

**OSTEOPONTINA EM TUMORES MAMÁRIOS MISTOS BENIGNOS E MALIGNOS
DE CADELAS. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO**

*(OSTEOPONTIN IN BENIGNS AND MALIGNANTS MIXED MAMMARY TUMORS OF
BITCHES. IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)*

*(OSTEOPONTINA EN TUMORES DE MAMA MIXTOS BENIGNOS Y MALIGNOS DE
PERRAS. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO)*

¹L. M. C. SOARES¹, G. M. MAGALHÃES², A. C. T. SILVEIRA², E. GARRIDO², A. C. ALESSI³

RESUMO

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada extracelular com importância em um grande número de eventos fisiológicos e patológicos. Seus níveis são elevados em tumores e no plasma de pacientes humanos com câncer de mama metastático, sendo considerada um marcador para prognóstico. Não há informações na literatura sobre os níveis plasmáticos de OPN em cães ou em neoplasias mamárias nessa espécie. Este trabalho teve como objetivo pesquisar a imunorreatividade em células de origem epitelial em neoplasias da glândula mamária de cadelas utilizando-se anticorpo anti-osteopontina. Foram selecionados 10 casos de tumores mistos mamários caninos benignos e 10 malignos, ou seja, do tipo carcinoma em tumor misto. A técnica utilizada foi imuno-histoquímica, com desmascaramento de antígenos pelo calor, inibição de peroxidase endógena e emprego de complexo ABC. A revelação foi com DAB. A observação foi em microscopia de luz, com

¹ Residente do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV - UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, FCAV - UNESP, Câmpus de Jaboticabal - SP.

³ Professor do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, -SP.

26 contagem do número de células marcadas. Verificou-se que, embora os tumores benignos
27 apresentassem uma reatividade discretamente mais acentuada que os malignos, as médias de
28 células marcadas de cada grupo não mostraram diferença significativa. Conclui-se que, ao
29 contrário do que se verifica em humanos, a OPN, em tumores caninos mistos mamários, não
30 pode ser considerada um marcador de comportamento tumoral. O motivo para essa diferença
31 torna-se assunto a ser explorado.

32

33 **PALAVRAS-CHAVE:** osteopontina, neoplasia, tumor misto mamário, cão

34

35 **SUMMARY**

36 The osteopontin (OPN) is a phosphorylated extracellular glycoprotein with importance
37 in a large number of physiological and pathological events. Its levels are elevated in tumors
38 and plasma of human patients with metastatic breast cancer and is considered a marker for
39 prognosis. There is no information in the literature on plasma levels of OPN in mammary
40 tumors in dogs. This study aimed to investigate the immunoreactivity in epithelial cells in
41 mammary gland neoplasms in bitches using anti-osteopontin antibodies. We selected 10 cases
42 of benign canine mammary mixed tumors and 10 malignant, that means, carcinoma in mixed
43 tumor. The technique used was immunohistochemistry with antigen unmasking by heat,
44 inhibition of endogenous peroxidase and employment of complex ABC. The revelation was
45 made with DAB. Observation was made by light microscope, counting the number of labeled
46 cells. It was found that, while benign tumors presented a reactivity slightly stronger than the
47 malign, the means of labeled cells in each group showed no significant difference. We
48 conclude that, contrary to what occurs in humans, OPN in canine mixed mammary tumors can
49 not be considered a marker of tumor behavior. The reason for this difference becomes a
50 subject to be explored.

