

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOLOGIA TUMORAL E DIAGNÓSTICO  
HISTOPATOLÓGICO POR COLETA COM AGULHA  
FINA NO OSTEOSSARCOMA CANINO**

**MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO RESIDÊNCIA  
MÉDICO-VETERINÁRIA**

**LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

**BIOLOGIA TUMORAL E DIAGNÓSTICO  
HISTOPATOLÓGICO POR COLETA COM AGULHA FINA NO  
OSTEOSSARCOMA CANINO**

por

**Luciele Varaschini Teixeira**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização Residência Médico-Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Patologia Clínica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Patologia Clínica Veterinária**

**Orientadora: Profa. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes**

Santa Maria, RS, Brasil  
2009

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Monografia de Residência Médico-Veterinária

**BIOLOGIA TUMORAL E DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO POR  
COLETA COM AGULHA FINA NO OSTEOSSARCOMA CANINO**

elaborada por  
**Luciele Varaschini Teixeira**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
Especialista em Patologia Clínica Veterinária

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dra.**  
(Presidente/Orientadora)

**Rafael Almeida Fighera, Dr.** (UFSM)

**Danieli Brolo Martins, Msc.** (UFSM)

Santa Maria, 29 de maio de 2009.

***Animais,  
criaturas sem maldade...***

***Ofereço este trabalho  
ao melhor amigo do homem:  
O Cão.***

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pela força nos momentos em que eu mais precisei, principalmente “naqueles dias de estresse”. Muito obrigada por tudo!

Ao Wagner, meu grande amor, obrigada pelas inúmeras vezes que você me escutou e me acalmou. Te amo!

À Prof<sup>a</sup> e orientadora Sonia, pela oportunidade de poder aperfeiçoar os meus conhecimentos de Análises Clínicas e aprender a conviver em equipe.

À Raqueli, minha companheira de rotina e de “experimentos”, muito obrigada por tudo!

À Danieli, pela amizade e apoio técnico com suas idéias geniais!

A toda a equipe do LACVET, pelo apoio sempre bem-vindo!

Ao Prof Fighera, pelas análises histopatológicas.

À Cinthia, por ter me apresentado a paz interior através do Nam-myoho-rengue-kyo, sempre me contagiando com sua energia positiva.

A todos os veterinários e funcionários do HVU, foi muito bom ter convivido com vocês!

Ao Breno, por ir adiante com a incorporação da Residência Médico-Veterinária ao HVU, juntamente com a Prof<sup>a</sup> Sonia, coordenadora desta pós-graduação.

Ao Reitor Dr. Clóvis Lima pela bolsa e pelo entusiasmo ao ver a Residência Médico-Veterinária já implantada neste Hospital Veterinário.

Às minhas companheiras de quarto, “Pipoca” e “Ana Júlia”. Por isso é dito que o cão é o melhor amigo do homem!

***“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”.***

***(Albert Einstein)***

## RESUMO

Monografia de Residência Médico-Veterinária  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

AUTORA: LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA  
ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de maio de 2009.

O aumento da expectativa de vida dos animais tem proporcionado o aparecimento de diversas doenças, principalmente neoplasias. O osteossarcoma é um tumor primário de origem óssea e causa desconhecida que afeta a homens e animais. Esta neoplasia geralmente acomete cães adultos, com média de sete anos de idade. Enquanto 75% dessas lesões encontram-se no esqueleto apendicular, 25% ocorrem no esqueleto axial. Os sinais clínicos variam de discretas claudicações a fraturas patológicas, além de dor e aumento de volume. O diagnóstico é dado pela histopatologia em conjunto com a citopatologia, no entanto, a história clínica e radiologia também contribuem para o diagnóstico desta neoplasia óssea. O exame citológico é realizado através da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), possuindo várias vantagens como: exame rápido, de baixo custo, boa eficácia e sem riscos à vida do animal. A coleta de tecido ósseo pode ser facilitada utilizando-se a agulha de Jamshidi, a qual consegue perfurar a cortical óssea. O tratamento para esta neoplasia consiste de cirurgia seguida de quimioterapia, de acordo com a situação do paciente. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) comparada à biópsia incisional ganha vantagem, pois a segunda técnica, apesar de conseguir um bom tamanho de amostra para o exame histopatológico, é totalmente invasiva, podendo disseminar células tumorais aos tecidos adjacentes. Além disso, o paciente passa por uma intervenção cirúrgica, podendo acarretar problemas terapêuticos no pós-operatório. Portanto, a PAAF deve ter preferência para coleta de material em tumores ósseos, tanto pela facilidade e rapidez dos resultados, como para o início precoce da terapia antineoplásica. Este trabalho propôs um modelo de coleta por PAAF, onde o tamanho da amostra se mostrou suficiente em 33% dos casos para o exame histopatológico. A nova técnica de coleta proposta nesta monografia deve ser aperfeiçoada e introduzida na clínica de pequenos animais, trazendo benefícios aos mesmos e abrindo caminhos para novos estudos na oncologia.

Palavras-chave: osteossarcoma; tumorigênese; PAAF; metodologia de coleta; histopatologia.

## **ABSTRACT**

Monograph of Specialization-Veterinary Medicine Residents  
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine  
Federal University of Santa Maria

### **TUMOR BIOLOGY AND HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS BY FINE NEEDLE HARVEST WITH THE CANINE OSTEOSARCOMA**

**AUTHOR: LUCIELE.VARASCHINI TEIXEIRA**

**ADVISOR: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES**

Date and place of defense: Santa Maria, May, 29<sup>th</sup>, 2009.

The increase in life expectancy of animals has provided the appearance of various diseases, mainly cancer. Osteosarcoma is a primary tumor of bone origin and unknown cause that affects humans and animals. This cancer usually affects adult dogs, with an average of seven years of age. While 75% of these injuries are in the appendicular skeleton, 25% occur in the axial skeleton. Clinical signs vary from mild claudicações the pathologic fractures, and pain and increase in volume. The diagnosis is made by histopathology together with cytopathology, however, the clinical history and radiology also contribute to the diagnosis of bone cancer. The cytological examination is performed by fine-needle aspiration cytology (CAAF), has several advantages such as rapid examination, low-cost, efficient and without risk to life of the animal. The collection of bone tissue can be facilitated using a Jamshidi needle, which can perforate the cortical bone. Treatment for this neoplasm consists of surgery followed by chemotherapy, according to the patient. The Fine-needle aspiration cytology (FNA) compared to incisional biopsy win advantage as the second technique, despite getting a good sample size for the histopathological examination is totally invasive, tumor cells can spread to adjacent tissues. Furthermore, the patient undergoes a surgical procedure and may cause problems therapy postoperatively. Therefore, FNA should be preferred for collecting material in bone tumors, both the ease and speed of results, and for the early initiation of antineoplastic therapy. This paper proposed a model of collection by FNAB, where the sample size was sufficient in 33% of cases for histopathological examination. The new technique proposed in this monograph collection should be improved and introduced in the clinic for small animals, bringing benefits to them and opening avenues for further studies in oncology.

Keywords: osteossarcoma; tumorigenesis; FNA; method of collection; histopathology.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esqueleto canino apresentando locais de ocorrência de osteossarcoma seguidos do prognóstico.....21
- Figura 2 – Radiografia mostrando área de rarefação óssea e reatividade periosteal na extremidade proximal do úmero.....26
- Figura 3 – Comparação entre exame citopatológico (A) e histopatológico (B) de osteossarcoma canino. Panótico rápido, 200x.....27
- Figura 4 – Agulhas comumente utilizadas para CAAF.....35
- Figura 5 – Citoaspirador utilizado para PAAF.....35
- Figura 6 – Punção por agulha fina: massa contida com a mão não dominante e punção realizada em várias direções. Fonte: DALECK, 2008.....36
- Figura 7 – Esfregaço tipo *squash*. Uma pequena parte do material colhido é colocada sobre a lâmina, enquanto a outra é deslizada sobre ele (esquerda para a direita).....36

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Antineoplásicos frequentemente utilizados no tratamento do osteossarcoma.....	31
--	----

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo A – Comprovante de submissão de artigo (Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino).....	62
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Biologia Tumoral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Osteossarcoma Canino.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Etiologia e epidemiologia.....	20
2.2.2 Clínica e patologia.....	22
2.2.3 Diagnóstico.....	24
2.2.3.1 História Clínica.....	24
2.2.3.2 Bioquímica Sérica.....	25
2.2.3.3 Radiologia.....	25
2.2.3.4 Cintilografia e Tomografia Computadorizada.....	26
2.2.3.5 Citopatologia e Histopatologia.....	26
2.2.4 Tratamento.....	28
2.2.4.1 Cirurgia.....	28
2.2.4.2 Quimioterapia.....	28
2.2.4.3 Radioterapia.....	31
2.2.4.4 Imunoterapia e Terapia Gênica.....	32
2.2.5 Prognóstico.....	32
<b>2.3 Comparação entre Citopatologia e Histopatologia.....</b>	<b>33</b>
<b>3 MANUSCRITO.....</b>	<b>39</b>

<b>3.1 Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino.....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Resumo.....	40
3.1.2 Abstract.....	40
3.1.3 Introdução.....	41
3.1.4 Material e Métodos.....	42
3.1.5 Resultados e Discussão.....	43
3.1.6 Conclusão.....	47
3.1.7 Referências Bibliográficas.....	47
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se notado maior longevidade dos animais domésticos, principalmente daqueles que são considerados como um membro da família: os cães. Contudo, esta característica proporcionou o crescimento de diversas doenças, entre as quais se encontram várias neoplasias, como o osteossarcoma (FIGHERA, 2008).

O osteossarcoma é um tumor maligno de origem óssea que afeta principalmente cães de raças grandes e gigantes, embora possa também afetar raças pequenas (GINEL et al., 1996; CAVALCANTI et al., 2004). Geralmente, ocorre em cães adultos, com média de sete anos de idade (RU et al., 1998; CAVALCANTI et al., 2004). Em 75% dos casos este neoplasma acomete os ossos do esqueleto apendicular e 25% ocorre no esqueleto axial (THOMAS et al., 1997). Os achados clínicos caracterizam-se por claudicação, aumento de volume e dor no local; às vezes, o neoplasma está associado a fraturas (ENDICOTT, 2003).

Este neoplasma possui comportamento agressivo, com padrão lítico proliferativo e invasivo, que frequentemente dissemina metástases por via hematogena, atingindo preferencialmente os pulmões (SPODNICK et al., 1992; BARROGA et al., 1999; THOMPSON e POOL, 2002). O diagnóstico definitivo pode ser dado através da histopatologia ou pela citopatologia. A coleta de material pode ser realizada através da PAAF ou por biópsia óssea. Na coleta por PAAF o paciente não corre risco de vida com anestesia, além de ser uma técnica fácil, de baixo custo, com boa eficácia e resultados rápidos (TEIXEIRA et al., 2008). Também é importante o exame radiológico, pois avalia a extensão da lesão e a ocorrência de metástases (DALECK et al., 2002; DERNELL et al., 2007).

O tratamento baseia-se em amputação seguida de quimioterapia ou somente quimioterapia, quando a cirurgia não pode ser realizada. Os quimioterápicos mais utilizados são cisplatina, doxorrubicina e carboplatina (DALECK et al., 2002). O tratamento quimioterápico pode ser associado à imunoterapia, possibilitando o aumento da ação antitumoral, sem alterar o mecanismo de ação da droga e causar toxicidade ao animal (MACEWEN e KURZMAN, 1996).

O exame citopatológico é considerado como uma boa ferramenta no diagnóstico de muitas lesões sejam elas neoplásicas ou não, entretanto, o exame histopatológico confirmará o diagnóstico da lesão (WELLMAN, 1990). A PAAF tem várias vantagens em relação à biópsia incisional, como: rápida cicatrização, procedimento simples, sem necessidade de anestesia geral, baixo custo e início precoce da terapia adjuvante. No entanto, uma desvantagem desta técnica é pequena quantidade de amostra (SKRZYNSKI et al., 1996).

A coleta de tecido ósseo através da PAAF torna-se mais fácil e com maior obtenção de amostra utilizando-se a agulha de Jamshidi. Esta contém uma ponta de metal que perfura a cortical óssea, ideal para coleta de material de neoplasmas ósseos como o osteossarcoma. No entanto, a agulha de Jamshidi, além de possuir maior calibre, necessita de outras técnicas para punção, diferentes daquelas usadas para a PAAF convencional. Por isso, usualmente utiliza-se agulhas hipodérmicas estéreis e descartáveis de calibre um pouco menor para a coleta de material por PAAF (SIQUEIRA et al., 2008).

