do crescimento e diferenciação celular que não neoplasias. Além de estar presente nos componentes celulares do tecido, a OPN encontra-se também presente em associação com calcificações (Bellahcène e Castronovo, 1995). Embora tenha sido inicialmente sugerido que OPN presente no tumor seja fornecida primariamente pelas células inflamatórias associadas ao tumor (principalmente macrófagos e linfócitos T) (Bellahcène e Castronovo, 1995) e secundariamente absorvido pelas células neoplásicas, vários estudos posteriores demonstraram que as células do carcinoma de mama em si também sintetizam a OPN (Tuck e Chambers, 2001).

Na mulher, a expressão de osteopontina normalmente é ausente ou baixa em tecidos normais, entretanto é superexpressa em epitélios pré-neoplásicos e neoplásicos (Senger *et al.*, 1988; Agrawal *et al.*, 2002; Senger *et al.*, 1985), incluindo os da glândula mamária (Rudland *et al.*, 2002).

Alguns autores determinam como os níveis de OPN em tecido tumoral e plasma/soro correlacionam-se com o prognóstico e sobrevida em uma variedade de neoplasias (Tuck *et al.*, 2007; Wai e Kuo 2008). Nas neoplasias mamárias da mulher, a expressão elevada de OPN, no plasma ou mesmo no tumor, tem sido associada com menor sobrevida. Em um estudo abordando 333 pacientes com câncer de mama (linfonodos negativos e positivos para metástase), a imunoexpressão para OPN foi

negativamente correlacionada com a sobrevida (Rudland *et al.*, 2002). Tem sido mostrado também que as metástases linfonodais são mais comuns nas neoplasias mamárias com expressão de OPN positiva do que naqueles com ausência de expressão de OPN.

Em mulheres normais, os níveis plasmáticos de OPN, analisados quantitativamente através de ELISA, não apresentaram influências hormonais do ciclo menstrual (Bautista *et al.*, 1996), assim, diversos estudos posteriores foram conduzidos a fim de quantificar a OPN no sangue de pacientes com neoplasias mamárias. Em estudo realizado por Singhal e colaboradores (1997), foi constatado que os níveis de OPN no plasma de mulheres com neoplasias mamárias metastáticas foram significativamente mais elevados em relação a mulheres saudáveis ou mulheres que inicialmente foram submetidas a tratamento da neoplasia mamária primária. Além disso, verificou-se que níveis mais altos de OPN estavam associados com menor sobrevida e com maior número de sítios metastáticos. Estes dados sugerem que os níveis plasmáticos da OPN também podem funcionar como um indicador de possível doença metastática. Em outro estudo, a análise seriada da OPN, mensurada nos momentos iniciais do diagnóstico e durante a evolução da doença revelou aumento nos níveis plasmáticos de OPN ao longo do tempo, confirmando que os níveis plasmáticos de OPN podem funcionar como indicadores prognósticos para a sobrevida no câncer de mama da mulher (Bramwell *et al.*, 2006).

Como descrito anteriormente, a OPN pode influenciar no potencial de invasividade de células neoplásicas e na ocorrência de metástases (Brown *et al.*, 1994). Finak e colaboradores (2008) relataram a ativação de genes ligados a angiogênese, hipóxia e resposta de macrófagos associados ao tumor de OPN no estroma de neoplasias mamárias associadas a pior prognóstico, embora Rodrigues e colaboradores (2009) não

tenham encontrado nenhuma relação entre a expressão da OPN no estroma em neoplasias mamárias na mulher com parâmetros clínicopatológicos.

Na cadela, a OPN produzida pelas células e depositada na ME já foi identificada no osso e na cartilagem normais de cães (Schnapper e Meyer, 2004), e Klopffleisch e colaboradores (2010) analisaram o perfil de expressão gênica por meio da utilização de RT-PCR para avaliar a expressão de 49 genes de 10 neoplasias benignas e 13 neoplasias malignas metastáticas caninas, porém não foi observada diferenças na expressão da OPN nos grupos testados.

Contudo, ainda não existem estudos sobre o padrão de imunoexpressão da OPN nas neoplasias mamárias da cadela e, como existem similaridades entre as neoplasias de mama na cadela e na mulher, novas pesquisas devem ser desenvolvidas nesta área a fim de esclarecer o papel da OPN nesse grupo de neoplasias.

REFERÊNCIAS

1. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ . Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* . 2002; 94(7):513–521.
2. Alenza P, Peña L, Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract*. 2000; 41: 287-291.
3. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Role of the metastasis promoting protein osteopontin in the tumor microenvironment. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(8):2037–2044
4. Bao LH, Sakaguchi H, Fujimoto J, Tamaya T. Osteopontin in metastatic lesions as a prognostic marker in ovarian cancers. *J Biomed Sci*. 2007; 14(3):373–381.
5. Bautista DS, Sand Z, Chambers AF, Tonkin KS, O'Malley, FP, Singhal H, Tokmakejian S, Bramwell V, Harris JF. Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin. Biochem*. 1996; 29: 231-239.
6. Bellahcène A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontina, two matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol*. 1995; 146: 95-100.
7. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KUE, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 212–26.
8. Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, Smith L, Mulholland D, Horton M, Giachelli CM. Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via $\alpha_v\beta_3$ integrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1467 – 72.

9. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantification and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol.* 1992; 23:755–761.
10. Bostock E. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. *Eur J Cancer.* 1975; 11:389-396.
11. Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, Wilson SM, Tonkin KS, Tomiak A, Perera F, Vandenberg TA, Chambers AF. Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(11 Pt 1):3337 -3343.
12. Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983; 19:61–90.
13. Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzo CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell.* 1992; 3:1169 – 80.
14. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol.* 1994; 145(3):610–623.
15. Cassali GD. Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. (2000). 73 f. (Doutorado) - Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
16. Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz J Vet Pathol.* 2011; 4(2):153-180.

17. Castellone MD, Celetti A, Guarino V, Cirafici AM, Basolo F, Giannini R, Medico E, Kruhoffer M, et al. Autocrine stimulation by osteopontin plays a pivotal role in the expression of the mitogenic and invasive phenotype of RET/PTC- transformed thyroid cells. *Oncogene*. 2004; 23: 2188-2196.
18. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1260 – 70.
19. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer*. 1996; 15(3):311–323.
20. Chakraborty G, Jain S, Patil TV, Kundu GC. Down regulation of osteopontin attenuates breast tumour progression in vivo. *J Cell Mol Med*. 2008; 12 (6a): 2305-18.
21. Chen RX, Xia YH, Xue TC, Zhang H, Ye SJ.2. Down-regulation of osteopontin inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving MMP-2 and uPA. *Oncol Rep*. 2011; 25(3):803–808.
22. Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CH, Chen CM, Huang CC. Comprehensive study on the prognostic role of osteopontin expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2009; 45(9):798–802.
23. Cho HJ, Cho HJ, Kim HS. Osteopontin: A multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep*. 2009; 11(3):206–213.
24. Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(1 Pt 1):184–190.

25. Cui R, Takanashi F, Ohashi R, Gu T, Yoshioka M, Nishio K, Ohe Y, et al. Abrogation of the interaction between osteopontin and $\alpha v\beta 3$ integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice. *Lung Cancer*. 2007; 57(3):302-310.
26. Denhardt DT, Chambers AF. Overcoming obstacles to metastasis-defenses against host defenses: osteopontin (OPN) as a shield against attack by cytotoxic host cells. *J Cell Biochem*. 1994;56:48 – 51.
27. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J*. 1993; 7:1475 – 82.
28. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001;107:1055 – 61.
29. Dutra AP, Azevedo Jr. GM, Schmitt F, Cassali GD. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 2008; 60:1403-1412.
30. Eccles SA, Modjtahedi H, Box G, Court W, Sandle J, Dean CJ. Significance of the c-erbB family of receptor tyrosine kinases in metastatic cancer and their potential as targets for immunotherapy. *Invasion Metastasis*. 1994–1995; 14:337–348.
31. Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. Elston CW, Ellis IO. (Ed.). *Systemic Pathology. The breast*. London: Churchill Livingstone. 1998; 365-384.
32. Elston CW., Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol*. 1991; 19:403-410.