51

52 **KEY-WORDS:** osteopontin, neoplasia, mixed mammary tumor, dog

53

54 **RESUMEN**

55 La osteopontina (OPN) es una glicoproteína fosforilada con importancia extracelular en
56 un gran número de eventos fisiológicos y patológicos. Sus niveles son elevados en los
57 tumores y el plasma de los pacientes humanos con cáncer de mama metastásico y se considera
58 un marcador de pronóstico. No hay información en la literatura sobre los niveles plasmáticos
59 de OPN en los tumores mamarios en perrose. Este estudio tuvo como objetivo investigar la

60 inmunoreactividad en las células epiteliales en las neoplasias de glándula mamaria en perras
61 con anti-osteopontina. Se seleccionaron 10 casos de tumores de mama canina mixta benignos
62 y 10 malignas, a saber, carcinoma en tumor mixto. Se utilizó la técnica inmunohistoquímica
63 con desenmascaramiento de antígenos por el calor, la inhibición de la peroxidasa endógena, y
64 el empleo de complejo ABC. La revelación fue con DAB. Observación al microscopio de luz
65 con contar el número de células marcadas. Se encontró que, mientras que los tumores
66 benignos presentan una reactividad ligeramente más fuerte que el maligno, promedios de
67 células marcadas en cada grupo no mostró diferencias significativas. Se concluye que,
68 contrariamente a lo que ocurre en los seres humanos, OPN en tumores mamarios mixtos
69 caninos no puede considerarse como un marcador de comportamiento del tumor. La razón de
70 esta diferencia se convierte en tema a ser explorado.

71

72 **PALABRAS CLAVE:** osteopontina, neoplasia, tumor mixto de mama, perro

73

74 Tumor de glândula mamária é o tipo de neoplasia de ocorrência mais comum em
75 cadelas Aproximadamente 50% dos tumores mamários caninos são descritos como malignos
76 (GILBERTSON et al. 1983, MOULTON, 1990, SCHAFER et al., 1998).

77 A matriz extracelular tem um papel importante no desenvolvimento e na progressão do
78 tumor. Ela atua como um reservatório para muitos fatores de crescimento, citocinas e
79 moléculas de sinalização, as quais podem regular o comportamento de células malignas
80 (COOK et al., 2006). A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada extracelular que
81 tem sido estudada em diversos eventos fisiológicos e patológicos (DENHARDT et al., 2001).
82 Seus níveis são elevados em tumores e no plasma de pacientes humanos com metástase de
83 câncer de mama, e sabe-se que a osteopontina relaciona-se com agressividade tumoral e
84 queda de tempo de sobrevida destes pacientes (SAMANT et al., 2007). Além disso, a OPN é
85 produzida em células de uma ampla variedade de tumores humanos e vem sendo estimada
86 como um potencial fator prognóstico para metástase de câncer de mama (NATASHA et al.,
87 2006).

88 O objetivo deste estudo foi a detecção da marcação de osteopontina em células de
89 tumores mistos mamários benignos e malignos, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, a
90 fim de estabelecer uma relação entre a expressão dessa glicoproteína e o comportamento
91 tumoral. Para isso, foram selecionados vinte casos de neoplasias mamárias caninas, os quais
92 apresentavam fragmentos com áreas significativas de tumores mistos mamários. Após a
93 seleção, esses casos foram separados em dois grupos experimentais, compostos por dez
94 animais cada, sendo o grupo B referente ao tumor misto mamário benigno e M ao tumor
95 misto mamário maligno. Os fragmentos de todos os casos selecionados haviam sido fixados
96 em formol 10%, tamponados com fosfatos, seguidos por um processo rotineiro de inclusão
97 em parafina e obtenção de cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina.

98 Para a técnica de reação imuno-histoquímica, novos cortes foram obtidos,
99 desparafinizados e hidratados. O método empregado foi o complexo avidina-biotina
100 peroxidase (ABC), desenvolvido por Hsu et al. (1981), com ligeiras modificações para o
101 anticorpo anti-OPN (O 7264 – Sigma) na diluição 1:200. A recuperação antigênica foi
102 realizada através do banho-maria a 92°C, durante 40 minutos, com tampão TRIS-EDTA (pH
103 9,0). A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB). As marcações foram consideradas
104 positivas quando o citoplasma de células epiteliais neoplásicas estava claramente marcado,
105 mesmo que minimamente corado.