A PAAF deve ser a técnica de escolha para tumores ósseos, tanto em relação à facilidade do procedimento como para o início precoce da quimioterapia. Devido à biópsia incisional ser um método de coleta com muitos riscos à vida do paciente, propõe-se um modelo de coleta por PAAF, em que o tamanho da amostra se mostre suficiente para o exame histopatológico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biologia tumoral

Assim como outras doenças crônicas, o câncer é um das mais antigas enfermidades que afetam a homens e animais. Diariamente, milhões de células se dividem no organismo e a cada divisão os seres vivos sofrem efeito dos carcinógenos ambientais neste processo (WARD, 2002).

Em 1990, com o avanço da biologia molecular e a descoberta dos oncogenes, pesquisadores afirmaram que as neoplasias são consequências das alterações genéticas e/ou epigenéticas envolvendo vários genes fundamentais para o crescimento, proliferação e diferenciação celulares, e ainda para a remoção celular programada (apoptose). Os tumores, em geral, são considerados processos crônicos com etiologia diversificada, onde agentes químicos, físicos ou virais podem ser os responsáveis pelas mutações celulares. São também considerados fenômenos sistêmicos, pois mecanismos complexos que regulam a proliferação celular e o sistema imune sofrem falhas. Em muitos casos, as células defeituosas são capazes de localizar e reparar as mutações sofridas, antes de se proliferarem (DAGLI, 2002; GHOSH e BOSE, 2005; TODOROVA, 2006).

As neoplasias malignas têm rápido crescimento, são menos diferenciadas e mais anaplásicas. Em seu desenvolvimento, grupos de células mais agressivas podem surgir, e o neoplasma se expande invadindo a outros tecidos. Quando invade a corrente sanguínea e linfática, acaba por disseminar metástases, ou seja, novos focos de crescimento neoplásico em distintos locais do organismo (CONNOLLY et al., 2000; LOEB e LOEB, 2000; DAGLI, 2002; TODOROVA, 2006). Neoplasias benignas têm crescimento lento, são menos anaplásicas e não sofrem metástases. Geralmente são fenômenos localizados, mas pode comprimir estruturas importantes, como, por exemplo, o sistema nervoso central. Apesar da denominação, os tumores benignos também são agressivos ao organismo hospedeiro (DAGLI, 2002).

A regulação da proliferação das células, a estabilidade do genoma e a apoptose das células são processos muito importantes para a homeostase.



Este equilíbrio no organismo é mantido por dois tipos de genes: supressores de tumores e oncogenes. Os primeiros são sequências genômicas cujos produtos são necessários para o funcionamento normal da célula, ou seja, a perda da função dessas sequências resulta na formação de tumores. Estes são genes especiais que param a replicação do DNA se a célula sofreu um dano (GHOSH e BOSE, 2005; TODOROVA, 2006). Como exemplo dessa classe de genes pode-se citar o TP53. No entanto, os oncogenes, como as proteínas Wiggless-type (WNT), estão relacionados com a proliferação celular, ou seja, quando sofrem mutações ocorre uma proliferação celular descontrolada das células (HERNÁNDEZ e MENÉNDEZ, 2001; TODOROVA, 2006).

As células de um tumor descendem de uma célula-mãe, que em algum momento iniciou um programa de divisão indevido. A transformação maligna de uma célula acontece por acúmulo de mutações em genes específicos (protooncogenes). Os protooncogenes são sequências gênicas que estimulam a proliferação celular. Quando eles se expressam, passam a ser chamados oncogenes, podendo sofrer mutações que levam a uma proliferação celular descontrolada (HERNÁNDEZ e MENÉNDEZ, 2001; DAGLI, 2002;). Alterações epigenéticas são hereditárias e mediadas por outros fatores que ocorrem fora da seqüência de DNA, como a metilação do DNA na região promotora. Este fenômeno pode alterar a expressão de um determinado gene, como os protooncogenes, aumentando assim as mutações e a instabilidade genômica (PLASS e SOLOWAY, 2002).

Além das mutações que ativam os oncogenes, as mutações que inibem a função dos genes supressores também contribuem para a formação e desenvolvimento dos tumores. A perda de função destes genes faz com que as células manifestem o fenótipo neoplásico (VAYEGO et al., 1998).

As alterações genéticas nos tumores ósseos são muito similares às observadas em outros tipos de tumores. No entanto, em grande parte dos tumores ósseos são observadas alterações cromossômicas envolvendo diferentes genes. Os sarcomas, por exemplo, sofrem translocações formando proteínas quiméricas resultantes do encontro de dois genes alterados. Essas proteínas envolvem-se na tumorigênese como um ativador transcricional anômalo (CHOONG et al., 1997; YOO et al., 1997).

O osteossarcoma surge devido a um erro genético nos genes RB1, TP53 (supressores de tumor) e MDM2. Entretanto, as alterações citogenéticas observadas têm dificultado o descobrimento de algumas regiões envolvidas no desenvolvimento desse tumor (BRIDGE et al., 1997; KLOEN et al., 1997).

A proteína p53, localizada no núcleo celular, produto do gene TP53, regula negativamente a proliferação celular, envolvendo-se no controle da progressão do ciclo celular e na preservação da estabilidade genética. Quando ocorre acúmulo de lesões no DNA, e erros na regulação do ciclo celular, essa proteína se eleva, ativando os genes envolvidos no controle negativo da proliferação celular e genes de reparo do DNA. Portanto, a elevada produção da proteína p53 possui atuação na supressão da proliferação celular, induzindo a apoptose e a diferenciação celular (HARRINGTON et al., 1994; SHERR, 1996).

KIRPENSTEIJN et al. (2008) investigando mutações no gene TP53 em cães com osteossarcoma, verificou que de 58 cães com osteossarcoma, 24 deles tinham mutações neste gene. A incidência de mutações no gene TP53 em cães com esta neoplasia é maior do que em humanos. Isto pode ser explicado pelo fato de que em cães a doença acomete com mais frequência os animais idosos, ao passo que em humanos, afeta em maior parte crianças e adolescentes. Estudos de HAGA et al. (2001); LEE et al. (2004), e TODOROVA (2006) mostraram que a mutação do gene TP53 em cães indica um severo aumento do potencial maligno nas células tumorais e, conseqüentemente, um mau prognóstico para indivíduos com câncer.

O oncogene celular MDM2 também está amplificado no osteossarcoma. A proteína mdm2 pode ligar-se à p53 bloqueando a regulação do ciclo celular e impedindo o efeito antiproliferativo. O gene RB1 codifica uma fosfoproteína nuclear (pRb), com papel fundamental na regulação do ciclo celular (VAYEGO et al., 1998). Este gene também se combina a outras proteínas, como a E2F, influenciando diretamente no ciclo celular, gerando erros irreversíveis na ativação e inibição de outros genes envolvidos na divisão celular (HERNÁNDEZ e MENÉNDEZ, 2001).

Diversos fatores de crescimento têm implicações diretas nos vários tipos de câncer. As WNT são um grupo de proteínas moduladoras da

proliferação celular e embriogênese. Muitas destas proteínas têm sido identificadas em linhagens celulares de osteossarcoma humano. O gene LRP5 também foi identificado em diversos subtipos de osteossarcoma e sua expressão está correlacionada diretamente com eventos metastáticos (HAYDEN e HOANG, 2006).

O desenvolvimento de metástases é um processo complexo de disseminação do tumor primário, que geralmente ocorre por via hematológica. Contudo, para que as metástases ocorram, as células tumorais implantadas em um novo tecido devem criar o seu próprio ambiente microvascular, chamado angiogênese tumoral, na qual é mediada por muitas substâncias que auxiliam na formação dos vasos sanguíneos (FIDLER e ELLIS, 1994; NUGENT e IOZZO, 2000). Estudos recentes, utilizando murinos, mostram que há um rápido desenvolvimento de metástases após a retirada do tumor primário. Isto se deve a um alto nível de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da endostatina, observados na maioria dos indivíduos que tiveram metástases após a remoção do tumor primário (HAYDEN e HOANG, 2006).

Em um processo de metástase as células tumorais devem se mover vencendo barreiras, invadindo as células vizinhas e tecidos adjacentes. Com isso, elas precisam separar-se umas das outras, perdendo assim a adesão, considerada fundamental durante a fase de crescimento tumoral. O próximo passo é chegar até a corrente sanguínea, onde estarão vulneráveis ao ataque do sistema imunológico. Ao encontrarem o parênquima de outros órgãos, começam a multiplicação novamente (WARD, 2002).

Com o avanço da genética, futuramente será possível desativar oncogenes inadequadamente ativados, induzir células defeituosas a sofrer apoptose, impedir proliferação e metastatização à distância, além de reintroduzir cromossomas ou segmentos destes para reverter células malignas ao seu fenótipo normal (WARD, 2002). Na Medicina Veterinária existem vários estudos em busca de vacinas contra os diversos tipos de câncer (PIEKARZ et al., 2006). As vacinas antitumorais agem ativamente sobre o sistema imune do hospedeiro tornando-se um agente coadjuvante no tratamento do câncer primário, inibindo também as metástases e,

consequentemente, melhorando a qualidade de vida do animal (FELIZZOLA, 2008).

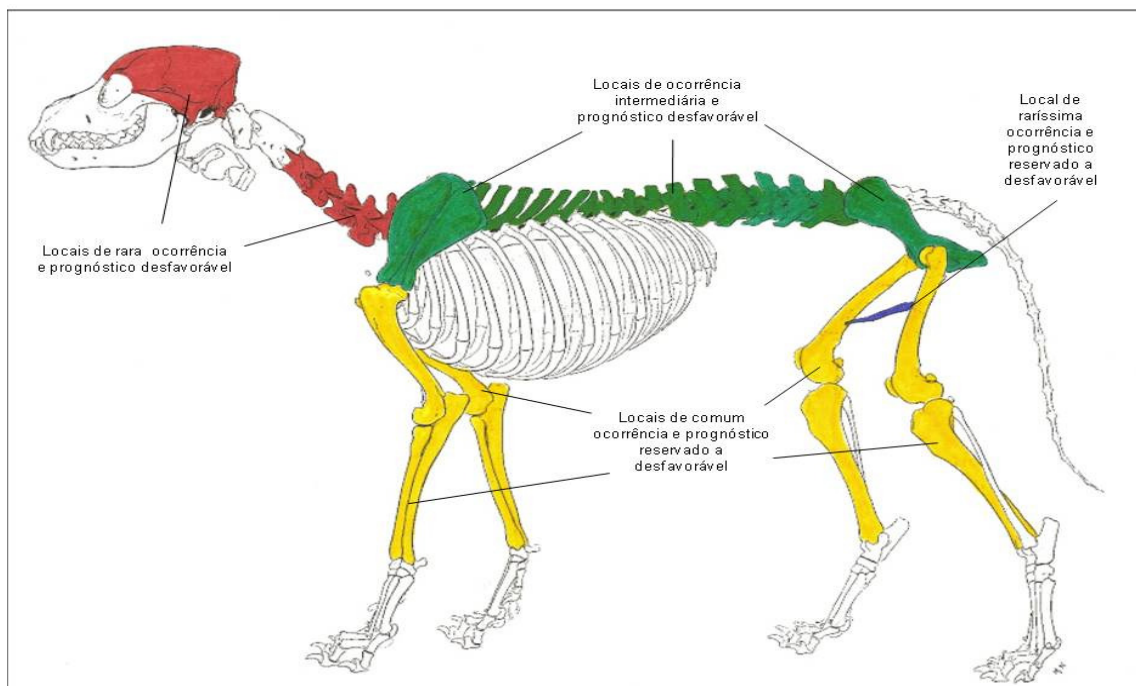
## **2.2 Osteossarcoma canino**

### **2.2.1 Etiologia e epidemiologia**

O osteossarcoma é um tumor de células mesenquimais malignas de origem óssea que afeta especialmente cães de raças grandes e gigantes, correspondendo a 80-85% dos tumores ósseos e 5-6% de todos os tumores. O risco de desenvolvimento deste tumor é, em média, 125 vezes maior em cães com peso acima de 36 Kg do que em cães com peso abaixo de 9 Kg. Ele ocorre principalmente em cães de meia idade (média de 7 anos) (LACRETA, 2002; DERNELL, 2003; KLEINER, 2003).

Entre as raças mais acometidas mundialmente pelo osteossarcoma estão: Pastor Alemão, Rottweiler, Dogue Alemão, Dobermann, São Bernardo, Setter Irlandês e Golden Retriever. No Brasil, cães da raça Fila Brasileiro apresentam esta neoplasia com grande frequência. Em machos a incidência é maior do que em fêmeas, entretanto, o osteossarcoma no esqueleto axial acomete mais as fêmeas do que os machos (HEYMAN, 1992; HULSE, 2002; DALECK et al., 2006; DERNELL, 2007). Estudos de CAVALCANTI et al. (2004) verificaram que de 50 animais, 31 (62%) eram fêmeas, embora não tenha sido realizada uma correlação entre sexo e local da lesão.