33. Estrela-Lima A, Araújo MSS, Costa-Neto JM, et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*. 2010; 256.
34. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. *Nat Ver Cancer* .2003; 3:243 – 52.
35. Feng B, Rollo EE, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme. *Clin Exp Metastasis*. 1995; 13:453 – 62.
36. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2009; 7:230-235.
37. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallet M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*. 2008; 14: 518-27.
38. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280: 460–465.
39. Fowler EH, Wilson GP, Koester A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenic classification. *Vet Pathol*. 1974; 11: 212-229.

40. Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med.* 2001;1:621 – 32.
41. Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch.* 2008; 453:123-132.
42. Geraldles M, Gärtner F., Schmitt F. An immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet. Rec.* 2000;146: 403-406.
43. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol.* 1998; 152:353 – 8.
44. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *J Clin Pathol.* 1999; 52:189 – 96.
45. Graham JC, Myers RK. The Prognostic Significance of Angiogenesis in Canine Mammary Tumors. *J Vet Intern Med.* 1999; 13:416–418.
46. Hellmén E, Bergström R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol.* 1993; 30:20-27.
47. Hotte SJ, Winkquist EW, Stitt L, Wilson SM, Chambers AF. Plasma osteopontin: associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer.* 2002; 95(3):506–512.
48. Imano M, Satou T, Itoh T, Sakai K, Ishimaru E, Yasuda A, Peng YF, Shinkai M, Akai F, Yasuda T, Imamoto H, Okuno K, Ito H, Shiozaki H, Ohyanagi H.

- Immunohistochemical expres-sion of osteopontin in gastric cancer. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13 (9):1577–1582.
49. Itoh T, Uchida K, Kushima K, et al. Relationship between tumor size and histological invasiveness as prognostic indicators of canine mammary epithelial tumors. *Jpn J Vet Anesth Surg.* 2008; 38:53-57.
 50. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. CD44 variants but not CD44s cooperate h1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 1999; 59:219 – 26.
 51. Khan SR, Jonson JM, Peck AB, Cornelius JG, Glenton PA. Expression of osteopontina in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol.* 2002; 168(3): 1173-81.
 52. Klopfleisch R, Klose P, Gruber AD. The Combined Expression Pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 Discriminates Malignant From Benign Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol.* 2010; 47(3); 446-454.
 53. Koh A, da Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Lee H, Glogauer M, Sodek J, Zohar R. Role of osteopontin in neutrophil fuction. *Immunology.* 2007; 122(4):466-75.
 54. Kumar P, Kumar R, Pawaiya RS, et al. Diagnostic significance of mitotic índex and AgNOR count in canine mammary tumours. *Braz J Vet Pathol.* 2010; 3:41-45.
 55. Kurzman ID, Gilbertson SR. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1986; 1:25-32.

56. Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci.* 2004; 5:63–69.
57. Lee JL, Wang MJ, Sudhir PR, Chen GD, Chi CW, Chen JY. Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and outside-out mechanisms: OPN-CD44v interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 2089.
58. Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest.* 1998; 101:1468 – 78.
59. Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM. Osteopontin and h3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro .*Circ Res.* 1995; 77:665 – 72.
60. Lin F, Li Y, Cao J, Fan S, Wen J, Zhu G, Du H, Liang Y. Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma and its relationships with metastasis, invasion of tumor cells. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(8): 5205-10.
61. Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, Hermo L. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biol Reprod.* 2002; 66:1437-1448.
62. Luo X, Ruhland MK, Pazolli E, Lind AC, Stewart SA. Osteopontin stimulates preneoplastic cellular proliferation through activation of the MAPK pathway. *Mol Cancer Res* 2011; 9:1018-1029.

63. Martín de las Mulas J, Millán Y, Dios R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol.* 2005; 42:200–212.
64. Martín de las Mulas J, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 80:363-367.
65. Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carvalheira JG, dos Santos MS, Rutteman GR, Gartner F. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Res.* 2006; 26:1821–1826.
66. Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carvalheira JG, Rutteman GR, Gärtner MF. E-cadherin, beta-catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. *APMIS.* 2007; 115:327–334.
67. Mirza M, Shaughnessy E, Hurley JK, Vanpatten KA, Pestano GA, He B, Weber GF. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *Int J Cancer.* 2008; 122(4): 889-897.
68. Misdorp W, Else W, Hellmen E. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. WHO International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. 2^a ed. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology; 1999.
69. Misdorp W, Hart AA. Prognostic factors in canine mammary cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1976; 56:779–786.

70. Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 2002. 575-606.
71. Morris JS. Improving the diagnosis and treatment of canine mammary tumours: Immunohistochemical markers as prognostic tools. Vet J. 2010; 184:3-4.
72. Nagase H, Suzuki K, Morodomi T, Enghild JJ, Salvesen G. Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. Matrix Suppl. 1992; 1: 237-244.
73. Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathological associations and prognostic significance. Vet Pathol. 2000; 37:239–247.
74. Owen LN. TNM classification of tumors of domestic animals. Geneva: World Health Organization; 1980.
75. Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. N Engl J Med. 2005; 353(15):1564–1573.
76. Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC, Jerrells TR, Cantor H. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T celldependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. J Exp Med. 1989; 170:145 – 61.
77. Peña L, Nieto A, Perez-Alenza MD, et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. J Vet Diagn Invest. 1998;10:237–246.

78. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747–752.
79. Ponta H, Wainwright D, Herrlich P. The CD44 protein family. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30:299 – 305.
80. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol*. 2006; 16: 79–87.
81. Rittling SR, Chen Y, Feng F, Wu Y. Tumor-derived osteopontin is soluble, not matrix associated. *J Biol Chem*. 2002; 277(11):9175–9182.
82. Rittling SR, Novick KE. Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis. *Cell Growth Differ*. 1997; 8:1061–1069.
83. Rodrigues LR, Lopes N, Sousa B, Vieira D, Milanezi F, Paulsson M, Lindmark-Månsson H, Teixeira JÁ, Schmitt F. Significance of Osteopontin Expression in Human Invasive Breast Tumour Stroma. *Open Breast Cancer J*. 2009; 1: 1-9.
84. Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt F, Paulsson M, Lindmark- Månsson H. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16(6): 1-11.
85. Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, Rudland SS, Barraclough R, Winstanley JHR, Howitt R, West C. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res*. 2002; 62:3417 – 27.
86. Rutteman GR, Misdorp W, Blankensteni NMA, Van Den Brom WE. Oestrogen and progestin receptors in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in nonmalignant and malignant states. *Breast Cancer*. 1988; 58:594-599.

87. Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. Small animal clinical oncology. 3ª edição. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 445–477.
88. Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Kitayama H, Mizuki M, Katada Y, Asaoku H, Kitano M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Uede T, Kawase I. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol*. 2003; 123(2):263–270.
89. Sangha S, Singh A, Sood NK, Gupta K. Specificity and Sensitivity of Cytological Techniques for Rapid Diagnosis of Neoplastic and Non-neoplastic Lesions of Canine Mammary Gland. *Braz J Vet Pathol*. 2011; 4(1): 13-22.
90. Santana MA, Rosenstein Y. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol*. 2003; 195: 392 – 401.
91. Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F. and Giachelli, C.M. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J. Cell Biol*. 1998; 141:1083-1093.
92. Schnapper A, Meyer W. Osteopontin Distribution in the Canine Skeleton during Growth and Structural Maturation. *Cells Tiss Org*. 2004;178:158–167.
93. Senger DR, Brown LF, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van de Water L. Osteopontin at the tumor/host interface. Functional regulation by thrombin-cleavage and consequences for cell adhesion. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 760:83 – 100.

94. Senger DR, Perruzzi CA. Cell migration promoted by a potent GRGDS-containing thrombin-cleavage fragment of osteopontin. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1314:13 – 24.
95. Senger DR, Perruzzi CA, Gracey CF, Papadopoulos A, Tenen DG. Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res*. 1988; 48:5770-4.
96. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A. Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res*. 1989; 9:1291 – 9
97. Senger DR, Perruzzi CA. Secreted phosphoprotein markers for neoplastic transformation of human epithelial and fibroblastic cells. *Cancer Res*. 1985; 45:5818 – 23.
98. Shevde LA, Das S, Clark DW, Samant RS. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr Mol Med*. 2010;. 10:71-81.
99. Shiraga H, Min W, Vandusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrel CH, Sherbotie JR, Foreman JW, Przysiecki C, Neilson EG, et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci .US A*.1992; 89:426-30.
100. Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev*. 1995; 40:16-28.
101. Simeonov R., Stoikov D. Study the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. *Bulg J Vet Med*. 2006; 9 (3): 211-219.

102. Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF. Elevated Plasma Osteopontin in Metastatic Breast Cancer Associated with Increased Tumor Burden and Decreased Survival. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 605-11.
103. Sobin L, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 5. ed. New York: Wiley-Liss; 1997.
104. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11: 279 – 303.
105. Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M. Novel Functions of the extracellular matrix proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Conn Tiss Res.* 2002; 43(2-3): 308-319.
106. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Rijn MV, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2001; 98:10869–10874.
107. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2003; 100:8418–8423.
108. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003; 33 (3): 573-596.
109. Sorenmo K, Kristiansen VM, Cofone MF, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J, Goldschmidt MH. Canine mammary

- gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 2009;7:162-172.
110. Sulzbacher I, Birner P, Trieb K, Lang S, Chott A. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. *Virchows Arch.* 2002; 441(4):345–349.
 111. Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CAG, Sodek J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Min Res.* 2002; 17(8): 1486-1497.
 112. Teti A, Farina AR, Villanova I, Tiberio A, Tacconelli A, Sciortino G, Chambers AF, Gulino A, Mackay AR. Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides is RGD and cell shape change dependent. *Int J Cancer.* 1998; 77:82-93.
 113. Thompson EW, Price JT. Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy. 2002; 6(2): 217-233.
 114. Tuck AB, Chambers AF, Allan AL. Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. *J Cell Biochem.* 2007; 102(4):859–868.
 115. Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001; 6:419–429.
 116. Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers F. Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (Met). 2000; 78(3):465-475.

117. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer*. 1998;79(5):502–508.
118. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Tonkin KS, Harris JF, Bautista D, Chambers AF. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1997; 121:578 – 84.
119. Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Andò M, Bertotti A, Comoglio PM, Boccaccio C. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *FASEB J*. 2000; 14: 1629 – 40.
120. Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer*. 1998; 79:127 – 32.
121. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2008; 27(1):103-18.
122. Wai PY, Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*. 2004; 121(2):228–241.
123. Weber GF, Ashkar S, Cantor H. Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997; 109:1– 9.
124. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 1996; 271:509-512.
125. Weber GF, Cantor H. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1996; 7:241 – 8.

126. Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2001;552:61 – 85.
127. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(24):1875–1887.
128. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1–8.
129. Xu G, Nie H, Li N, Zheng W, Zhang D, Feng G, Ni L, Xu R, Hong J, Zhang J Z. J. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis. *Clin Invest*. 2005; 115:1060-1067.
130. Yagisawa T, Chandhoke PS, Fan J, Lucia S. Renal osteopontin expression in experimental urolithiasis. *J Endourol*. 1998; 12(2): 171-6.
131. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on the TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci*. 1996; 58:1079–83.
132. Yamate T, Mochizuki H, Taguchi Y, Igietsme JU, Manolagas SC, Abe E. Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: Demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology*. 1997; 138:3047–3055.
133. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the erbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:127–137.
134. Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, Simon R, Li Y, Robles AI, Chen Y, Ma ZC, Wu ZQ, Ye SL, Liu YK, Tang ZY, Wang XW. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene

- expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2003; 9(4):416–423.
135. Zaidan Dagli ML. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook. *Vet J.* 2008; 177:3–5.
136. Zatloukal J, Lorenzová J, Tichy F, Necas, Kecová H, Kohout P. Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. *J Acta Vet Brno.* 2005; 74: 103-109.
137. Zhang J, Takahashi K, Takahashi F, Shimizu K, Ohshita F, Kameda Y, Maeda K, Nishio K, Fukuchi Y. Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett.* 2001; 171(2):215–222.
138. Zhao B, Sun T, Meng F, Qu A, Li C, Shen H, Jin Y, Li W. Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137(7): 1061-1070.
139. Zuccari D, Santana A, Rocha NS. Fine needle aspiration cytologic and histologic correlation in canine mammary tumors. *Braz J Vet Res Anim Scien.* 2001; 38: 38-41.
140. Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, Arora P, Glogauer M, McCulloch CA, Sodek J. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol.* 2000; 184:118-130.

Capítulo 2

Manuscrita

Relation between osteopontin, EGFR, and HER2 expression in canine mammary carcinomas

Lidianne Narducci Monteiro^{1,2}, Breno Souza Salgado¹, Deilson Elgui de Oliveira¹, Noeme S. Rocha^{1,2}

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ. Estadual Paulista (Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University) – UNESP. Botucatu, Brazil.

²Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista (Investigative and Comparative Pathology Laboratory, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University) – UNESP. Botucatu, Brazil.

Corresponding author

Lidianne Narducci Monteiro. Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Univ. Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo, Brazil. ZIP Code: 18618-970. Telephone/fax: +55 14 3880 2064. E-mail: lidinarducci@hotmail.com

*Manuscrito modelo redigido para submissão para periódico científico. As figuras e as tabelas estão dispostas ao longo do texto de modo a facilitar a compreensão do mesmo.

ABSTRACT

Osteopontin (OPN) is a secreted glycoposphoprotein that has been implicated in different physiologic and pathologic processes in humans. OPN is known to be involved in progression and metastasis of various humans cancers, but this relation is still little explored in the veterinary literature. The aim of this study was to evaluate the expression of osteopontin in canine mammary carcinomas and its relation with well established canine mammary tumor biomarkers. For that, expression of OPN, EGFR, HER2, and c-Kit were evaluated along with Ki67 rate in 43 mammary carcinomas from different female dogs. OPN was demonstrated to be expressed by neoplastic epithelial cells in all carcinomas as well as in stromal cells from the tumor microenvironment. Relation between high OPN expression and EGFR positivity ($P < 0.001$) and HER2 overexpression ($P = 0.012$) was demonstrated. In conclusion, high OPN expression seems to be related to poor prognosis and MAPK pathway activation, given the association with EGFR and HER2, members of the MAPK signaling pathway. Such feature could imply in the future use of treatments with drugs directed against this particular signaling pathway in highly OPN expressing canine mammary tumors.

Keywords: EGFR, HER2, MAPK, mammary tumors, dog.

INTRODUCTION

Mammary tumors are the most prevalent neoplasms that affect intact female dogs (Lana et al., 2007), with approximately 40 to 50% being described as histologically malignant (Sorenmo, 2003). Unfortunately, the prognosis for dogs with malignant mammary tumors is guarded. Up to 48% of dogs treated surgically die or are euthanized within 1 year after surgery due to tumor recurrence or metastasis (Fowler et al., 1974). Numerous prognostic factors have been evaluated for dogs with mammary tumors and cancer biomarkers that allow the anticipation of disease outlines are desired. Despite this, there is a growing need for additional reliable molecular markers (Lacroix et al., 2002) since the biologic behavior of canine mammary neoplasms continues to be difficult to predict. Consequently, additional and more accurate prognostic aids are needed to identify patients at high risk for disease recurrence and death (Graham and Myers, 1999).

Several proteins have been identified to be differentially expressed in large groups of benign and malignant tumors, and immunohistochemical analysis of biomarkers has a key role in this evaluation. Previous studies on the supplementation of the histopathologic prognosis of the clinical outcome of canine mammary tumors showed the need for the establishment of immunohistochemical markers capable of providing useful data (Klopfleisch et al., 2010). In humans, osteopontin (OPN) – a secreted glycoposphoprotein that has been implicated in a number of different normal physiologic and pathologic processes (Tuck et al., 2007) such as increase in metastatic potential (Kadar et al, 2002) – was demonstrated to be expressed in a variety of tumors (Brown et al. 1994; Coppola et al., 2004). The mechanism of OPN overexpression and its role in human breast cancer is not clear but it was established that OPN interacts with various cell surface receptors such as EGF receptor (Yarden and Sliwkowski, 2001). EGF receptor subfamily genes encode 4 structurally related tyrosine kinase receptors (TKR): epidermal growth factor receptor (*ERBB1* gene, EGFR/HER1 protein); *ERBB2* gene, erbB2/Neu/HER2 protein; *ERBB3* gene, HER3 protein; and *ERBB4* gene, HER4 protein, all of them belonging to the type I TKR class. They play an important role in mediating growth factor signaling (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Within the repertoire of signaling molecules in the network is a family of protein kinase cascades known as mitogen-activated protein kinase modules (MAPK). These cascades

contain consecutively activated protein kinases that culminate in the activation of a multifunctional MAPK. MAPK are major pathway components that control embryogenesis, cell differentiation, cell proliferation, and cell death (PEARSON et al., 2001). As well as EGFR and HER2, the c-Kit oncoprotein – a tyrosine kinase receptor like those from the erbB family – is also said to be related to cell proliferation and differentiation (Chui et al., 1996).

