

**Short Communication****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)*

**L. M. C. SOARES<sup>1</sup>, G. M. MAGALHÃES<sup>1</sup>, A. C. T. SILVEIRA<sup>1</sup>,  
E. GARRIDO<sup>1</sup>, A. C. ALESSI<sup>1\*</sup>**

**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 de 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 o 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 do complexo Avidina Biotina Peroxidase (ABC). A revelação da reação foi feita com DAB. A observação foi em microscopia de luz, com a contagem do número de células imunomarcadas. Verificou-se que, embora os tumores benignos apresentassem uma reatividade discretamente mais elevada que os malignos, as médias das células imunomarcadas de cada grupo não apresentaram diferenças significativas. Conclui-se que, ao contrário do que se verifica em humanos, a OPN, em tumores caninos mistos mamários, não pode ser considerada um marcador de comportamento tumoral. O motivo para essa diferença torna-se assunto a ser explorado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Osteopontina. Neoplasia. Tumor misto mamário. Cão. Imuno-histoquímica.

**SUMMARY**

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

**KEY-WORDS:** Osteopontin, neoplasia. Mixed mammary tumor. Dog. Immunohistochemistry.

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo D. Castellane s/n. 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.\* autor para correspondência: alessi@fcav.unesp.br

## INTRODUÇÃO

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

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

O objetivo deste estudo foi a detecção da marcação de osteopontina em células de tumores mistos mamários benignos e malignos, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, a fim de estabelecer uma relação entre a expressão dessa glicoproteína e o comportamento tumoral. Para isso, foram selecionados vinte casos de neoplasias mamárias caninas, os quais apresentavam áreas com padrão morfológico compatível com tumores mistos mamários. Os tumores foram separados em dois grupos experimentais, compostos por dez animais cada, sendo o grupo B referente ao tumor misto mamário benigno e M ao tumor misto mamário maligno. Os fragmentos de todos os casos selecionados haviam sido fixados em formol 10%, tamponados com fosfatos (pH 7,2), seguidos por um processo rotineiro de inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina.

Para a técnica de imuno-histoquímica, cortes incluídos em parafina foram desparafinizados e hidratados. O método empregado foi o complexo avidina-biotina peroxidase (*Kit* DAKO LSAB, ref. K0690ABC), desenvolvido por Hsu et al. (1981), com ligeiras modificações para o anticorpo anti-OPN (O 7264 – Sigma) na diluição 1:200. A recuperação antigênica foi realizada através do banho-maria a 92°C, durante 40 minutos, com solução tampão TRIS-EDTA (pH 9,0, 10mM Tris Base, 1mM EDTA). A revelação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (DAB - DAKO ref. K3466). As marcações foram consideradas positivas quando o citoplasma de células epiteliais neoplásicas estava claramente marcado, mesmo que minimamente corado.

Foram analisadas 100 células, as quais foram contadas em diferentes campos microscópicos escolhidos aleatoriamente. A contagem foi feita por dois observadores, adotando-se a média entre as duas

contagens como a média final de cada neoplasia, em porcentagem de células marcadas. Para comparação das médias empregou-se o teste t, adotando-se  $P < 0,05$ .

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

TUCK et al. (1997) sugeriram que a OPN pode ser um marcador para tumor agressivo em câncer de mama e, seu nível elevado no tumor primário, pode predizer o aparecimento de futuras metástases. Estes dados contrastam com os achados deste estudo, já que dentre todos os tumores analisados não houve o desenvolvimento de metástases e os tumores benignos possuíram uma imunorreatividade discretamente mais elevada que os tumores malignos, logo, níveis elevados desta glicoproteína, em tumores mistos mamários em cadelas, não parecem ter relação com as características de malignidade do tumor.