Vinte e cinco por cento dos cães com esta neoplasia apresentam envolvimento do esqueleto axial e em 75% dos casos o esqueleto apendicular é acometido (HEYMAN, 1992; WATERS, 1998). Os ossos mais afetados são úmero, rádio, ulna, fêmur e tíbia. A ocorrência do osteossarcoma é maior nos membros torácicos, pois suportam 60% do peso corporal (MOORE, 2001) (Figura1).



**Figura 1** – Esqueleto canino apresentando locais de ocorrência de osteossarcoma seguidos do prognóstico.

O osteossarcoma extra-esquelético abrange uma pequena porcentagem dos casos em cães (1%). Acomete geralmente cães idosos (11 anos em média), e não possui predisposição sexual; as raças mais afetadas são Rottweiler e Beagle dentre outras (LANGENBACH, 1998). Os locais de maior ocorrência são glândula mamária, trato gastrointestinal, tecido subcutâneo e fígado, mas há relatos em outros órgãos (JOHNSON, 2002).

A causa desta neoplasia é desconhecida, mas acredita-se que seja de etiologia multifatorial. Estudos evidenciam a participação de células pluripotenciais indiferenciadas na etiopatogênese, adicionado a fatores hereditários e ao gene TP53 (THOMSEN, 1999; BAILEY, 2007). A neoplasia tem início em locais adjacentes às fises de fechamento tardio (metáfises). Estas regiões têm grande atividade mitótica que, adicionada a pequenos traumas, predispõe o desenvolvimento de linhagens de células mutantes (THOMPSON, 2007; DERNELL, 2007).

Alguns autores relatam casos de osteossarcoma em cães que sofreram implantes metálicos ou enxerto cortical localizado no sítio da fratura (FRANCO, 2002). Comenta-se também a importância viral na etiologia desta

neoplasia, pois pode ocorrer tanto em ninhadas, como pode ser induzido experimentalmente em fetos (DALECK et al., 2002).

### 2.2.2 Clínica e patologia

O osteossarcoma canino é muito similar ao humano, no qual a região metafisária dos ossos longos é a mais afetada, causando claudicação e aumento de volume do membro afetado. Osteossarcomas podem ser classificados em esquelético e extra-esquelético, dependendo da localização do tumor (MUNDAY et al., 2004). Ao exame físico os cães apresentam tumefação dolorosa, que pode ou não acometer os tecidos moles adjacentes. Os neoplasmas do esqueleto axial apresentam-se firmes a palpação e com tumefação localizada (SELMÍ et al., 2003; KLEINER e SILVA, 2003; NELSON e COUTO, 2006). É incomum o aparecimento de ulceração (CAVALCANTI et al., 2004).

Os sinais de neoplasia nos membros caracterizam-se por edema com ou sem claudicação. Já quando a área afetada localiza-se no esqueleto axial, os sinais variam conforme a região afetada. Os sinais sistêmicos como hipertermia, anorexia ou perda de peso são incomuns no estágio agudo da doença (FOSSUM, 2001; DALECK et al., 2002; KLEINER e SILVA, 2003). Geralmente a fase aguda resulta em suspeita de problema ortopédico não-neoplásico, o que leva a um retardo no diagnóstico e terapia do neoplasma. O osteossarcoma provoca rarefação do osso acometido e assim, pode causar fraturas patológicas (DALECK et al., 2002).

O osteossarcoma extra-esquelético primário mostra comportamento biológico agressivo e alto poder de metastatização (60-85% dos casos). Animais com as regiões extra-esqueléticas afetadas podem apresentar sinais de letargia, anorexia, aumento de volume abdominal e hematuria (MUNDAY et al., 2004). Estudos sugerem que esta neoplasia em tecidos moles possa surgir de uma metaplasia de tecido conectivo secundária a uma irritação ou trauma, uma proliferação de células mioepiteliais em tecido glandular ou uma infecção por *Espirocerca lupi*, no osteossarcoma esofágico (STIMSON, 2000). Na ocorrência de mineralização dos tecidos moles periarticulares, não havendo evidência de lise óssea adjacente pode-se atentar para um

osteossarcoma sinovial, embora seja de raríssima frequência (THAMM, 2000).

O osteossarcoma é um neoplasma muito agressivo, tanto no local de proliferação quanto nas metástases. Aproximadamente 98% dos casos apresentam micrometástases ao diagnóstico, entretanto, apenas 5% dos cães com osteossarcoma apresentam evidência radiográfica de metástase pulmonar. Estas só irão causar sinais clínicos em estágios avançados, fazendo com que a maioria dos cães seja eutanasiada (BERG, 1996; STRAW, 1996; DALECK et al., 2008).

As neoplasias frequentemente produzem substâncias que desencadeiam o aparecimento de sinais distantes tumor primário e de suas metástases. Estes sinais são nomeados síndromes paraneoplásicas e incluem manifestações endócrinas, hematológicas, gastrointestinais, renais, cutâneas e neurológicas que não são causadas por invasão, obstrução ou efeito da neoplasia. No osteossarcoma é comum a elevação da enzima fosfatase alcalina induzida pelas células neoplásicas (DALECK et al., 2008).

Este tumor é classificado em seis subgrupos histológicos: osteossarcomas osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, de células gigantes, pobremente diferenciado e telangiectásico, não existindo diferença quanto à biologia tumoral entre estes grupos (STRAW, 1996; DALECK et al., 2002; JOHNSON e HULSE, 2005).

Aspirados de osteossarcoma frequentemente possuem muitas células neoplásicas dispostas individualmente ou agrupadas. Uma característica evidente nos esfregaços é a presença de matriz osteóide de coloração rósea ao redor das células neoplásicas. As células tumorais apresentam-se de formas arredondada ou fusiforme com anisocitose. Geralmente há figuras de mitose anormal (ROSSEN et al., 2000). Outras características, ainda possuem multinucleação, cariomegalia, anisocariose com grandes e múltiplos nucléolos. O citoplasma é tipicamente basofílico e pode conter vacúolos. Além das células neoplásicas, pode-se encontrar em aspirados de osteossarcomas células inflamatórias, osteoblastos e osteoclastos não-neoplásicos (COWELL et al., 2008).

### 2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico inclui várias etapas, baseando-se na história clínica, exame físico e laboratorial além de radiografias, cintilografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (DAVIS, 2002). Entretanto, para a confirmação da neoplasia é muito importante a realização de exame citopatológico e histopatológico (DALECK et al., 2002; OLGIVIE, 2004). O estadiamento é imprescindível para a elaboração de condutas terapêuticas, minimizando tratamentos agressivos ao animal. Exame ortopédico cuidadoso seguido de radiografias com alto padrão ajudam a detectar metástases em ossos longos, no esqueleto axial e em outros órgãos susceptíveis, além de determinar a melhor área do tumor a ser biopsiada (CASSONE et al., 1996; HILLERS et al., 2005).

#### 2.2.3.1 História clínica

O principal sinal clínico do cão com osteossarcoma apendicular é a claudicação e em lesões axiais encontra-se aumento de volume e dor à palpação. Em alguns casos o proprietário relata que o cão sofreu algum trauma e após iniciou a claudicação (DERNELL, 2001).

Em certos casos pode-se associar dificuldade respiratória com metástase pulmonar (CAVALCANTI et al., 2004, JOHNSON e HULSE, 2005). Os sinais clínicos associados com o esqueleto axial variam conforme o local da lesão, gerando aumentos de volume, dor localizada, exoftalmia, deformidade facial, descargas nasais e sinais neurológicos.

Nas lesões vertebrais podem ocorrer paralisia e sinais agudos de claudicação (DALECK et al., 2006; JOHNSON e HULSE, 2005). Para o diagnóstico definitivo de um osteossarcoma extra-esquelético deve-se buscar por evidências de neoplasias ósseas primárias, além da investigação familiar desse tipo de tumor (THAMM, 2000).



### 2.2.3.2 Bioquímica sérica

Os parâmetros dos minerais séricos de cães com osteossarcoma fogem da normalidade. Concentrações de cromo, zinco e ferro, assim como a capacidade de ligação deste último, encontram-se muito reduzidas em relação a cães saudáveis (KAZMIERSKI, 2001; KLEINER e SILVA, 2003). A enzima fosfatase alcalina tem grande valor no diagnóstico e prognóstico desta neoplasia, podendo evidenciar metástases quando se apresenta elevada (FOSSUM, 2001; DALECK et al., 2002). A bioquímica sérica renal e hepática em conjunto com o hemograma completo deve ser preconizada, principalmente após o início da terapia com antineoplásicos (JOHNSON e WATSON, 2004).

### 2.2.3.3 Radiologia

O exame radiológico é muito importante para avaliar a extensão da lesão e diferenciar certas lesões ósseas não-neoplásicas como fraturas, osteomielite e doenças metabólicas (DALECK et al., 2002). A radiografia do neoplasma de origem óssea caracteriza-se por um padrão lítico e/ou proliferativo na metafise do osso acometido. Este tumor parece originar-se da medular óssea, invadindo a camada cortical e chegando aos tecidos moles adjacentes. A formação do periósteo adjacente ao osso desenvolve o triângulo de Codman, patognomônico deste neoplasma (Figura 2), composto pelo córtex da área acometida juntamente com a proliferação periosteal (NELSON e COUTO, 2006). Após a obtenção da imagem radiográfica de osteossarcoma, realizam-se incidências torácicas à procura de metástase pulmonar, embora a maioria dos cães já possua micrometástases no momento do diagnóstico. Para uma melhor visualização devem ser feitas três posições radiográficas de tórax para a detecção das metástases (BERG, 1996; STRAW, 1996; JOHNSON e WATSON, 2004).



**Figura 2** – Radiografia mostrando área de rarefação óssea e reatividade periosteal na extremidade proximal do úmero direito.

#### 2.2.3.4 Cintilografia e tomografia computadorizada

A cintilografia óssea é um exame muito sensível na detecção de qualquer lesão óssea, sendo mais eficiente que o exame radiográfico, porém, não é específica para lesões tumorais. Qualquer região com atividade osteoblástica pode ser identificada (GOMES et al., 2008). Utiliza-se um radiofármaco ( $^{99m}\text{TcMD}$  – metileno difosfato marcado com tecnésio 99m) que se incorpora a matriz cristalina do esqueleto e reflete as condições do metabolismo ósseo (DALECK et al., 2002; KLEINER e SILVA, 2003).

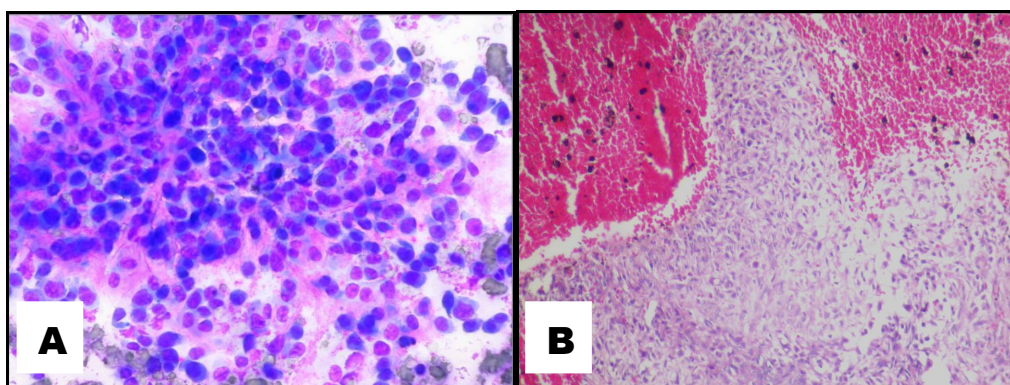
A tomografia computadorizada ou a ressonância magnética podem ser úteis quando se planeja uma cirurgia, principalmente em tumores localizados no esqueleto axial. Estes exames promovem a visualização dos tecidos moles envolvidos (STRAW, 1996; DALECK et al., 2002; KLEINER e SILVA, 2003).

#### 2.2.3.5 Citopatologia e histopatologia

Alterações inflamatórias e tumorais podem ser diferenciadas através da citologia, propiciando assim a definição de um prognóstico. No entanto,

quando o diagnóstico citológico é inconclusivo, necessita-se de uma confirmação histopatológica (WELLMAN, 1990). A citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) é uma das técnicas utilizadas para a coleta de tecido neoplásico. Esta tem sido empregada, tanto na medicina humana quanto na veterinária, como método diagnóstico em lesões de diversas origens (SUZANO, 2004).