There are no studies that can explain the role of OPN's immunoexpression in canine mammary tumors and its relation with proteins from the MAPK pathway. Consequently, the aim of the present study was to evaluate OPN immunoexpression in canine mammary carcinomas from 43 patients in order to assess its relation with different well established canine mammary carcinoma cancer biomarkers, including proliferation rate (Ki67 rate), expression of the MAPK pathway-related proteins EGFR and HER2, and the tyrosine kinase receptor c-KIT.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples

Canine mammary carcinomas ($n=43$) collected at the time of surgical excision by the Investigative and Comparative Pathology Laboratory, São Paulo State University, Botucatu, Brazil, were used in this study. Samples were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin wax. Sections (4 μ m thick) were obtained and stained with hematoxylin and eosin for histological examination in order to confirm mammary carcinoma diagnosis. Samples were classified using the most recent classification scheme for canine mammary tumors by the World Health Organization (Misdorp et al., 1999). Three independent pathologists (LNM, BSS, NSR) were responsible for the evaluation of tissues and diagnosis of the neoplasms.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, 3 μ m thick sections were obtained from paraffinized tissue blocks and subsequently deparaffinized and rehydrated. The primary antibodies used in this study are summarized in table 1. A polymer-based labeling system kit (NovoLink Polymer System, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) was used for detection of antigen-antibody reaction and peroxidase and protein blockages. Antigen retrieval was

carried out by heat treatment in 10mM citrate buffer, pH 6.0. After cooling (20 minutes at room temperature), sections were sequentially immersed in solutions provided by the kit according to manufacturer's instructions in order to block endogenous peroxidase activity and unspecific proteins. Then, slides were overnight incubated at 4 °C with the specific antibodies. Subsequently, 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride was used as chromogen in order to allow the visualization of antigen-antibody reaction. The slides were then counterstained using Harris's hematoxylin, dehydrated, and mounted for evaluation under light microscopy.

Table 1. Antibodies used in the immunohistochemical study

<i>Antibody</i>	<i>Clone</i>	<i>Dilution</i>	<i>Origin</i>	<i>Source</i>
Osteopontin	LFMb-14	1:50	Novocastra Laboratories, UK	Mouse
Ki67	MIB1	1:50	Dako	Mouse
CD117	104D2	1:400	Dako	Mouse
HER-2	policlonal	1:2000	Dako	Rabbit
EGFR	NCL- EGFR	1:100	Novocastra Laboratories, UK	Mouse

Immunohistochemical results evaluation

The evaluation of immunohistochemistry results was performed by three pathologists (LNM, BSS, NSR). OPN was considered positive whenever any cytoplasmic staining was observed in the neoplastic and stromal cells. The assessment of OPN expression in neoplastic cells was performed semiquantitatively using the Allred 8-unit system (Allred *et al.*, 1993). In such scoring system, tumor epithelial cells proportion score and intensity score were determined for each tumor, represented by one slide, as follows: the proportion score included the fraction of positively stained tumor cells and was as follows: 0 =none, 1= <1/ 100th; 2=1/100th to 1/10th; 3=1/10th to 1/3; 4 =1/3 to 2/3; 5= > 2/3. The estimated average staining intensity of the positive tumor cells was expressed as follows: 0 = none; 1 = weak; 2 = intermediate; 3 = strong. For statistical purposes, an OPN score of 1–3 was considered low (+1), an OPN score of 4–6 was considered intermediate (+2), and an OPN score of 7–8 was considered high(+3). OPN expression was evaluated also in peritumoral inflammatory and tumor stromal cells.

HER2 expression was evaluated according to the DakoCytomation HercepTest scoring system: 0 = no staining or membrane staining in fewer than 10% of tumor cells; 1+ = faint, barely perceptible membrane staining in more than 10% of tumor cells, the cells are stained only in part of the membrane; 2+ = weak to moderate complete membrane staining observed in more than 10% of tumor cells; and 3+ = strong, complete membrane staining in more than 10% of tumor cells. Cases were considered positive (overexpressed) for HER2 when immunostaining was characterized as 2+ or 3+. EGFR staining was classified in positive or negative, according to Dako's EGFR pharmDx interpretation manual.

For Ki67, four categories were defined, as follows: <10%, 10-25%, 26-50% and >50% of stained nuclei. For c-kit expression, the reaction product was evaluated along the cell membrane, as well as in the cytoplasm. Firstly, the quantity of immunoreactive cells was estimated according to the scheme adopted by Biermann *et al.* (2007): none; <10%; 10–75%; and >75% of the cells. The level of immunoreactivity was assessed on the basis of its predominant intensity: weak (+); moderate (++); and strong (+++). The final immunoreactive score was calculated as strong (4), when at least 75% of cells exhibited at least moderate immunoreactivity; in cases of weak immunoreactivity in <10% of all tumor cells, the final score was considered as (1). The (0) score was considered negative. The (3) score was assigned if a weak immunoreactivity was present in >75% of tumor cells or if in 10–75% tumor cells strong or moderate staining was observed. All other cases were given a score of (2).

Positive and negative controls were included in each run in order to guarantee the reliability of the assays. For OPN, canine kidney was used. Additionally, a canine mammary carcinoma already recognized as HER2 positive, a canine cutaneous mast cell tumor positive for c-Kit, and a canine cutaneous squamous cell carcinoma recognized as positive for EGFR and Ki67 were used. Rabbit and mouse IgGs (Dako, Carpinteria, CA) were used in tumor samples for negative control purposes.

Statistical analysis

Differences in proteins expression were compared using Fisher's exact test or Pearson's χ^2 test for qualitative variables and using Student's t-test or analysis of variance for continuous variables. Survival curves were estimated using Kaplan-Meier product-limit

method, and the significance of differences between survival curves was determined using the log rank test. All statistical tests were two sided, and statistical significance was accepted at the $P < 0.05$ level. All analyses were performed using the Prism GraphPad software version 5.0 (San Diego, CA).

RESULTS

Immunohistochemistry

Ctoplasmic OPN staining was consistently observed in neoplastic cells of all mammary tumors evaluated (43/43), always presenting an intermediate or high classification score (fig. 1); 12 of 43 (28%) samples showed intermediate score and 31 of 43 (72%) high score. We observed that all samples presented more than 50% of positive neoplastic cells and revealed a high score variation due to the staining intensity. The OPN positivity was seen mainly within the cytoplasm, sometimes perinuclearly or, less commonly, in a cell surface distribution in the neoplastic cells. There was no immunohistochemically negative sample for osteopontin.

A strong OPN expression was consistently observed in the epithelial component and myoepithelial cell layer, with cells showing a cytoplasmic expression pattern. The surrounding stroma was usually OPN positive, since OPN immunoexpression was also observed in tumor stromal matrix component, stromal fibroblasts, vascular endothelial cells, muscular cells, macrophages and other inflammatory cells in all samples (fig. 2). A consistent OPN immunoexpression was also observed in areas with necrosis (fig. 3), chronic inflammation (fig. 4) and on invasive tumor borders (fig. 5). We also observed a weak OPN immunoexpression in luminal mammary cells from the normal mammary tissue adjacent to neoplastic foci (fig. 5).