106 Foram analisadas as células com marcação imuno-histoquímica de OPN (células
107 marcadas) e as células que não continham tal marcação (células não marcadas), as quais
108 foram contadas em diferentes campos microscópicos escolhidos aleatoriamente, totalizando
109 100 células. A contagem foi feita por dois observadores, adotando-se a média entre as duas
110 como a contagem final de cada neoplasia, em porcentagem de células marcadas. Para
111 comparação das médias empregou-se o teste t, adotando-se $P < 0,05$.

112 Observou-se que na maioria dos cortes as células marcadas eram facilmente
113 identificadas, tanto nos tumores benignos (Fig. 1) quanto nos malignos (Fig. 2), permitindo
114 que a contagem fosse feita sem dificuldade. A diferença entre as médias das contagens de
115 células marcadas nos dois grupos, que equivale à porcentagem, foi não significativa, sendo
116 para o grupo B: $76,5\% \pm 11,31$; e para o grupo M: $71,1\% \pm 8,17$ (Tabela 1).

117 TUCK et al. (1997) sugeriram que a OPN pode ser um marcador para tumor agressivo
118 em câncer de mama e, elevado nível no tumor primário, pode prever o futuro
119 desenvolvimento de metástase. Estes dados contrastam com os achados deste estudo, já que
120 dentre todos os tumores analisados não houve o desenvolvimento de metástases e os tumores
121 benignos possuíram uma imunorreatividade levemente mais acentuada que os tumores
122 malignos, logo, níveis elevados desta glicoproteína, em tumores mistos mamários em cadelas,
123 não se correlaciona com o estágio tumoral.

124 Observa-se que o anticorpo anti-OPN marcou células epiteliais mamárias, células
125 epiteliais da epiderme, fibroblastos, condroblastos, células mioepiteliais e algumas células
126 inflamatórias, como macrófagos, que apareceram ocasionalmente em alguns tumores. A
127 marcação de fibroblastos pode ser explicada por estudos recentes que sugerem que a OPN
128 pode ter um papel mais direcionado no desenvolvimento de tecido fibroso (MAZZALI et al.,
129 2002). Além disso, ela é uma das proteínas mais abundantemente expressada por macrófagos,
130 sendo um estímulo quimiotático potente a estes (SCATENA et al., 2009).

131 Conclui-se, em cadelas, a OPN não pode ser considerada um marcador prognóstico
132 tumoral, diferentemente de tumores mamários humanos, nos quais sua expressão elevada
133 pode ser relacionada com maior malignidade tumoral. O motivo desta diferença torna-se
134 assunto a ser explorado.

135

136 **AGRADECIMENTOS**

137 À FAPESP pela concessão de bolsa de Iniciação Científica (LMCS), proc. n°
138 2008/0543-1. Às técnicas Francisca A. Ardisson e Maria I. Y. de Campos pelos
139 procedimentos histológicos.

140

141 **REFERÊNCIAS**

142 COOK A.C., CHAMBERS A.F., TURLEY E.A., TUCK A.B. Osteopontin Induction of
143 Hyaluronan Synthase 2 Expression Promotes Breast Câncer Malignancy. Journal of
144 Biological Chemistry, v. 28, p. 24381-89, 2006.

145 DENHARDT D.T., NODA M., O'REGAN A.W., PAVLIN D., BERMAN J. Osteopontin as a
146 means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling,
147 and cell survival. The Journal of Clinical Investigation, v. 107, p. 1055-1061, 2001.

148 GILBERTSON, S.R., KURZMAN, I.D., ZACHRAU, R.E., HURVITZ, A.I., BLACK, M.M.
149 Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic
150 characteristics assessed in 232 dogs. Veterinary Pathology, v. 20, p. 127-142, 1983.