A CAAF possui várias vantagens em relação a outros métodos de diagnóstico, como rapidez nos resultados, baixo custo, boa eficácia, pouca invasividade e riscos mínimos à vida do animal, já que não é necessária anestesia geral (TEIXEIRA et al., 2008). Outra vantagem é a rápida cicatrização no local da punção, permitindo início precoce da terapia adjuvante (CASSONE et al., 1996). Desta forma podem ser realizadas múltiplas coletas para obtenção de material satisfatório, evitando resultados inconclusivos. O exame citopatológico proporciona aos clínicos diagnósticos rápidos, seguros e definitivos na maioria das situações (SUZANO, 2008). Entretanto, o exame histopatológico é considerado padrão por possuir amostragem significativamente maior e manter a arquitetura do tecido (BERZINA, 2008) (Figura 3).



**Figura 3** – Comparação entre exame citopatológico (A) e histopatológico (B) de osteossarcoma canino. Panótico rápido, 200x.

## 2.2.4 Tratamento

### 2.2.4.1 Cirurgia

O tratamento, na maioria dos casos, para cães com osteossarcoma é o cirúrgico acompanhado de quimioterapia antineoplásica. A sobrevivência de cães com lesão apendicular após o procedimento cirúrgico é, de quatro meses, em média. Entretanto, cães tratados com amputação seguida de quimioterapia sobrevivem aproximadamente um ano (NELSON e COUTO, 2006).

O procedimento adotado para cães com neoplasia apendicular é a remoção do membro, contudo, nos casos em que não há metástases, pode-se optar pela ressecção óssea utilizando-se um enxerto homólogo com implante de tecido ósseo congelado juntamente com a quimioterapia (MORELLO, 2001). A maior desvantagem da cirurgia com preservação do membro é a infecção pós-operatória devido ao longo tempo de cirurgia, emprego de enxertos grandes e pouco revestimento por tecidos moles, levando ao desenvolvimento de osteomielite. Quando isto ocorre, geralmente o membro é amputado (DALECK et al., 2002; NELSON e COUTO, 2006).

A amputação sempre é bem tolerada pelos cães e estes não apresentam dificuldades e decréscimo na atividade física geral. A maior parte dos cães com osteossarcoma apendicular tem o membro amputado, exceto naqueles com alterações ortopédicas e/ou de raças gigantes (BERG, 1996; STRAW, 1996; DALECK, 2002).

O tratamento cirúrgico deve ser considerado paliativo quando realizado isoladamente. O membro ou a região afetada pelo tumor devem ser removidos com boa margem de segurança (3 cm), evitando assim a proliferação de novos tumores (BERG, 1996). Esta afirmação torna-se igualmente válida para tumores extra-esqueléticos, visto que apresentam alto poder recidivante (SILVEIRA, et al., 2006).

### 2.2.4.2 Quimioterapia

Assim como nos humanos, os animais respondem ao tratamento de acordo com o seu sistema imunológico. A quimioterapia antineoplásica na

medicina veterinária tem objetivo de prolongar a vida do animal, diferentemente do que se preconiza na medicina humana, a cura do paciente (BERG, 1996; DALECK et al., 2002). Os quimioterápicos mais utilizados no combate ao osteossarcoma são cisplatina, carboplatina e doxorubicina. Dentre estas drogas, destaca-se a primeira (GUILLERMO, 1998; KIRPENSTEIJN, 2002).

A cisplatina é um quimioterápico conhecido por manter grandes intervalos livres de doença, aumentando a sobrevida do animal. Os principais efeitos colaterais são a nefro e/ou ototoxicidade, distúrbios gastrointestinais e mielossupressão. Quando usada com um protocolo de diurese salina, minimiza as reações tóxicas ao organismo do animal. Dentre os vários protocolos o mais utilizado e seguro é o esquema de quatro horas de hidratação, onde a solução salina é administrada por via intravenosa a 25 mL/kg/h, durante quatro horas. A cisplatina é administrada por aproximadamente 20 minutos em infusão lenta, seguido por mais uma hora de solução salina intravenosa. Este protocolo repete-se a cada três semanas, sempre mantendo a monitoração do animal com exames de função renal principalmente (GUILLERMO, 1998; DALECK et al., 2002; KIRPENSTEIJN, 2002).

Estudos demonstram que as terapias convencionais podem falhar quando clones heterogêneos de células emergem do tumor primário, formando metástases resistentes aos quimioterápicos (BERG et al., 1997). KURZMAN et al. (1995) analisando a associação de muramil tripeptídeo-fosfatidiletanolamina encapsulado em lipossomos (L/MTP-PE) com a cisplatina, obtiveram resultados satisfatórios no tratamento antineoplásico após a amputação. Portanto, a combinação deste polissacarídeo com a quimioterapia após a retirada do membro aumentou a média de sobrevida dos cães.

Alternativas de tratamento realizadas por HAHN et al. (1996), na tentativa de aumentar a resposta à terapia em cães com osteossarcoma não tratáveis com cirurgia, propuseram a administração de cisplatina intramedular no local do tumor primário. Cinquenta por cento dos cães tratados tiveram resultados positivos, observando-se remissão completa do tumor, entretanto,

em 25% houve remissão parcial e os restantes continuaram com progressão do tumor.

Outro método alternativo consiste em liberar altas doses de cisplatina no local da ferida cirúrgica e baixas doses sistemicamente, por meio de um polímero biodegradável denominado ácido polilático contendo cisplatina. O modo de liberação lenta promove o controle das metástases, pois a cisplatina liberada do implante penetra nos vasos sanguíneos disseminando-se pelo organismo (DERNELL et al., 2007).

A doxorubicina em conjunto com a cisplatina tem aumentado a sobrevida dos animais, pois estes fármacos possuem diferentes mecanismos de ação. A principal vantagem da primeira em relação à segunda é a facilidade de administração, não necessitando de diurese salina quando infundida sozinha. O intervalo de administração é de duas semanas (GOMES, 2008).

A carboplatina é menos nefrotóxica que a cisplatina, e ambas mantêm características similares. Para este tratamento não é necessária a diurese salina, administrando-se a droga em intervalos de três semanas (BERGMAN et al., 1996; DERNELL et al., 2001).

Cuidado deve ser tomado quanto à supressão da medula óssea e lesão renal. Antes da quimioterapia é importante que os cães possuam leucócitos totais acima de 3000/ $\mu$ L, plaquetas acima de 150000/ $\mu$ L, valores normais de uréia e creatinina séricas, densidade urinária dentro dos parâmetros de referência, ausência de proteinúria e cilindros no sedimento urinário (BOUVY, 2003; KLEINER e SILVA, 2003; RODASKI e DE NARDI, 2006).

O quadro 1 mostra os diferentes tipos de antineoplásicos usados no tratamento para o osteossarcoma acompanhados das suas doses, via de administração e período de tratamento:

PRINCÍPIO ATIVO COM RESPECTIVAS DOSES, VIA DE ADMINISTRAÇÃO E PERÍODO DE TRATAMENTO:		
<b>Cisplatina</b>	70 mg/m <sup>2</sup> IV	Período de 4 a 6 seções; intervalo de 21 dias entre as aplicações
<b>Carboplatina</b>	300 mg/m <sup>2</sup> IV	Período de 4 a 6 seções; intervalo de 21 dias entre as aplicações
<b>Doxorrubicina</b>	30 mg/m <sup>2</sup> IV	Período de 4 a 6 seções; intervalo de 15 dias entre as aplicações

**Quadro 1** – Antineoplásicos frequentemente utilizados no tratamento do osteossarcoma.

Com relação ao início do tratamento quimioterápico, é recomendado que a primeira aplicação aconteça de 2 a 4 semanas após a cirurgia, pois quando iniciada logo após a operação poderá inibir a cicatrização da ferida, além de suprimir a medula óssea. Entretanto, se iniciada logo após a cirurgia, o tempo de sobrevida aumenta. Portanto, o tratamento é iniciado após uma semana do período pós-operatório (BERG, 1996).

#### 2.2.4.3 Radioterapia

A radioterapia é considerada um método muito útil para o tratamento do osteossarcoma, gerando alívio e redução da dor, assim como retardo do crescimento neoplásico. Este procedimento é indicado em casos onde a remoção cirúrgica é impossível, por exemplo, quando há metástases no esqueleto axial (AAS, 1999; GREEN, 1999). O tratamento é realizado com emissão de altas doses de radiação por um período de três semanas, em média (JOHNSON e WATSON, 2004). A radioterapia paliativa não está associada com efeitos colaterais agudos e redução na qualidade de vida, entretanto, em alguns casos, pode-se notar alopecia e despigmentação do pelo após a quarta seção (LIPTAK et al., 2004). Radiofármacos, como samarium tem sido utilizado em cães com metástases ósseas, mas o tratamento tem custo elevado, além da baixa disponibilidade do produto (LIPTAK et al., 2004; BONAGURA e TWEDT, 2009).

#### 2.2.4.4 Imunoterapia e terapia gênica

A imunoterapia associada à quimioterapia possibilita o aumento do efeito antitumoral sem causar conflitos entre mecanismos de ação e toxicidade ao animal (MACEWEN e KURZMAN, 1996).

SHI et al. (1993) combinando L/MTP-PE com a doxorubicina, observou que a presença de células mononucleares e o fator de necrose tumoral se elevaram. Por outro lado, cães tratados com amputação, cisplatina e imunoterapia com L/MTP-PE tiveram o tempo médio de sobrevida ampliado para 14,4 meses, em relação a outros que foram tratados com amputação e cisplatina, com sobrevida de, no máximo, 11 meses (MACEWEN e KURZMAN, 1996).

A terapia gênica consiste na inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos na tentativa de evitar doenças. A terapia com Interleucina 2 no osteossarcoma canino tem aumentado significativamente o tempo de sobrevida. Ainda, pode-se citar a endostatina, atuando na inibição da angiogênese tumoral (KAMSTOCK et al., 2006).

#### 2.2.5 Prognóstico

A agressividade do osteossarcoma varia conforme a idade do hospedeiro e de acordo com o local acometido. Cães jovens apresentam grau de malignidade, escore e índice mitótico mais elevado que cães idosos assim como o tumor apendicular têm maior índice mitótico que o axial (LOUKOPOULOS e ROBINSON, 2007).

Os cães que recebem somente tratamento cirúrgico sobrevivem em média 5 meses, chegando a 1 ano em 10% dos casos (BERG, 1996; DERNELL et al., 2007). Entretanto, animais tratados com amputação seguida de quimioterapia com cisplatina sobrevivem em média 9 meses em 40% dos casos (JOHNSON e HULSE, 2005).

Animais com lesões metastáticas visíveis têm prognóstico extremamente reservado, uma vez que a sobrevida torna-se impossível de ser prolongada com agentes quimioterápicos (BERG, 1996; DERNELL et al., 2007). Quando visíveis, as metástases pulmonares levam o animal a um



estado de caquexia rapidamente, além da dificuldade respiratória. Isso faz com que os proprietários optem pela eutanásia, minimizando sofrimentos (JOHNSON e HULSE, 2005). Metástases em linfonodos regionais são incomuns, entretanto esta ocorrência indica um mau prognóstico (HILLERS et al., 2005).

A presença do osteossarcoma em tecidos extra-esqueléticos, como órgãos internos, sempre indicará um péssimo prognóstico. No entanto, o osteossarcoma cutâneo e subcutâneo poderá apresentar prognóstico reservado se for corretamente tratado (LANGEBANCH et al., 1998, KLEINER & SILVA, 2003, MUNDAY et al., 2004).

Cães tratados cirurgicamente (tanto amputação como procedimentos com preservação do membro) em associação com quimioterapia (cisplatina) possuem boa taxa de sobrevivência, embora existam complicações pós-operatórias referentes à preservação do membro (JOHNSON e HULSE, 2005; JEHN et al., 2007).

### **2.3 Comparação entre citopatologia e histopatologia**

A CAAF foi pela primeira vez utilizada na década de 1930, em pacientes humanos, para diagnóstico de tumores malignos. A utilização desta técnica obteve muito sucesso e atualmente faz parte dos exames de rotina na medicina humana. Na medicina veterinária o uso da CAAF como meio diagnóstico chegou na década de 1980, diferenciando neoplasias, hiperplasias, inflamações e degenerações em animais (GUEDES et al., 1997; GUEDES et al., 2000).

O exame citopatológico consiste na avaliação morfológica das células de um tecido, auxiliando no diagnóstico e prognóstico das doenças. Muitas vantagens são atribuídas à CAAF como simplicidade da coleta (pouco invasiva), baixo custo, rapidez e eficácia dos resultados (CLINKENBEARD e COWELL, 1994; LARKIN, 1994; GUEDES et al., 1997; TEIXEIRA e LAGOS, 2007). Com ela podemos diferenciar doenças infecciosas, inflamatórias, proliferativas e neoplásicas. A histopatologia tem vantagem sobre a citopatologia em relação à arquitetura tecidual e morfologia celular, por isso os diagnósticos histopatológicos são mais específicos e definitivos.