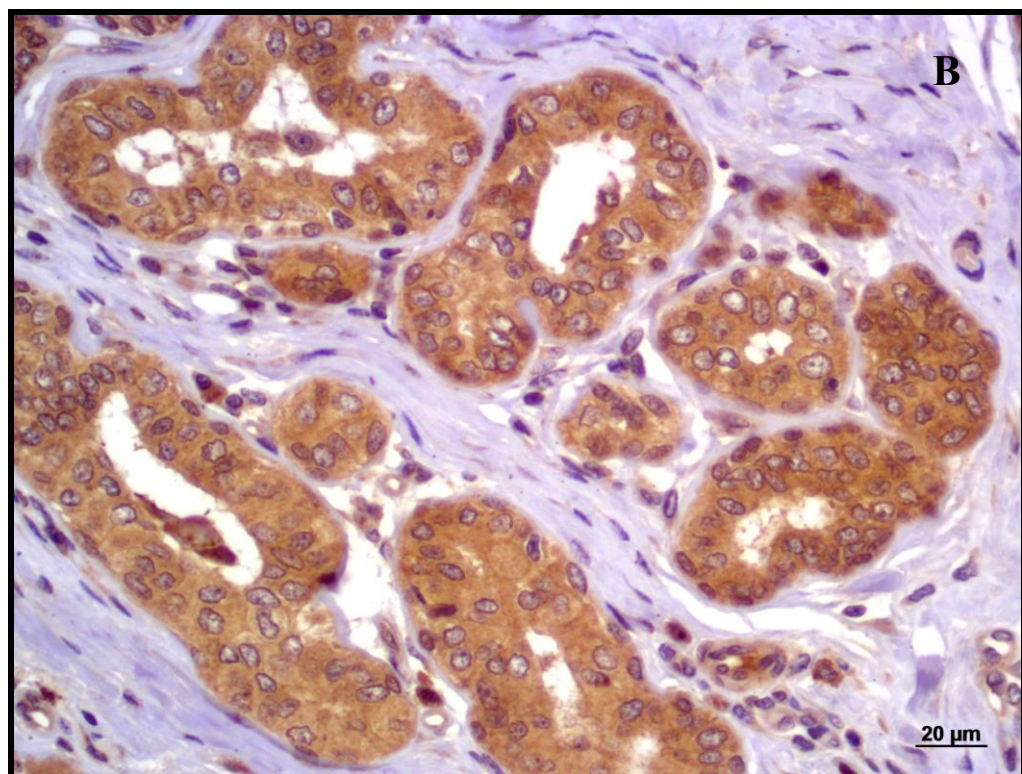
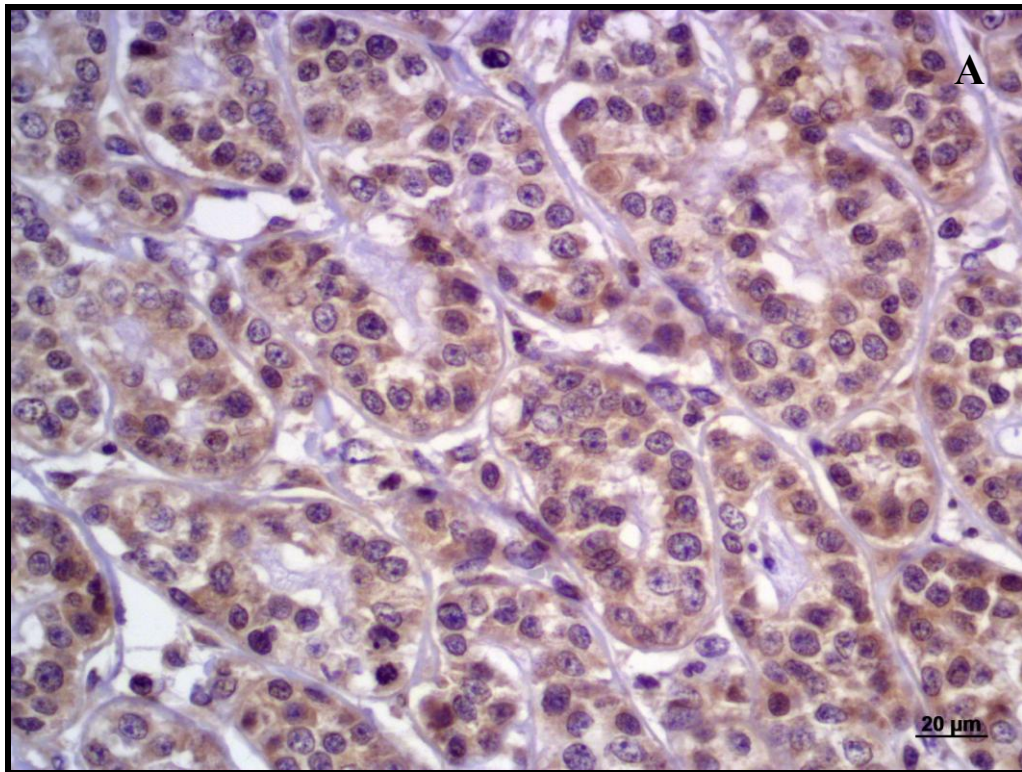


Figure 1. Osteopontin immunoexpression in canine mammary neoplasms. A) intermediate osteopontin immunoexpression ; B) High osteopontin immunoexpression. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 20μm)

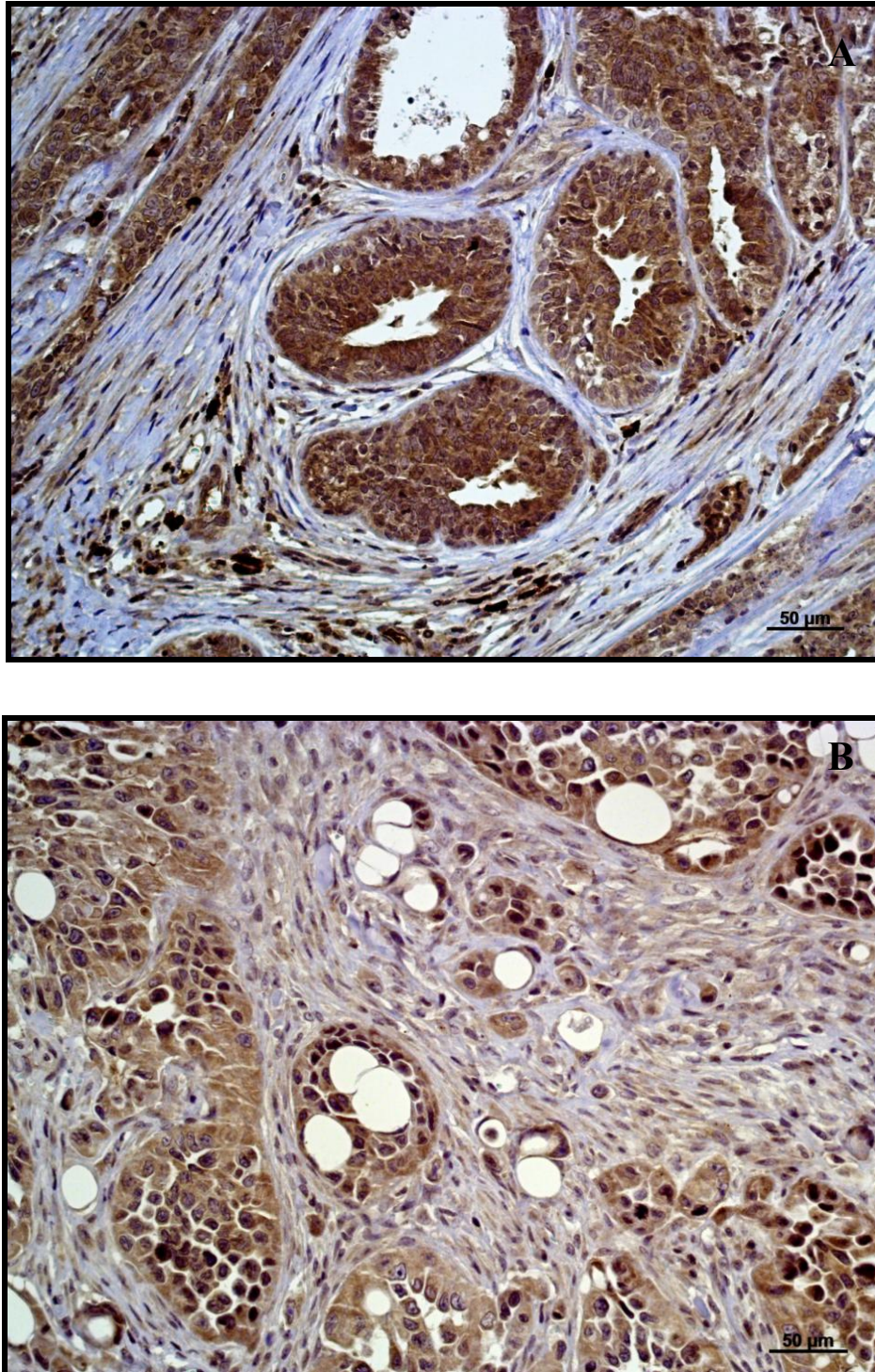


Figure 2. A – B) Osteopontin positive stromal cells, including inflammatory cells, can be observed within the neoplastic microenvironment. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 50µm)