151 HSU, S.M., RAINE, L., FANGER, H.A. A Comparative study of peroxidase- antiperoxidase
152 method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with
153 radioimmunoassay antibodies. American Journal of Clinical Pathology, v. 75, p. 734-
154 738, 1981.

155 MAZZALI, M., KIPARI, T., OPHASCHAROENSUK, V., WESSON, J.A., JOHNSON, R.,
156 HUGHES, J. Osteopontin – a molecule for all seasons. Q J Med, v. 95, p. 3 -13, 2002.

157 MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. **In: Tumors in Domestic Animals.** 3^a. ed.,
158 p.518-552., Berkeley: University of California Press, 1990.

159 NATASHA T., KUHN M., KELLY O., RITTLING S.R. Override of the Osteoclast Defect in
160 Osteopontin-Deficient Mice by Metastatic Tumor Growth in the Bone. The American
161 Journal of Pathology, v. 168, p. 551-561, 2006.

162 SAMANT R.S., CLARK D.W., FILLMORE R.A., CICEK M., METGE B.J.,
163 CHANDRAMOULI K.H., CHAMBERS A.F., CASEY G., WELCH D.R., SHEVDE L.A.
164 Breast cancer metastasis suppressor I (BRMS I) inhibits osteopontin transcription by
165 abrogating NF-kB activation. *BioMed Central*, v. 6, p. 1-9, 2007.

166 SCATENA, M., LIAW, L., GIACHELLI, C.M. Osteopontin – A Multifunctional Molecule
167 Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis,*
168 *and Vascular Biology*, v. 27, p. 2302 – 2309, 2009.

169 SCHAFER, K.A., KELLY, G., SCHRADER, R., GRIFFITH, W.C., MUGGENBURG, B.A.,
170 TIERNEY, L.A., LECHINER, J.F., JANOVITZ, E.B., HAHN, F.F. A canine model of
171 familial mammary gland neoplasia. *Veterinary Pathology*, v. 35, p. 168-77, 1998.

172 TUCK, A.B., O'MALLEY, F.P., SINGHAL, H., TONKIN, K.S, HARRIS, J.F., BAUTISTA,
173 D., CHAMBERS, A.F. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor
174 progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch*
175 *Pathol Lab Med*, v. 121, p. 578–584, 1997.

176 Tabela 1. Porcentagem de células epiteliais, de mama de cadelas, marcadas pela imuno-
177 histoquímica com anticorpo anti-osteopontina em tumores mistos benignos e em carcinomas
178 em tumores mistos.

	Tumores Mistos Benignos	Carcinoma em Tumores Mistos
Sequência	% Células Marcadas	% Células Marcadas
1	61	76
2	80	77
3	73	77
4	60	78
5	78	63
6	90	66
7	66	56
8	88	82
9	90	69
10	67	79
Média	76,5% ± 11,31	71,1% ± 8,17