Entretanto, em muitos casos, o diagnóstico citopatológico também é considerado definitivo, como nos tumores com células bem diferenciadas (WELLMAN, 1990; GRAÇA, 2007).

MEYER e FRANKS (1986) afirmam que os resultados obtidos pelo exame citopatológico está diretamente relacionado à qualidade da técnica e confecção das lâminas, juntamente com o tipo de coloração aplicado. A interpretação da amostra também é de fundamental importância para o direcionamento do resultado (CUNHA, 1987; MEYER, 1987). Há situações em que o exame citopatológico é mais fácil do que o histopatológico, como, por exemplo, em neoplasias com granulação, como mastocitomas e melanomas. Ainda, em certos casos de sarcomas e leucemias, o exame citopatológico através da CAAF possui melhor eficácia para o diagnóstico do que a histopatologia (MONTES, 1997).

Na medicina veterinária, vários autores comparam as duas técnicas, concluindo que a histopatologia permite o diagnóstico definitivo devido à visualização da arquitetura tecidual (HEWICKER et al., 1990; TVEDTEN, 1994; MAGALHÃES et al., 2001). No entanto, a histopatologia apresenta maior precisão quando associada aos resultados da citopatologia, podendo-se assim dizer que estas duas técnicas complementam uma à outra (MORRISON e DE NICOLA, 1993; OGILVIE e MOORE, 1995). TVEDTEN (1994) cita algumas limitações em relação à citopatologia como método diagnóstico: especificidade, no caso de neoplasias, e erros de coloração, levando a imprecisão do diagnóstico.

A técnica para obtenção das amostras varia de acordo com o local da lesão, tipo de tecido e alterações clínicas desenvolvidas pela neoplasia (WELLMAN, 1996; MONTES, 1997; COWELL et al., 2008). A técnica de punção aspirativa é a mais utilizada por ser um método simples para diferenciar uma lesão inflamatória de uma neoplasia (EDWARDS, 1994). A lesão provocada pela agulha fina é mínima comparada a uma biópsia. Portanto, em neoplasmas malignos, as chances de ocorrência de metástases após a coleta são praticamente nulas (GUEDES et al., 1997).

A técnica de CAAF consiste no isolamento manual do nódulo ou região a ser puncionada, introduzindo-se uma agulha fina (Figura 4), de tamanho adequado ao local de punção, acoplada a uma seringa estéril de 10 a 20 mL,

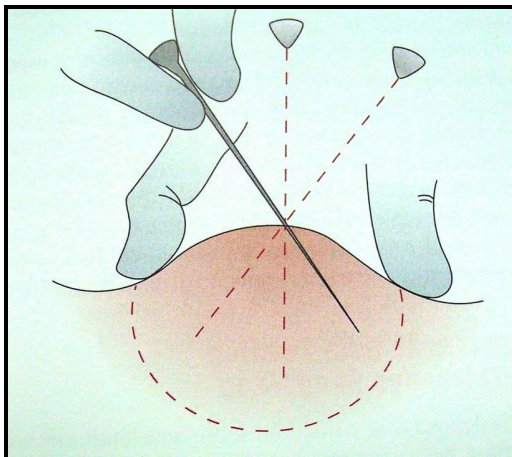
com ou sem o uso de citoaspirador (Figura 5). Dependendo do tamanho da lesão, deve-se puncionar em diversos pontos (Figura 6) com o propósito de se obter amostra significativa da população de células. Após a coleta de material, a amostra é colocada sobre uma lâmina de vidro limpa e seca (Figura 7), confeccionando-se, no mínimo, três esfregaços (COUTO, 1994; OGILVIE e MOORE, 1995; GUEDES et al., 1997; MONTES, 1997; COWELL et al., 2008). Contudo, nos casos de osteossarcoma a amostra pode ser obtida por punção com agulha 18 G, pois se trata de uma neoplasia de consistência dura e pouco esfoliativa (MAGALHÃES et al., 2001).



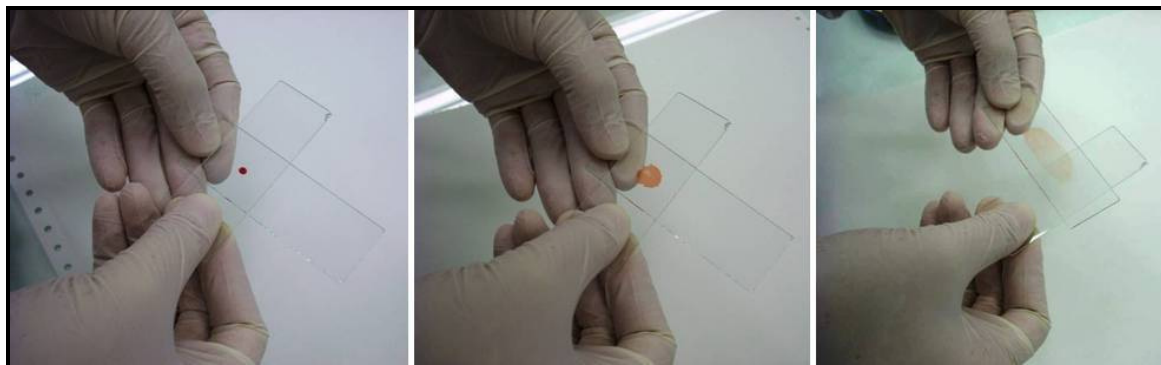
**Figura 4** – Agulhas comumente utilizadas para PAAF.



**Figura 5** – Citoaspirador utilizado para PAAF.



**Figura 6** – Punção por agulha fina: massa contida com a mão não dominante e punção realizada em várias direções. Fonte: DALECK, 2008.



**Figura 7** – Esfregaço tipo *squash*. Uma pequena parte do material colhido é colocada sobre a lâmina, enquanto a outra é deslizada sobre ele (esquerda para a direita).

Para a realização do exame histopatológico necessita-se de biópsia, onde é obtida uma amostra representativa do tumor. Este tipo de coleta é como qualquer outro procedimento cirúrgico, ou seja, o animal não está livre dos riscos e de outras complicações. A via de acesso ao tumor deve ser bem planejada, com mínima manipulação e sem distorcer a estrutura tumoral. Existem dois tipos de biópsia: incisional e percutânea. A primeira é considerada o procedimento de maior precisão e confiabilidade, no entanto, a precisão da biópsia percutânea para tumores ósseos vem ganhando espaço (MANKIN et al., 1996; JESUS-GARCIA, 2005).

A CAAF é um procedimento bem indicado em locais de difícil acesso, como por exemplo, a coluna vertebral e a pelve. Contudo, apresenta como principal desvantagem, o pequeno tamanho das amostras, podendo não

haver representatividade da lesão. Agulhas tipo *thru-cut* permitem a coleta de amostras de tecidos moles significativamente de bom tamanho, possibilitando, além do diagnóstico citológico, o histológico. No entanto, para biópsia óssea prefere-se a agulha de Jamshidi, que possui uma ponta de metal capaz de perfurar a camada cortical do osso, sendo muito útil para tumores que acometem as epífises, as metáfises e os ossos planos (SIQUEIRA et al., 2008). Algumas complicações comuns nas biópsias incisionais são: infecção do trajeto biopsiado e fratura patológica. No entanto, estes problemas raramente ocorrem nas biópsias com agulha (CASSONE et al., 1996).

SKRZYNSKI et al. (1996) compararam resultados de biópsia incisional com a CAAF, concluindo que esta possui boa acurácia e baixo custo. Além disso, salientaram a importância da realização deste procedimento em ambulatório. Ainda, obtiveram 84% de punções por agulha fina corretas versus 96% de biópsias incisionais corretas, ambas realizadas por oncologistas, concluindo que a CAAF está indicada para pacientes previamente estadiados. Em um estudo demonstrando a eficácia da CAAF nas lesões músculo-esqueléticas comparada com outros métodos de biópsia, MOORE et al (1979) concluíram que a CAAF possui uma taxa de 80% de sucesso em lesões suspeitas de malignidade, sendo preferível, portanto, por possuir baixos índices de complicações.

Vários tipos de colorações podem ser utilizados na citopatologia. Os corantes mais usados são: Romanowsky (Wright, Giemsa, Diff-Quik, DipStat) e Papanicolau. Cada corante apresenta um procedimento de coloração recomendado, que pode ser adaptado de acordo com a espessura do esfregaço e à preferência do avaliador (HENDRIX, 2006). Entretanto, na histopatologia, o corante mais utilizado é hematoxilina e eosina (MAGALHÃES et al., 2001).

Os corantes tipo Romanowsky fornecem detalhes celulares e melhores contrastes entre núcleo e citoplasma, considerados como corantes permanentes. No entanto, detalhes intranucleares ficam pouco definidos (MAGALHÃES et al., 2001). O corante de rotina deve sempre estar em bom estado, pois qualquer contaminação ou precipitação das soluções pode danificar os esfregaços.

O aumento da longevidade dos animais de estimação, principalmente os cães, leva, cada vez mais, a uma busca por diagnóstico e tratamento ideal para certas doenças, como o câncer. Existem neoplasias muito agressivas e de curso rápido, como o osteossarcoma, fazendo com que os proprietários separem-se mais cedo de seus cães. Portanto, este estudo pretende avaliar a eficácia da PAAF como método de coleta no diagnóstico histopatológico de osteossarcoma canino, enfatizando a técnica por não causar danos aos pacientes.

### **3 MANUSCRITO**

Os resultados do trabalho desenvolvido durante o período de Residência Médico-Veterinária serão apresentados na forma de um artigo, seguindo as normas da Revista Ciência Animal Brasileira, para a qual foi submetido.

#### **3.1 Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino**

Autores: Luciele Varaschini Teixeira, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Danieli Brolo Martins, Raqueli Teresinha França, Rafael Almeida Fighera

## PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA COMO MÉTODO DE COLETA DE MATERIAL PARA A HISTOPATOLOGIA NO OSTEOSSARCOMA CANINO

LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA<sup>1\*</sup>, SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES<sup>1</sup>,  
DANIELI BROLO MARTINS<sup>1</sup>, RAQUELI TERESINHA FRANÇA<sup>1</sup>,  
RAFAEL ALMEIDA FIGHERA<sup>2</sup>

1 – Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET) – UFSM.

2 – Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) – UFSM.

\*Autor para correspondência - Email: [luciele.sm@gmail.com](mailto:luciele.sm@gmail.com)

### RESUMO

O osteossarcoma é um tumor mesenquimal maligno que afeta homens e animais. Para a obtenção do diagnóstico definitivo realizam-se exames citopatológico e histopatológico, podendo-se assim planejar o tratamento do paciente. O material para exame citopatológico é coletado através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), já, para a realização do exame histopatológico é necessário uma amostra de tamanho maior, geralmente conseguida por biópsia incisional. Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma técnica de coleta de material em cães com suspeita de osteossarcoma através de PAAF para a realização de exame histopatológico, levando em consideração os sinais clínicos, exames radiográficos e a oscilação da isoenzima fosfatase alcalina. Foram coletadas duas amostras de 12 cães suspeitos de osteossarcoma por PAAF. O material obtido pela primeira coleta foi utilizado para o exame citopatológico, enquanto que o material oriundo da segunda coleta foi fixado em formol 10% como uma tentativa para a análise histopatológica. Na citopatologia confirmado o diagnóstico de osteossarcoma em todas as amostras; quatro destas obtiveram também o diagnóstico de osteossarcoma no exame histopatológico pela metodologia proposta. Esses resultados apontam para uma possível adequação da técnica de coleta de material por PAAF para exame histopatológico.

Palavras-chave: neoplasmas ósseos, citopatologia, histopatologia, metodologia de coleta.

### ABSTRACT

Osteosarcoma is a malignant mesenchymal tumor that affects men and animals. To obtain a definitive diagnosis are held cytopathologic and histopathologic examinations, it can plan the treatment of the patient. The material for cytopathologic examination is collected through Fine-needle aspiration cytology (FNA) has, for the test is pathological need a higher sample, usually obtained by incisional biopsy. This work aims to develop a technique for collecting material in dogs with suspected osteosarcoma by FNA for performing the histopathological examination, taking into account the clinical signs, radiographic examinations and oscillation of alkaline phosphatase isoenzyme. Two samples were collected from 12 dogs suspected of osteosarcoma by FNA. The material obtained by first sampling was used for cervical screening, while the material coming from the second collection was fixed in 10% formalin as an attempt to histopathological analysis. In cytopathology confirmed the



diagnosis of osteosarcoma in all samples, four of these were also diagnosed with osteosarcoma in the methodology proposed by histopathological examination. These results indicate a possible adaptation of the technique of collecting material for histopathological examination by FNA.