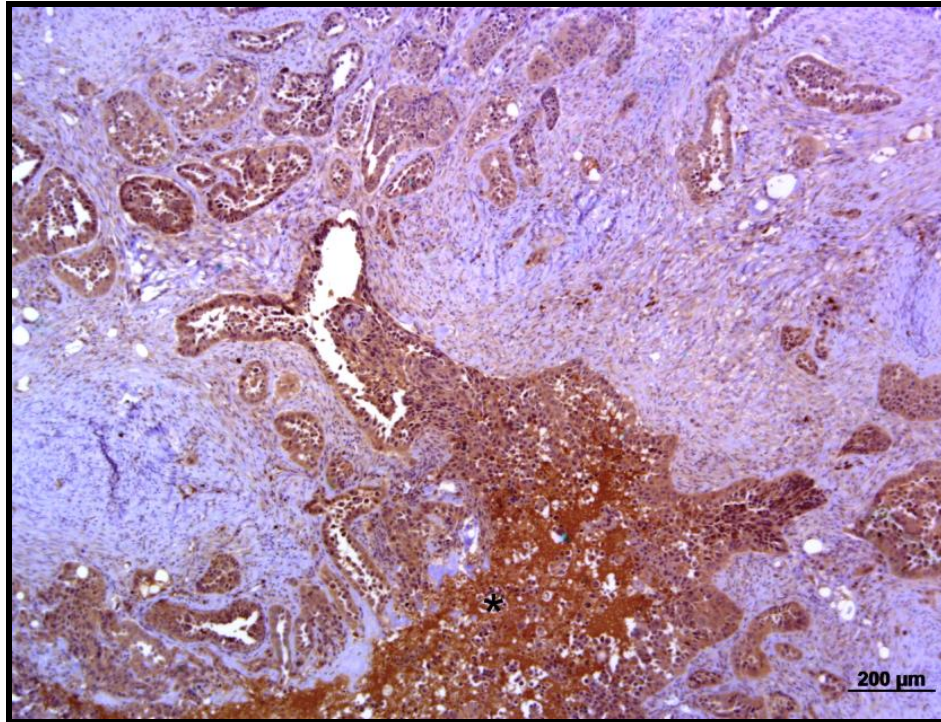


Figure 3. More intense OPN expression can be observed in necrotic areas (asterisk). DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 200μm)

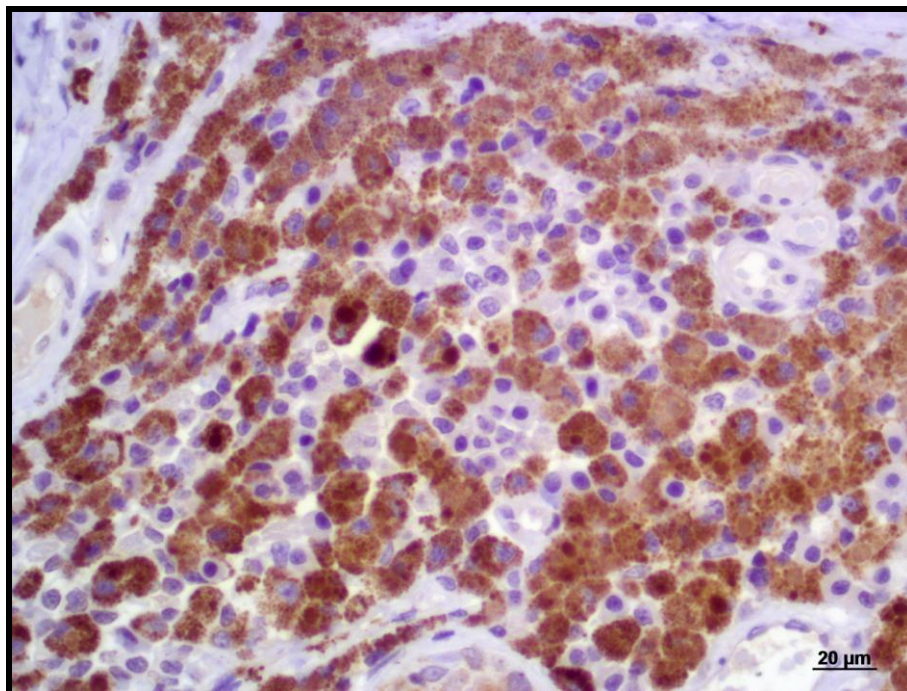


Figure 4. Osteopontin positive macrophages. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 20μm)

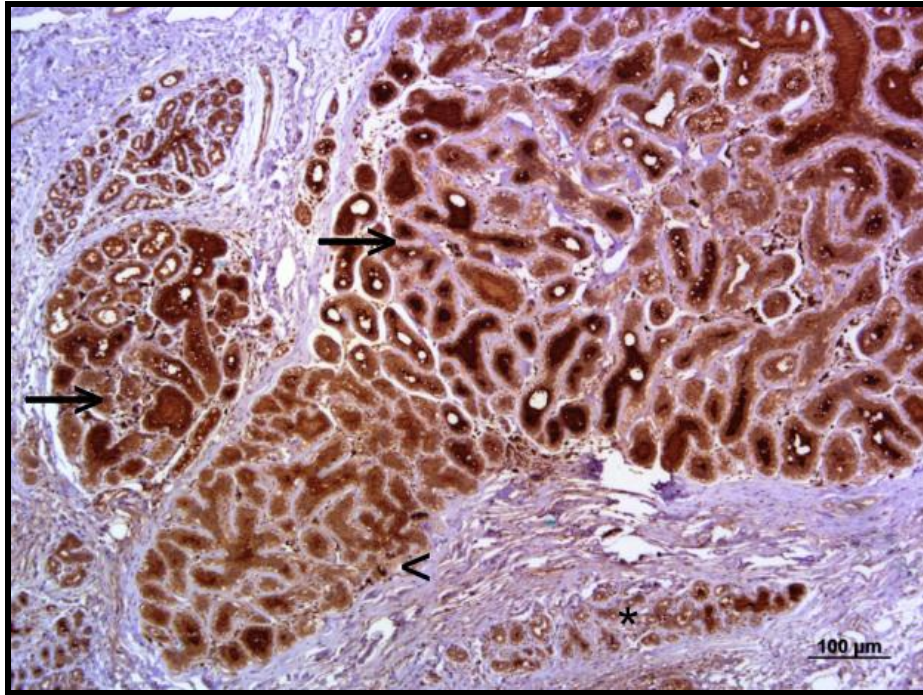


Figure 5. Osteopontin expression in normal (asterisk) tissue, neoplastic foci (arrows) and invasive tumors borders (arrowhead) (bar = 100μm)

Relation between osteopontin and other markers

The relation between OPN immunoexpression in neoplastic cells and HER2, EGFR, c-Kit immunoexpression, and proliferation/Ki67 rates are shown in Table 2.