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

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

## AGRADECIMENTOS

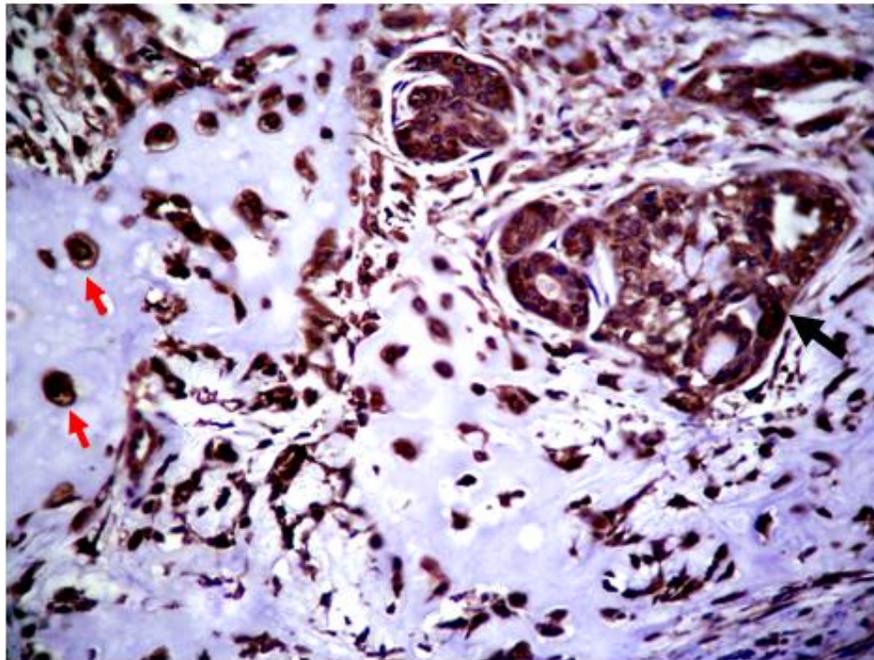
À FAPESP pela concessão de bolsa de Iniciação Científica (LMCS), proc. n° 2008/0543-1. Às técnicas Francisca A. Ardisson e Maria I. Y. de Campos pelos procedimentos histológicos.

## REFERÊNCIAS

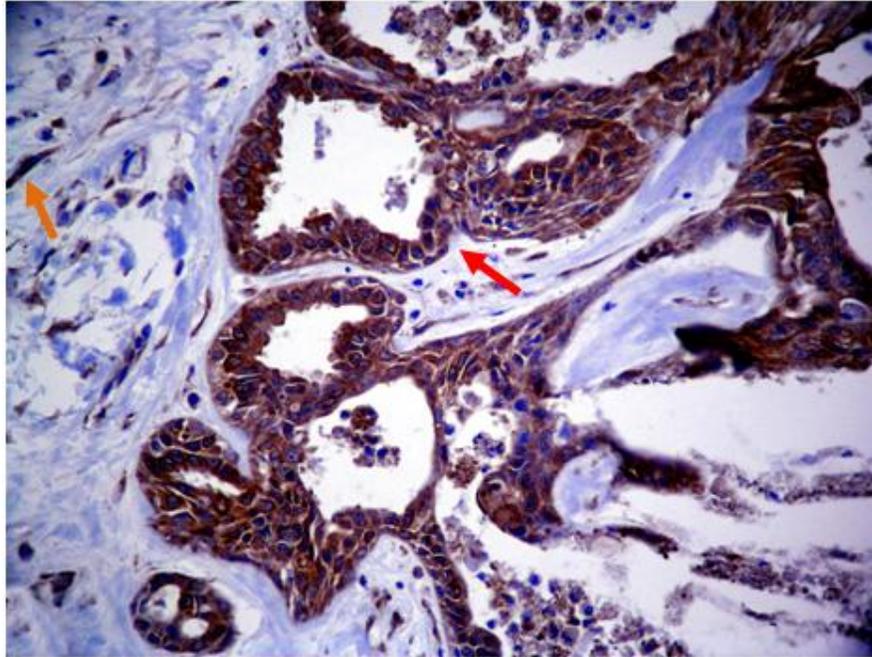
COOK A. C.; CHAMBERS A. F.; TURLEY E. A.; TUCK A. B. Osteopontin Induction of Hyaluronan Synthase 2 Expression Promotes Breast Cancer Malignancy. **Journal of Biological Chemistry**, v.28, p.24381-89, 2006.

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

Sequência	Tumores Mistos Benignos	Carcinoma em Tumores Mistos
	% 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	<b>76,5 ± 11,31</b>	<b>71,1 ± 8,17</b>



**Figura 1** - Tumor mamário misto benigno canino. Marcação imuno-histoquímica para osteopontina. Observar células epiteliais (seta larga) e condrócitos (seta fina) corados em marrom. ABC, obj. 20x.



**Figura 2** - Carcinoma em tumor mamário canino misto. Marcação imuno-histoquímica para osteopontina. Observar células epiteliais (seta vermelha) e fibroblastos (seta fina) corados em marrom. ABC, obj. 20x.

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

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

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

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

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

NATASHA, T.; KUHN, M.; KELLY, O.; RITTLING, S. R. Override of the Osteoclast Defect in Osteopontin-Deficient Mice by Metastatic Tumor Growth in the

Bone. **The American Journal of Pathology**, v.168, p.551-561, 2006.

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

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

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

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