Keywords: bone neoplasms, cytopathology, histopathology, methods of collection.

## INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é um neoplasma de origem óssea que afeta humanos e animais. Em cães, pode ocorrer em qualquer faixa etária (RECH et al., 2004), mas é mais frequente em adultos, ao redor dos sete anos de idade (COSTA et al., 2001; DALECK et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2004). Setenta e cinco por cento dos cães com osteossarcoma desenvolvem lesões no esqueleto apendicular, principalmente nos membros torácicos, onde a maior parte do peso é suportada (DALECK et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2004).

A isoenzima fosfatase alcalina (FA) é um indicador de atividade óssea, pois está presente nos osteoblastos. Em cães jovens encontra-se elevada devido ao crescimento ósseo. Nos adultos e idosos, apresenta atividade elevada na presença de lesão óssea, sendo relevante no diagnóstico do osteossarcoma (FOSSUM, 2001; DALECK et al., 2002; BARGER et al., 2005).

O diagnóstico das mais variadas neoplasias torna-se necessário ao paciente e obrigatório para o clínico de pequenos animais, o qual deve ter conhecimento dos melhores exames e respectivos métodos de coleta a serem utilizados (GUEDES et al., 2000). Com o avanço da Medicina Veterinária, cada vez mais surgem novos métodos de avaliação e de diagnósticos para lesões ósseas (CASSONE et al., 1996).

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) surgiu na década de 1930 com o intuito de diagnosticar tumores malignos em pacientes humanos. Em animais esta técnica começou a ser utilizada na década de 1980, auxiliando na distinção de hiperplasias, inflamações, neoplasias e degenerações (MAGALHÃES et al., 2001).

Em estudos comparativos entre PAAF e biópsia incisional, verificou-se várias vantagens relacionadas à primeira, como: baixo custo, rapidez e eficácia dos resultados, simplicidade da coleta, além de não proporcionar riscos ao paciente, podendo ser realizada em ambulatório (LARKIN, 1994; GUEDES et al., 1997). No entanto, há desvantagens como a impossibilidade de graduar a neoplasia e a necessidade de análise imediata, dificultando o prognóstico clínico (LOPES et al., 2009).

O tratamento definitivo de tumores ósseos deve ser baseado na apresentação anatomopatológica do material obtido por biópsia. O exame histopatológico, além de fornecer o diagnóstico definitivo e a graduação da lesão, também permite que o tratamento seja bem planejado (CASSONE et al., 1996; KIRPENSTEIJN et al., 2002).

A biópsia incisional tem a desvantagem de ser um procedimento invasivo, já que o tamanho da amostra deve ser grande o suficiente para ser submetido à histopatologia. Esse exame possui utilidade diagnóstica, tanto quanto, a citologia, porém mantém a arquitetura tecidual e morfologia celular, enquanto que o último analisa as células de forma isolada. As análises histopatológicas são mais específicas e definitivas, embora, muitos autores considerem também a citologia como um diagnóstico definitivo (WELLMAN, 1990; GRAÇA, 2007).

O osteossarcoma foi eleito para este estudo por ser um tumor de origem óssea agressivo e devido a biópsia incisional acarretar vários problemas pós-operatórios ao paciente, como por exemplo, fraturas patológicas e complicações na cicatrização do local biopsiado (DAVID et al., 1996; JOHNSON e HULSE, 2005). A coleta de material com agulha fina torna-se um método simples comparado à biópsia incisional. A técnica proposta neste trabalho visa obter material suficiente para ser conservado e posteriormente diagnosticado de forma satisfatória pela histopatologia sem que para isso, se arrisque a vida do paciente durante o procedimento de coleta. Desta forma, este trabalho teve como objetivo coletar amostras de osteossarcomas em cães pelo método de PAAF e submetê-las a histopatologia, avaliando a viabilidade da técnica desenvolvida.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 12 cães atendidos no Setor de Clínica de Pequenos Animais, do Hospital Veterinário Universitário, da Universidade Federal de Santa Maria (HVU - UFSM). Destes, oito eram machos e quatro eram fêmeas, com idade média de 8,5 anos e peso médio de 30 kg. Oitenta e três por cento apresentaram neoplasma no esqueleto apendicular (nove casos em membro torácico e um em membro pélvico) e 17% no esqueleto axial (ílio). Os cães acometidos eram de porte grande e gigante e pertenciam as raças Pastor Alemão, São Bernardo, Boxer, Rottweiler ou não tinham raça definida (SRD), com exceção de um, que era de pequeno porte (Maltês).

Conforme o histórico e os sinais clínicos, os cães eram encaminhados ao Setor de Radiologia. Após o estudo radiográfico, a coleta de material através da PAAF era realizada e as amostras processadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET - UFSM). O patologista clínico observava a radiografia procurando regiões de rarefação óssea com aspecto lítico proliferativo, características de tumores ósseos, como o osteossarcoma. Logo, o local era puncionado, utilizando-se agulha 21G ou 22G e seringa de 10mL acoplada ao citoaspirador, fazendo-se movimentos em leque, abrangendo assim vários locais do tumor. A seguir, era desprezado o conteúdo da agulha em lâminas de vidro, procedendo-se esfregaços tipo *squash* para realização da análise citológica. As lâminas eram coradas com Panótico Rápido e analisadas, obtendo-se o diagnóstico citopatológico do tumor.

Após esta coleta realizava-se nova punção com agulha 18G. Esta amostra, de tamanho maior, era desprezada em papel seda (3 x 1cm) e, depois de seca, mergulhada em tubo de vidro contendo formol 10% (2 mL). Posteriormente, os tubos com os materiais imersos eram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV - UFSM) para processamento e análise histopatológica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

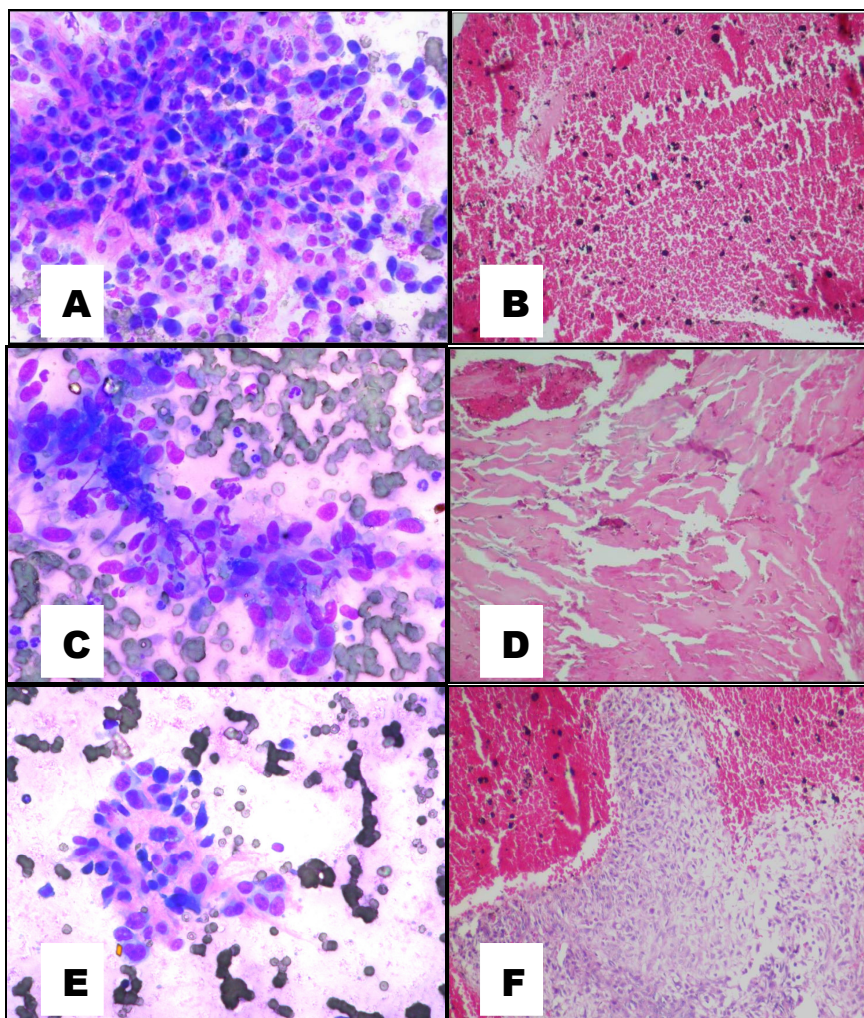
A histopatologia evidencia a morfologia das células e tecidos. Contudo, a amostra deve ter um tamanho adequado para a confecção dos cortes histológicos. Esse tamanho é obtido geralmente apenas com o uso de biópsia incisional, o que nem sempre é de fácil acesso ao clínico de pequenos animais. Neste trabalho, o material coletado por PAAF, de tamanho menor do que o coletado por biópsia foi satisfatório em 33,3% dos exemplares enviados à histopatologia (Tabela 1). Desta maneira, pode-se perceber que, se uma pequena amostra for coletada de um local com significativa população de células, o exame histopatológico terá bons resultados. Na figura 1, as imagens A, C e E (exame citopatológico), fazem um comparativo com as imagens B, D e F (exame histopatológico), respectivamente. Na citopatologia podem-se observar células neoplásicas arredondadas e fusiformes, com citoplasma basofílico, cromatina nuclear frouxa e um nucléolo grande e evidente conforme descrito por COWELL et al., 2008.

Neste trabalho houve somente um ponto de coleta para o exame histopatológico, o que pode ter gerado alguns resultados negativos em relação à

técnica adotada. Portanto, para o aperfeiçoamento da coleta, recomenda-se que mais pontos sejam puncionados a procura de uma área neoplásica de maior esfoliação. Com base neste propósito, uma alternativa de se obter maior amostragem de tecido neoplásico seria aumentar o calibre da agulha utilizada na punção para 16G, procedendo a coleta pelo mesmo orifício em vários ângulos, resultando assim, mais de uma amostra (DAVID et al., 1996). A Tabela 1 contém os resultados das amostras coletadas utilizando a nova técnica proposta e enviadas ao exame histopatológico.

Nº DA AMOSTRA	RESULTADO
1	Compatível com osteossarcoma
2	Coágulos sanguíneos
3	Coágulos sanguíneos
4	Compatível com osteossarcoma
5	Poucas células neoplásicas e coágulos sanguíneos
6	Coágulos sanguíneos
7	Coágulos sanguíneos e tecido conjuntivo
8	Coágulos sanguíneos
9	Coágulos sanguíneos e tecido conjuntivo
10	Compatível com osteossarcoma
11	Poucas células neoplásicas e coágulos sanguíneos
12	Compatível com osteossarcoma

**Tabela 1** - Resultados das amostras de osteossarcoma colhidas por punção com agulha fina (PAAF) e enviadas ao exame histopatológico.



**Figura 1** – Imagens mostrando os resultados dos exames citológicos (à esquerda) e histopatológicos (à direita) de osteossarcoma canino coletados PAAF. As fotomicrografias do aspecto citopatológico demonstram células neoplásicas envoltas por matriz osteóide (A, C, E). As fotomicrografias do aspecto histopatológico demonstram coágulo sanguíneo (B), colágeno com poucas hemácias (D) e células neoplásicas em meio a um coágulo sanguíneo (F). Hematoxilina e eosina, 200x. As imagens A e B, C e D, E e F correspondem aos exames citopatológico e histopatológico dos cães 1, 2 e 7, respectivamente.

O exame radiográfico atua como uma ferramenta auxiliar na PAAF, diminuindo a possibilidade de erro durante a sua execução. É importante que a área a ser puncionada seja bem delimitada na tentativa de que a amostra seja representativa para o diagnóstico do neoplasma (ROBAINA et al., 2007). Neste estudo, as amostras colhidas para citologia apresentaram inúmeras células neoplásicas e matriz osteóide, conferindo o diagnóstico de osteossarcoma conforme citam ROSSEN et al. (2000) e COWELL et al. (2008). No entanto, para a histopatologia, algumas amostras colhidas por PAAF foram pequenas, podendo-se, assim, adequar a técnica para novas investigações.

Dos 12 casos estudados, 100% tiveram diagnóstico citopatológico de osteossarcoma. Nas lâminas foram encontradas células mesenquimais neoplásicas contendo várias alterações, como: anisocitose, citoplasma basofílico pouco vacuolizado, presença de matriz osteóide, característica do osteossarcoma, cromatina nuclear grosseira e nucléolos evidentes, como se pode observar nas imagens A, C e E da Figura 1 (COWELL et al., 2008).