Table 2 – Relation between OPN immunostaining in neoplastic cells and other markers in canine mammary carcinomas

		Intermediate OPN [n*, (%)]	High OPN [n*, (%)]	<i>p</i>
HER2	HER2 +	6 (50)	28 (90.3)	0.012
	HER2 -	6 (50)	3 (9.7)	
EGFR	EGFR +	7 (58.3)	29 (93.5)	<0.001
	EGFR -	5 (41.7)	2 (6.4)	

CD117 (c-Kit)	Negative	0 (0)	0 (0)	0.799
	Score 1	5 (41.7)	11 (35.5)	
	Score 2	2 (16.7)	11 (35.5)	
	Score 3	4 (33.3)	8 (25.8)	
	Score 4	1 (8.3)	1 (3.2)	
Ki67	< 10%	1 (8.3)	7 (22.6)	0.214
	10-25%	8 (66.7)	20 (64.5)	
	26-50%	3 (25)	3 (9.7)	
	>50%	0 (0)	1 (3.2)	

From the 43 mammary carcinoma evaluated samples, 34 (79.07%) were positive for HER2 and 36 (83.72%) were for EGFR. Additionally, 28 tumors with high OPN high expression (90.3%) also showed HER2 overexpression, revealing a statistically significant association ($P = 0.012$). For EGFR, 29 (93.5%) of positive cases also presented high OPN expression, revealing a statistically significant relation ($P < 0.001$). All cases (43/43) were positive for c-Kit, presenting score variation between 1 to 4. There was no significant association with c-Kit and proliferation rates (Ki67) ($P > 0.05$). Despite this, 27 from the 31 OPN overexpressing cases (87%) revealed less than 25% neoplastic cells positive for Ki67; however, no statistically significant relation between OPN and Ki67 rate could be stated.

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the OPN glycoprotein expression level in the stroma and neoplastic cells of canine mammary tumors and its association with others proteins by means of immunohistochemistry. Since there are no similar reported studies, an elucidation on its significance in canine mammary tumors was required. OPN-producing cells and OPN deposition in extracellular matrix were previously identified by IHC in bone and cartilage in dogs (Schnapper & Meyer, 2004). Additionally, a

quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction array was established to quantify the expression levels of 49 genes relevant to carcinogenesis in laser-microdissected tumor cells of 10 benign and 13 metastatic canine mammary tumors (Klopfleisch et al., 2010). In such study, OPN have been detected in normal tissues; however no significant differences in expression among any of the groups tested were observed for osteopontin.

Presently, it is fully accepted that OPN is expressed by tumor cells both in humans and animals and affect the malignant properties of neoplastic cells, specifically by affecting their ability to grow, invade, and metastasize. Additionally, OPN is also known to be expressed in both normal and malignant tissues (Rodrigues et al., 2009). In the study herein reported, we have found that all of the carcinomas are stained positively for OPN and, according to the used immunohistochemical grading system, tumors consistently highly expressed such protein. This finding is similar to previous studies that focused on OPN in women breast tumor tissue (Tuck et al., 1998; Kim et al., 1998; Coppola et al., 2004; Rodrigues et al., 2009), since authors report a high frequency of OPN positive samples. Additionally, some authors reported OPN positivity in 100% of studied cases of human hepatocellular carcinomas (Tsai et al., 2012), in a similar way to what was observed in this study. Despite canine mammary tumors can sometimes be histologically and biologically different from women breast cancer, the results regarding OPN immunoexpression seems to be in concordance.

This study and that of others (Tuck e Chambers, 2001; Way e Kuo, 2009; Rodrigues et al., 2009; Luo et al., 2011) show that OPN is expressed both in the epithelial and stromal components of neoplastic lesions. In humans, OPN immunoexpression is not only observed in neoplastic cells and reveals a variable staining pattern in which luminal cells from normal mammary tissue, luminal tumor cells, stromal fibroblasts, macrophages, lymphocytes, and blood vessels are weakly to highly stained (Kim et al., 1998; Tuck et al., 1998; Tuck e Chambers, 2001; Way e Kuo, 2009; Rodrigues et al., 2009; Luo et al., 2011). In this study, we observed cells from the tumor microenvironment showing OPN positivity in all samples, as well as cells that are adjacent to the tumor. Additionally, we observed a more intense OPN immunoexpression in cells near necrotic or inflammatory foci, as well as in tumor invasive areas, in agreement with previous reports (Hirota et al., 1995; Tuck et al.,

1998; Brown et al., 1994). Such findings suggest that all those cell types may contribute to OPN tissue production levels.

The presence of OPN in the tumor stroma and on the surface of tumor cells interfacing with stroma and the described stromal cells suggests that this glycoprotein may participate in adhesive interactions at the tumor/normal tissue interface. Consequently, it raises the possibility that OPN influences tumor cell invasion and metastasis can also contribute to macrophage adhesion and migration (Brown et al., 1994) since it is expressed by them. In a previously reported study (Rodrigues et al., 2009) using invasive human breast cancer cases, no statistically significant association was reported between stromal OPN expression, major clinicopathological parameters, and some of the most commonly used molecular markers for those tumors. Whether epithelial and stromal OPN has distinct roles during neoplastic development and progression is an important question to be further addressed, but seems to be related to metastasis in various neoplasms (Brown et al., 1994; Way and Kuo, 2004).

In this study, different tumor markers were tested for association with OPN in canine mammary carcinomas; however, only EGFR and HER2 showed statistically significant relation with OPN positive immunostaining scores. Such components are part of the MAPK signaling pathway, which is a pathway recognized as important for carcinogenesis, particularly for epithelia (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). Our findings suggest osteopontin-associated activation of the MAPK pathway in canine mammary neoplasms, which demonstrates to be in concordance with the findings presented by other authors (Frey et al., 2007; Luo et al., 2011), who revealed a possible relation between OPN and the MAPK pathway in breast cancer (Rudland et al., 2002; Rodrigues *et al.*, 2009; Tuck et al., 2003), lung adenocarcinomas (Frey et al., 2007), hepatocellular carcinoma (Tsai et al., 2012) and in actinic keratosis/cutaneous squamous cell carcinomas (Luo et al., 2011) of humans. Despite this, such relation was reported to be not present in other tumor histotypes such as mesothelioma (Frey et al., 2007), suggesting that this alteration may not be a striking feature for all tumor types.

In dogs, the expression of the erbB family components was previously evaluated in canine mammary tumors. A relatively high expression of the *ERBB1* and *ERBB2* genes suggest an important contribution to carcinogenesis in canine mammary tumors (Matsuyama et al., 2001). The overexpression of the tyrosine kinase receptors EGFR

and HER2 – the proteins derived from *ERBB1* and *ERBB2* genes, respectively – is observed in many human cancers including bladder, breast, colon, and lung cancers (Eccles et al., 1995). HER2 overexpression is usually associated with poor prognosis indicators in canine mammary tumors such as tumor size, high histological grade, invasion, and high proliferative rates (Martín de las Mulas et al., 2003). When it comes to HER2 and OPN relation, some authors (Rodrigues et al., 2009) did not find any association in women; however, this association was statistically significant in the tumors studied by our group. Such finding can indicate the existence of a differentially expressed coregulator in women and canine mammary neoplasms, leading to the activation of this specific RTK in the canine counterpart.

In this study, 83.72% of the samples were positive for EGFR, a protein previously described to be related to reduced disease-free and overall survival canine mammary tumors (Gama et al., 2009). We also identified a statistically significant relation between high OPN expression and EGFR positivity, similarly to what was reported by other authors in human breast cancer (Tuck et al., 2003; Rodrigues et al., 2009) and hepatocellular carcinomas (Tsai et al., 2012). For the latter tumors, higher OPN and EGFR expression were significantly associated with advanced histological grades, advanced pathological stages, and poor survival rates (Tsai et al., 2012). OPN regulated cell migration is said to be epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) dependent (Tuck et al., 2003). OPN induces EGF receptor (EGFR) mRNA expression, EGFR tyrosine kinase activity, HGF receptor (Met) mRNA and protein expression and increases Met kinase activity during tumor cell migration in human mammary cancer cell lines (Tuck et al., 2003). Previous reports indicated that ligation of OPN with integrin leads to c-Src-dependent transactivation of EGFR, resulting in activation of downstream signaling pathways, including PI3-k, Ras–MAPK, phospholipase C, and protein kinase C (PKC) in cancer cells (Tuck et al., 2003). The transformation of epithelial cells induced by tissue specific overexpression of the EGFR in vivo provides direct evidence for a role for EGFR in carcinogenesis (Yarden et al., 2001).

Such features – which indicate relation between EGFR/HER2 and OPN overexpression – are interesting since an arsenal of antibodies and tyrosine kinase inhibitors to growth factor receptors targeted to the MAPK pathway are either in development or already in

clinical use at present, consequently being expected to be effective against tumors overexpressing OPN. Various therapeutic agents directed against EGFR and HER2 have provided promising alternatives to traditional chemotherapy in search for better treatments for cancers overexpressing these tyrosine kinase receptors (Kamath and Buolamwini, 2006). This could represent an evolution in the conventional treatment of canine mammary tumors focused in highly OPN expressing neoplasms.