179

180

181

182

183

184

185

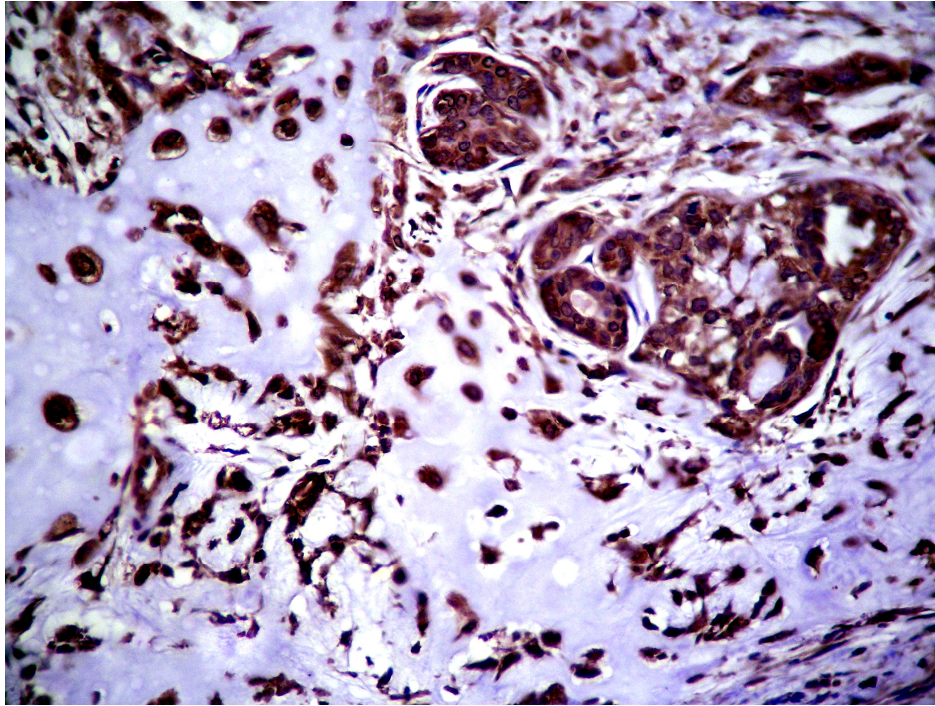
186

187

188

189

190



191

192 Figura 1: Tumor mamário misto benigno canino. Marcação imuno-
193 histoquímica para osteopontina. Observar células epiteliais coradas em
194 marrom. ABC, obj. 20x.

195

196

197

198

199

200

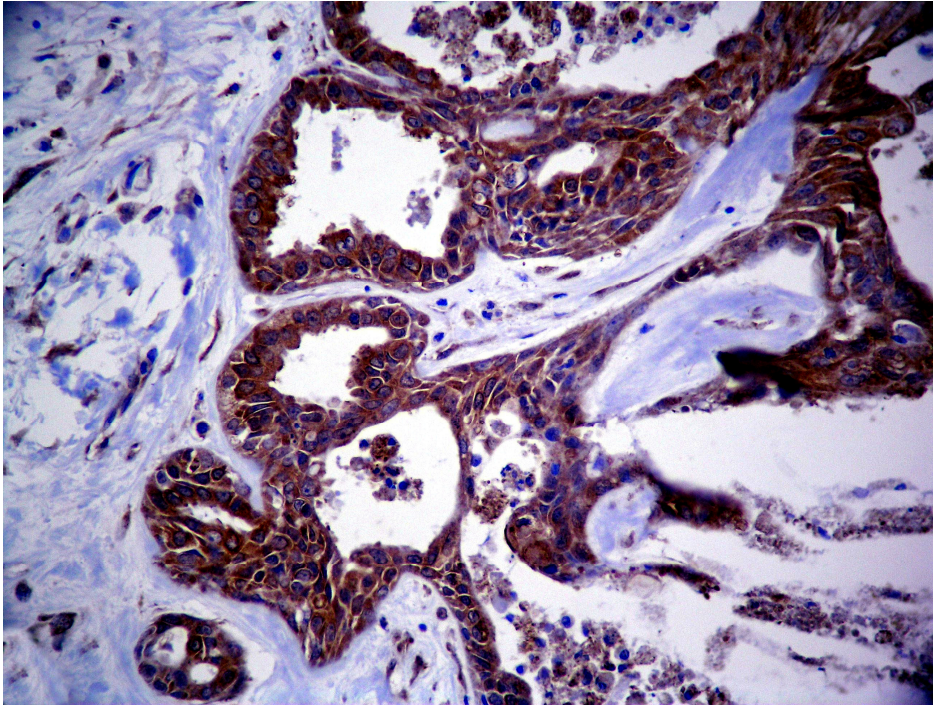
201

202

203

204

205



206

207 Figura 2: Carcinoma em tumor mamário canino misto. Marcação imuno-
208 histoquímica para osteopontina. Observar células epiteliais coradas em
209 marrom. ABC, obj. 20x.

210