Além destas células havia grande quantidade de hemácias, um achado comum, pois o osteossarcoma é um tumor muito agressivo com acentuada angiogênese (COOMBER et al., 1998; COWELL et al., 2008). Com isso, é importante que sejam feitas sempre várias lâminas a cada punção, com o intuito de que o esfregaço fique o melhor possível para uma boa análise. Ainda, para que o diagnóstico não seja duvidoso, as amostras devem ser colhidas em áreas livres de necrose e intensa inflamação. Mesmo tendo sido encontrado edema com aspecto inflamatório em alguns dos casos de osteossarcoma deste trabalho, o exame citológico não ficou prejudicado, conseguindo com a PAAF desviar das áreas de necrose e inflamação, características de neoplasias com rápido crescimento (ZUCCARI et al., 2001).

Neste trabalho foi observado o desenvolvimento de osteossarcoma em cães de diversas idades (média de 8,5 anos). Além disso, 75% dos tumores localizavam-se em membros torácicos, nos quais a maior parte do peso corporal é sustentada. Outra característica é a predominância deste tumor em cães machos (RECH et al., 2004 e KUMAR et al., 2005). Dados também encontrados na presente pesquisa.

Na maioria dos cães (66,7%) foi encontrada elevação da FA devido à lesão óssea, concordando com DEAN et al., (1994); GARZOTTO et al., (2000); THOMPSON e POOL, (2002). O aumento da atividade desta enzima é também indicativo de prognóstico desfavorável, estando diretamente ligado a metástases (FOSSUM, 2001; DALECK et al., 2002). Todavia, o paciente amputado pode permanecer com a enzima inalterada, como ocorreu no cão nº 4 deste estudo, que recebeu terapia antineoplásica com cisplatina ainda antes da amputação do membro. Atualmente, o cão encontra-se livre de metástases e já com 14 meses de sobrevivida.

Em muitos casos, os proprietários de cães com osteossarcoma desistem do tratamento, acarretando maior sofrimento para o animal. Como este tumor possui características muito agressivas ao hospedeiro, a ocorrência de metástases é evidente, resultando em eutanásia (GOMES et al., 2008). Neste estudo houve a existência de pacientes não tratados (41%) que sobreviveram por poucas semanas.

## CONCLUSÃO

De acordo com esta pesquisa pode-se concluir que a técnica de PAAF proposta é viável para análise histopatológica. Estes resultados apontam para uma possível adequação da metodologia, podendo-se investigar a eficácia desta técnica para o exame histopatológico, tanto para o osteossarcoma canino como para outros neoplasmas caninos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARGER, A. et al. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 161 – 165, mar 2005.

CAVALCANTI, J. N. et al. Osteosarcoma in dogs: clinical morphological study and prognostic correlation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 299-305, sep/oct 2004.

CASSONE, E. C. et al. Eficácia da biópsia com agulha nos tumores ósseos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, vol. 31, n. 11, Nov 1996.

COOMBER, B. L. et al. Blood vessel density in canine osteosarcoma. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 62, n. 3, p. 199 – 204, jul 1998.

COSTA, F. S. et al. Metástase cutânea de osteossarcoma em um cão - relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 240-242, sep/oct 2001.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DE NICOLA, D. B. **Diagnostic cytology of the dog and the cat**. 3 ed., Missouri: Mosby Elsevier, 2008, 475 p.

DALECK, C. R. et al. Osteossarcoma canino - revisão. **Revista de Educação Continuada CRMV**, v. 5, n. 3, p. 233-242, set/out/nov/dez 2002.

DAVID, A. et al. Biópsia com agulha fina nos tumores ósseos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. Vol. 31, n. 1, p. 89 – 92, Jan 1996.

DEAN, D. P. et al. Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan degrading metalloproteinases after addition of beta-glycerophosphate and ascorbic acid. **Calcified Tissue International**, v. 54, n. 5, p. 399–408, may 1994.

FOSSUM, T. W. et al. Outras doenças ósseas e articulares. In: FOSSUM, et al. **Cirurgia de Pequenos Animais**, São Paulo: Roca, 2001, cap. 32, p. 1115-1137.

GARZOTTO, C. K. et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 587–592, nov 2000.

GOMES, L. C. et al. Osteossarcoma canino: revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, p. 204 – 219, ago 2008.

GRAÇA, R. F. Citologia para clínicos: como usar esta ferramenta diagnóstica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, supl. 2, p. 267 – 269, abr/mai/jun 2007.

GUEDES, R. M. C. et al. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. **A Hora Veterinária**, n. 96, mar/abr 1997.

GUEDES, R. M. C. et al. Acurácia do exame citológico no diagnóstico de processos inflamatórios e proliferativos dos animais domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.437-439, out 2000.

JOHNSON, A. L.; HULSE, D. A. Neoplasias ósseas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2005. p.1165-1176.



KIRPENSTEIJN, J. et al. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v.39, n. 2, p. 240 – 246, mar 2002.

KUMAR ,V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e cotran patologia** - Bases patológicas das doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1504.

LARKIN, H. A. Veterinary cytology. Differentiation of malignant lymphoma and other tumours of animals. **Irish Journal of Veterinary Medicine**, v.47, n. 4, p.161-167, aug 1994.

LOPES, B. B. et al. Mastocitoma – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Garça, n. 12, Jan 2009. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev100.pdf>> Acesso em: 4 mai. 2009.

MAGALHÃES, A. M. et al. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 23 – 32, jan/mar 2001.

RECH, A. et al. Características clínicas do osteossarcoma na infância e sua influência no prognóstico. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 1, p. 65-70, jan/fev 2004.

ROBAINA, T. F. et al. Correlação entre os diagnósticos citopatológicos e histopatológicos das lesões da mucosa oral após a punção aspirativa por agulha fina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 34, n. 5, p. 285 – 289, Set/Out 2007.

ROSEN, G. et al. Neoplasms of the bone and soft tissue. In: BAST Jr, R. C. et al. **Cancer Medicine**. 5 ed, , Ontario: B. C. Decker, 2000. Cap. 121, p. 1870-1902.

THOMPSON, K. G.; POOL, R. R. Tumors of bones. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. EUA: Iowa State Press, 2002. 245–317 p.

WELLMAN, M. L. The cytologic diagnosis of neoplasia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 919 – 938, 1990.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38-41, jan/fev 2001.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, com o avanço da medicina, a expectativa de vida de homens e animais tem aumentado, propiciando a elevada incidência de neoplasias. Em contrapartida, a tecnologia, tanto da Medicina Humana quanto da Veterinária, desenvolve metodologias para diagnosticar e tratar os diversos tipos de tumores. Por isso, em certos casos, o desenvolvimento de novas técnicas de coleta de material neoplásico torna-se crucial para a sobrevivência dos animais.

Os tumores são diagnosticados por diversos tipos de exames, entretanto, nenhum exame pode diagnosticar isoladamente. Portanto, é importante enfatizar a relação entre os tipos de exames e a condição de vida do paciente, pois certos tumores, como o osteossarcoma, têm curso rápido e o tratamento instituído deve ser iniciado logo após o diagnóstico definitivo, o que nem sempre ocorre.

As respostas entre os diferentes métodos de coleta (biópsia incisional e PAAF) para o osteossarcoma ficam explícitas em diversos casos, tanto após a obtenção das amostras quanto para início do tratamento antineoplásico. Assim, com este trabalho pode-se aperfeiçoar a nova técnica de coleta, minimizando traumatismos causados pela técnica usual de amostragem para exame histopatológico, o que garante um bom diagnóstico, dando chances de uma maior sobrevivência para o paciente.

## 5 CONCLUSÕES

A partir deste estudo conclui-se que:

- O exame citopatológico, através de PAAF, contribui grandemente na rotina clínica, pois além de identificar o tipo de neoplasma, também a diferencia de outros tipos de lesões. Além disso, a técnica é de fácil realização, tem baixo custo, é rápida, eficaz e não provoca efeitos colaterais ao paciente;

- A nova técnica de coleta para a histopatologia em tumores ósseos proposta nesta monografia é útil, mas deve ser aperfeiçoada e introduzida na clínica de pequenos animais, a fim de trazer benefícios diagnósticos e abrir caminhos para novos estudos em oncologia. Assim, pesquisas posteriores com algumas modificações poderão investigar ainda mais a eficácia desta metodologia.

## 6 BIBLIOGRAFIA

AAS, M. et al. Internal radionuclide therapy of primary osteosarcoma in dogs, using <sup>153</sup>Sm-ethylene-diamino-tetramethylene-phosphonate (EDTMP). **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 11, p. 3148 – 3152, Nov 1999.

BAILEY, D. B.; PAGE, R. L. Tumors of the endocrine system. In: **Withrow e MacEwen's small animal clinical oncology**. 4 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. Cap. 24, p. 583 – 609.

BARROGA, E. F. et al. Effects of vitamin D and retinoids on The differentiation and growth in vitro of canine osteosarcoma and its clonal cell lines. **Research in Veterinary Science**, v. 66, n. 3, p. 219-222, May/June 1999.

BARGER, A. et al. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 161 – 165, Mar 2005.

BERZINA, I. et al. Correlation between Cytologic and histopathologic diagnoses of bone lesions in dogs: a study of the diagnostic accuracy of bone cytology. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 37, n. 3. p. 332 – 338, Sept 2008.

BERG, J. Canine osteosarcoma. Amputation and chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal in Practice**, v. 26, n. 1, p.111-121, 1996.

BERG, J. et al. Effect of timing of postoperative chemotherapy on survival of dogs with osteosarcoma. **American Cancer Society**, v. 79, n. 7, p. 1343 – 1350. Apr, 1997.

BOUVY, B. M. Neoplasias de membros torácicos e pélvicos. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. p.1303-1309.

BRIDGE, J. A. et al. Cytogenetics findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 95, n. 1, p. 74-87, 1997.

COUTO, C. G. Cytology in the diagnosis of cancer. **TNAVC – Proceedings in small animal clinical pathology**. p. 91-93, 1994.

CAVALCANTI, J. N. et al. Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, São Paulo, p. 299 – 305, Sept/Oct 2004.

CASSONE, E. C. et al. Eficácia da biópsia com agulha nos tumores ósseos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, vol. 31, n. 11, nov, 1996.

CHOONG, P. F. M. et al. Musculoskeletal oncology: advances in cytogenetics and molecular genetics and their clinical implications. **Acta Oncologica**, v. 36, n. 3, p. 245-254, Mar/Apr 1997.

CONNOLLY, J. L. et al. Principles of cancer pathology. In: BAST Jr, R. C. et al. **Cancer Medicine**, 5 ed. Ontario: B. C. Decker, 2000. Cap. 29, p. 384-399.

COOMBER, B. L. et al. Blood vessel density in canine osteosarcoma. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 62, n. 3, p. 199 – 204, July 1998.

COSTA, F. S. et al. Metástase cutânea de osteossarcoma em um cão - relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 240-242, Sept/Oct 2001.

COWELL, R. L. et al. **Diagnostic cytology of the dog and the cat**. 3 ed., Missouri: Mosby Elsevier, 2008. 475 p.

CLINKENBEARD, K. D.; COWELL, R. L. Características citológicas de las neoplasias malignas. **Waltham Focus**, v.4, n. 4, p.2-8, 1994.

DAGLI, M. L. Z. Agentes antineoplásicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 53, 752p.

DALECK, C. B. et al. Estudo retrospectivo de osteossarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 125 – 131, jan/fev 2006.

DALECK, C. R. et al. Osteossarcoma canino revisão **Revista de Educação continuada do CRMV/SP**. São Paulo, v. 5, n. 3, p.233-242, 2002.

DAVID, A. et al. Biópsia com agulha fina nos tumores ósseos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. Vol. 31, n. 1, p. 89 – 92, jan 1996.

DAVIS, G. J. et al. Comparison of radiography, computed tomography, and magnetic resonance imaging for evaluation of appendicular osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 8, p. 1171 – 1176, Apr 2002.

DEAN, D. P. et al. Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan degrading metalloproteinases after addition of beta-glycerophosphate and ascorbic acid. **Calcified Tissue International**, v. 54, n. 5, p. 399–408, May 1994.

DERNELL, W. S. et al. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company., 2001. Cap. p. 378-417.

DERNELL W. S. Tumours of the skeletal system. In: DOBSON, J. M. e LASCELLES, B. X. *Bsava: Manual of Canine and Feline Oncology*. 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2003. Cap. 15, p. 180-191.

DERNELL, W. S. et al. Tumors of the skeletal system. In: **Withrow e MacEwen's small animal clinical oncology**. 4 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, Cap. 23, p. 540 – 582.

ENDICOTT, M. Principles of treatment for osteosarcoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 110-114, May 2003.

EDWARDS, D. F. Cytology: Benninger's guide. **TNAVC – Proceedings in small animal clinical pathology**, p. 95-96, 1994.

EHRHART, N. P.; FAN, T. M. Osteosarcoma. In: BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. **Kirk's Current veterinary therapy XIV**. Philadelphia: W. B. Saunders Elsevier, 2009. Cap. 78, p. 358 – 362.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of alpha v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **The Journal of Clinical Investigation**, v.103, n. 9, p.1227-1230, May 1999.

FELIZZOLA, C. R. Vacinas antitumorais dão resultado? **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, suplemento 2, p. 90-91, nov 2008.

FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. **Cell**, v. 79, n. 2, p.185-188, Oct 1994.

FOSSUM, T. W. et al. Outras Doenças Ósseas e Articulares. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**, São Paulo: Roca, 2001. Cap. 32, p. 1115-1137.

FRANCO, R. J. et al. Aspectos radiográficos e histopatológicos do osteossarcoma condroblástico: relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, 2002. 1CD-ROM.

FIGHERA, R. A. **Causas de morte e razões para eutanásia de cães**, 2008. 171 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

GRAÇA, R. F. Citologia para clínicos: como usar esta ferramenta diagnóstica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, supl. 2, p. 267 – 269, abr/jun 2007.

GARZOTTO, C. K. et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 587–592, Nov 2000.

GINEL, P. J. et al. Mandibular fibroblastic osteosarcoma in a three-month-old dog. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 5, p.120-121, Aug 1996.

GUEDES, R. M. et al. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. **A Hora Veterinária**, n. 96, mar/abr 1997.

GUEDES, R. M. C. et al. Acurácia do exame citológico no diagnóstico de processos inflamatórios e proliferativos dos animais domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.437-439, set/out 2000.

GUILLERMO, C. C. Protocolos de quimioterapia usados em the Ohio State University Veterinarian Teaching Hospital. WSAVA CONGRESS, 23., 1998, Buenos Aires. **Resúmenes...** Buenos Aires, 1998. p. 105 – 108.

GREEN, E. M. et al. Malignant transformation of solitary spinal osteochondroma in two mature dogs. **Veterinary Radiology e Ultrasound**, v. 40, n. 6, p.634 – 637, Nov 1999.

GOMES, L. C. et al. Osteossarcoma canino: revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, p. 204 – 219, ago 2008.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários**. 4 ed. Roca: São Paulo, 2006, p. 556.

HILLERS, K. R. et al. Incidence and prognostic importance of lymph node metastasis in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1983-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.226, p.1364-1367, Apr 2005.

HARRINGTON, E. A. et al. Oncogenes and cell death. **Current Opinion in Genetics and Development**. v. 4, n. 1, p. 120-129, Feb 1994.

HERNÁNDEZ, M. A. R.; MENÉNDEZ, M. H. Los genes supresores de tumores y el cáncer. **Revista Cubana de Oncologia**, v. 17, n.1, p. 65 – 71, ene/abr 2001.

HAYDEN, J. B.; HOANG, B. H. Osteosarcoma: Basic Science and Clinical Implications. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 1 – 7, Jan 2006.

HEYMAN, S. J. et al. Canine axial skeletal osteosarcoma: a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). **Veterinary Surgery**. v. 21, n. 4, p. 304 – 310, July 1992.

HULSE, D. A.; JOHNSON, A. N. Outras doenças ósseas e articulares. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. p. 1114 – 1138.



JOHNSON, A. L.; HULSE, D. A. Other diseases of bones and joints. In: **Small Animal Surgery**, 2 ed., Missouri: Mosby, 2002, cap. 37, p. 1168 – 1191.

JOHNSON, K. A.; WATSON, A. D. J. Doenças esqueléticas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, 2004, cap. 184, p.1988-2019.

JOHNSON, A. L.; HULSE, D. A. Neoplasias ósseas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2005. p.1165-1176.

JESUS-GARCIA, R. **Diagnóstico e tratamento de tumores ósseos**. São Paulo: Elsevier, 2005, 584p.

KIRPENSTEIJN, J. Canine osteosarcoma, is there a cure? 27<sup>o</sup> WSAVA CONGRESS. Scientific presentations: **Surgery**. Granada, 2002. Disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/proceedings>. Acesso em: 07 de mar. 2003.

KAMSTOCK, D. et al. Liposome–DNA complexes infused intravenously inhibit tumor angiogenesis and elicit antitumor activity in dogs with soft tissue sarcoma. **Cancer Gene Therapy**, v.13, n. 3, p.306–317, Mar 2006.

KLOEN, P. et al. Expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) isoforms in osteosarcomas. **Cancer**. v. 80, n. 12, p. 2230-2239, Dec 1997.

KURZMAN, I. D. et al. Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: Results of randomized clinical trials using combined lipossoma-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin. **Clinical Cancer Research**, v. 1, n. 12, p. 1595 – 1601, Dec 1995.

KIRPENSTEIJN, J. et al. TP53 gene mutations in canine osteosarcoma. **Veterinary Surgery**, n. 37, n. 5, p. 454 – 460, July 2008.

KIRPENSTEIJN, J. et al. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v.39, n. 2, p. 240 – 246, Mar 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e cotran patologia** - Bases patológicas das doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1504.

KLEINER, J.A.; SILVA, E.G. Tumores ósseos em pequenos animais. **Medvop**. v. 1, n. 3 p. 193 – 200, jul/set 2003.

KAZMIERSKI, K. J. et al. Serum zinc , chromium and iron concentrations in dog with lymphoma and osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 585 – 588, Nov 2001.

LACRETA, J. R. et al. Osteossarcoma pélvico em um cão da raça rottweiler – relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, 2002. 1CD-ROM.

LANGENBACH, A. et al. Extraskelatal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986-1996). **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 2, p. 113-120, Mar/Apr 1998.

LARKIN, H. A. Veterinary cytology. Differentiation of malignant lymphoma and other tumours of animals. **Irish Journal of Veterinary Medicine**, v.47, n. 4, p.161-167, Aug 1994.

LIPTAK, M. J. et al. Canine appendicular osteosarcoma: Diagnosis and palliative treatment. **Compendium: Colorado State University**, p. 172 – 183, 2004.

LOPES, B. B. et al. Mastocitoma – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Garça, n. 12, Jan 2009. Disponível em: < <http://www.revista.inf.br/veterinaria/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev100.pdf>> Acesso em: 4 mai. 2009.

MAGALHÃES, A. M. et al. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 21, p. 23 – 32, jan/mar 2001.

MORRISON, W. B.; DENICOLA, D. B. Advantages and disadvantages of cytology and histopathology for the diagnosis of cancer. **Seminars in veterinary medicine and surgery**, v.8, n. 4, p.222-227, 1993.

MOORE, T. M. et al. Closed biopsy of musculoskeletal lesions. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 61, n. 3, p. 375-380, Apr 1979.

MORELLO, E. et al. Bone allografts and adjuvant cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 2, p. 61 – 66, Feb 2001.

MANKIN, H. J. et al. The hazards of biopsy, revisited. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 78, n. 5, p. 656-663, May 1996.

MACEWEN, E. G.; KURZMAN, I. D. Canine osteosarcoma. Amputation and chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.26, p.123-133, 1996.

MUNDAY, J. S. et al. Renal osteosarcoma in dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.45, n. 12, p.618-622, Dec 2004.

MOORE, A. S. Osteosarcoma in dogs: managing a destructive disorder. **Veterinary Medicine**, v.96, p.539-546, 2001.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, n. 11-12, p.115-120, Dec 2000.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Neoplasias selecionadas em cães e gatos. Osteossarcoma em cães e gatos. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de pequenos animais**, 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap.84, p.1105 - 1117.

OGILVIE, G. K. Tumores ósseos In: ROSENTHAL, R. C. **Segredos em oncologia Veterinária**, Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 24, p. 183-191.

PETROVA, T. V. et al. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 1, p.117-130, Nov 1999.

PIEKARZ, C. H. et al. Imunologia tumoral como ferramenta na oncologia veterinária. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 9, n. 2, p. 141-145, jul/dez 2006.

PLASS, C.; SOLOWAY, P. D. DNA methylation, imprinting and cancer. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, n. 1, p. 6-16, Jan 2002.

RECH, A. et al. Características clínicas do osteossarcoma na infância e sua influência no prognóstico. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 1, p. 65-70, jan/fev 2004.

ROBAINA, T. F. et al. Correlação entre os diagnósticos citopatológicos e histopatológicos das lesões da mucosa oral após a punção aspirativa por agulha fina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 34, n. 5, p. 285 – 289, set/out 2007.

ROSEN, G. et al. Neoplasms of the bone and soft tissue. In: BAST Jr, R. C. et al. **Cancer Medicine**. 5 ed, , Ontario: B. C. Decker, 2000. Cap. 121, p. 1870-1902.

RU, G. et al. Host related risk factors for canine osteossarcoma. **The Veterinary Journal**, v.156, n. 1, p. 31 – 39, July 1998.

RODASKI, S. et al. Quimioterapia Antineoplásica, In: DALECK, C. R. et al. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009, Cap. 5, p. 161 – 177.

SPODNICK, G. J. et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 995-999, 1992.

SKRZYNSKI, M. C. et al. Diagnostic accuracy and charge-savings of out patient coreneedle biopsy compared with open biopsy of musculoskeletal tumors. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 78, n. 5, p. 644-649, Sept 1996.

SIQUEIRA, K. L. et al. Correlação do tipo de biópsia e sua validade diagnóstica nos tumores músculo-esqueléticos em distintas topografias. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 43, n. 1-2, p. 7-14, mar 2008.

SILVEIRA, L. M. G. et al. Osteossarcoma extra-esquelético no tecido subcutâneo de um cão: relato de caso. *Revista Clínica Veterinária*, n. 64, p. 89-90, set/out 2006.

SHI, F. et al. In vitro and in vivo effects of doxorubicin combined with liposome-encapsulated muramyl tripeptide on canine monocyte activation. *Cancer Research*, v. 53, n. 17, p. 3986-3991, Sept 1993.

SHERR, C. J.: Cancer cell cycles. *Science*, v. 274, n. 5293, p. 1672-1677, Oct/Dec 1996.

SELMÍ, A. L. et al. Osteossarcoma de patela em cão relato de caso. **Anais... CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS**, São Paulo, v.40, p.220, suplemento 2003.

STIMSON, E. L. et al. Extraskelatal osteosarcoma in the duodenum of a cat. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 36, n. 4, p. 332-336, July/Aug 2000.

SUZANO, S. M. C. et al. Punção aspirativa por agulha fina (PAAF) nos linfomas caninos – revisão. *Revista Clínica Veterinária*, n.72, p. 70 – 76. jan/fev 2008.

SUZANO, S. M. C. **Classificação citológica dos linfomas caninos**, 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Brasil.

TEIXEIRA, L. V. et al. Diagnóstico de micobacteriose canina: relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais... Gramado**.

TEIXEIRA, L. B. C.; LAGOS, M. S. Diagnóstico citológico das hepatopatias caninas. *Boletim Médico Veterinário – Espírito Santo do Pinhal*. v. 3., n. 3, p. 52 – 66, jan/dez 2007.

THAMM, D. H. et al. Primary osteosarcoma of the synovium in a dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 36, n. 4, p. 326-331, July/Aug 2000.

THOMPSON, K. G.; POOL, R. R. Tumors of bones. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Iowa: Editor Donald J. Meuten, 2002, p.199-317.

THOMPSON, K. Bones and joints. In: **Pathology of domestic animals**. 5 ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, v. 1, 2007, p. 1 – 184.

THOMSEN, B. V.; MYERS, R. K. Extraeskeletal osteosarcoma of the mandibular salivary gland in a dog. *Veterinary Pathology*, v. 36, n. 1. p. 71 – 73, Jan 1999.

THOMAS, W. B. et al. Parosteal osteosarcoma of the cervical vertebra in a dog. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 38, n. 2, p. 120-123, Mar 1997.

TODOROVA, I. Prevalence and Etiology of the most common malignant tumours in dog and cats. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n.2, p. 85 – 98, Feb 2006.

VAYEGO, S. A. et al. Aspectos genético-moleculares dos tumores ósseos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 33, n. 11, p. 847 – 854, nov 1998.

YOO, J. et al. Tp53 gene alterations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 121, p. 395-399, 1997.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351 – 360, ago 2002.

WATERS, D. J. Sistema músculo-esquelético. In: Slater D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. p.2607-2627.

WELLMAN, M. L. The cytologic diagnosis of neoplasia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 919 – 938, 1990.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38-41, jan/fev 2001.

**ANEXO A**

Comprovante de submissão de artigo à Revista Ciência Animal Brasileira.