CONCLUSION

Given the obtained results, it is possible to conclude that osteopontin overexpression is related with EGFR and HER2 expression in canine mammary tumors, probably by the activation of MAPK signaling pathway. Although the mechanisms which involve OPN and the progression of canine mammary carcinomas remain unknown, this study suggests that OPN, EGFR, and HER2 play important roles in canine mammary tumors carcinogenesis. These findings raise the question of whether is possible to use specific drugs for signaling pathway blockage in OPN overexpressing tumors.

REFERENCES

1. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SAW, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* (Bethesda). 1993; 85: 200–206.
2. Biermann K, Goñke F, Nettersheim D, Eckert D, Zhou H, Kahl P, Gashaw I, SchorleH, Büttner R. c-kit is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. *J Pathol.* 2007; 213:311– 318.
3. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol.* 1994; 145:610–623.

4. Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarrai M, Chambers AF, Yeatmman TJ. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:184-190
5. Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M. Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer*. 1996; 73(10): 1233–1236.
6. Eccles SA, Modjtahedi H, Box G, Court W, Sandle J, Dean CJ. Significance of the c-erbB family of receptor tyrosine kinases in metastatic cancer and their potential as targets for immunotherapy. *Invasion Metastasis*. 1994–1995;14:337–348.
7. Fowler EH, Wilson GP, Koestner A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet Pathol*. 1974;11:212–229.
8. Frey AB, Wali A, Pass H, Lonardo F. Osteopontin is linked to p65 and MMP-9 expression in pulmonary adenocarcinoma but not in malignant pleural mesothelioma. *Histopathology* .2007; 50:720-726.
9. Gama A, Gärtner F, Alves A, Schmitt F. Immunohistochemical expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res Vet Sci* 2009; 87: 432–437.
10. Graham JC, Myers RK. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* 1999; 13:416-418.
11. Hirota S, Ito A, Nagoshi J, Takeda M, Kurata A, Takatsuka Y, Kohri K, Nomura S, Kitamura Y. Expression of bone matrix protein messenger ribonucleic acids in human breast cancers. Possible involvement of osteopontin in development of calcifying foci. *Lab Invest*. 1995; 72:64-69.
12. Kadar a, Tőkés AM, Kulka J, Robert L. Extracellular matrix components in breast carcinomas. *Sem Cancer Biol*. 2002; 12: 243–257.

13. Kamath S, Buolamwini JK. Targeting EGFR and HER-2 Receptor Tyrosine Kinases for Cancer Drug Discovery and Development. *Med Res Rev.* 2006; 26; 569-594.
14. Kim YW, Park Y-K, Lee J. Expression of osteopontin and osteonectin in breast cancer. *J Korean Med Sci.* 1998; 13:652– 657.
15. Klopfeisch R, Klose P, Gruber AD. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2010; 47:446-454.
16. Lacroix M, Zammateo N, Remacle J, Leclercq G. A low-density DNA microarray for analysis of markers in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2002; 17:5-236
17. Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ: Tumors of the mammary gland. In *Small Animal Clinical Oncology*. 4th edition. Edited by Withrow SJ, MacEwen EG. St. Louis: Saunders Elsevier; 2007:619–636.
18. Luo X, Ruhland MK, Pazolli E, Lind AC, Stewart SA. Osteopontin stimulates preneoplastic cellular proliferation through activation of the MAPK pathway. *Mol Cancer Res.* 2011; 9:1018-1029.
19. Martin de las Mulas J, Ordas J, Millan Y, Fernandez-Soria V, Ramon y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat.* 2003, 80: 363–367.
20. Matsuyama S, Nakamura M, Yonezawa K, Shimada T, Ohashi F, Takamori Y, Kubo K. Expression patterns of the erbB subfamily mRNA in canine benign and malignant mammary tumors. *J Vet Med Sci.* 2001; 63 (9): 949-954.
21. Misdorp W, Else W, Hellmen E. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. *WHO International Histological Classification of Tumours of*

Domestic Animals. 2^a ed. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology; 1999.

22. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* 2001; 22: 153–18
23. Rodrigues L R, Lopes N, Sousa B, Vieira D, Milanezi F, Paulsson M, Lindmark-Mansson H, Teixeira JA, Schmitt F. Significance of osteopontin expression in human invasive breast tumor stroma. *Open Breast Cancer J.* 2009; 1:1-9.
24. Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, Silva RS, Barraclough R, Winstanley JH, Howitt R, West CR. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:3417-3427.
25. Schnapper A, Meyer W. Osteopontin distribution in the canine skeleton during growth and structural maturation. *Cell Tissues Organs.* 2004; 158-167.
26. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:937-947.
27. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003; 33:573–596
28. Tuck AB, Chambers AF, Allan AL. Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. *J Cell Biochem.* 2007; 102: 859-68.
29. Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J. Mamm. Gland Biol Neoplasia.* 2001; 6: 419–429.
30. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer Predict Oncol.* 1998; 79: 502–508.

31. Tuck AB, Hota C, Wilson SM, Chambers AF. Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene*. 2003; 22, 1198–1205
32. Tsai WC, Lee HS, Jin JS, Gao HW, Chao TK, Chen A, Nieh S, Chan DC, et al. Association between Osteopontin and EGFR Expression with Clinicopathological Parameters in Hepatocellular Carcinoma. *Chin J Phys* 2012; 55(6): 412-420.
33. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the erbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127–137.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation) research grant 2010/51596-2 and by CNPq/Brazil (National Counsel of Technological and Scientific Development/Brazil) research grant 479178/2010-0. CAPES/Brazil (Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel/Brazil) provided financial support for Lidianne N. Monteiro through a master grant. We wish to thank Suely Nonogaki for her assistance with immunohistochemical staining procedures.

Conclusões Gerais

Por muitos anos, os médicos veterinários patologistas mantiveram seu foco na avaliação histológica com a definição da graduação de agressividade para determinar o prognóstico e aplicaram sistemas de classificação para mulheres com relativo sucesso. Porém, este método sozinho não é soberano em termos de capacidade de predição do comportamento biológico de um tumor. Existe a esperança de que a coloração imunoistoquímica para análise de biomarcadores prognósticos seja adotada como um procedimento de rotina na avaliação das neoplasias mamárias de cadelas, de modo que seja fornecido para os oncologistas clínicos veterinários um diagnóstico mais preciso e informativo e que, conseqüentemente, auxilie na instituição de tratamentos mais adequados.

Apesar dos diversos estudos imunoistoquímicos documentados na literatura, não são adotados nas neoplasias mamárias de cadelas quaisquer marcadores de rotina até o presente momento. Uma vez que um pior prognóstico nos pacientes com neoplasias mamárias está associado a eventos importantes da progressão neoplásica como a invasão e a disseminação metastática, a validação de novos biomarcadores relacionados estes se vê interessante, tanto nas mulheres quanto nas cadelas. Diante disso, a osteopontina – uma glicofosfoproteína com diversas atividades funcionais – é vista como um biomarcador promissor.

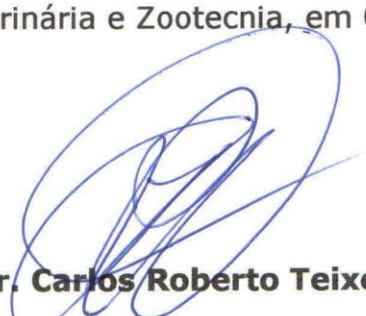
No presente estudo, a osteopontina demonstrou estar relacionada com a ativação da via de sinalização MAPK nos pacientes com neoplasias mamárias. Em consequência disso, a continuidade de seu estudo nas neoplasias mamárias deve ser encorajado de modo a verificar sua aplicabilidade na avaliação dos pacientes em razão de fornecer informação prognóstica de utilidade.

Anexos

ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto **"Análise prognóstica da imunoexpressão de osteopontina no microambiente dos carcinomas mamários esporádicos de cadelas"**, Protocolo nº 88/2011-CEUA, **Lidiane Narducci Monteiro**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina, nível Mestrado, da Faculdade de Medicina, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 04 de fevereiro de 2011.



Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu