

## OSTEOSSARCOMA CANINO E HUMANO: UMA VISÃO COMPARADA

---

Vanessa de Sousa Cruz Pimenta<sup>1</sup>, Karla Márcia da Silva Braga<sup>2</sup>, Patrícia Almeida Machado<sup>3</sup>, Yandra Cassia Lobato do Prado<sup>4</sup>, Eugênio Gonçalves de Araújo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Faculdade Anhanguera Educacional, Unidade Anápolis, Anápolis, Brasil

<sup>3</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>4</sup>Pesquisadora Doutora, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil (yandrprado@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Professor Doutor da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

**Recebido em: 30/09/2013 – Aprovado em: 08/11/2013 – Publicado em: 01/12/2013**

---

### RESUMO

O osteossarcoma é uma neoplasia óssea maligna, heterogênea, com padrões histológicos diversificados e etiologia desconhecida. O diagnóstico provável pode ser baseado na história clínica, exame físico e achados radiográficos, porém a confirmação é feita por meio do exame histopatológico. A técnica da imunoistoquímica proporciona uma melhor investigação das características histogenéticas das células tumorais do osteossarcoma e a expressão de alguns anticorpos proporciona melhor estimativa de prognóstico e sobrevida dos pacientes. A remoção cirúrgica é essencial, enquanto a quimioterapia e a radioterapia continuam a ter pouca eficiência, o que gera esforços para descoberta de novos quimioterápicos. Dos animais de companhia, o cão é o que possui apresentação clínica, biológica, complicações e resultados com maior semelhança ao osteossarcoma humano.

**PALAVRAS-CHAVE:** metástase, oncologia comparativa, prognóstico, tumores ósseos

### CANINE AND HUMAN OSTEOSARCOMA: A COMPARATIVE VIEW

### ABSTRACT

Osteosarcoma is a malignant neoplasms bone, heterogeneous with diverse histologic patterns and unknown etiology. The probable diagnosis can be based on clinical history, physical examination, and radiographic findings, but confirmation is made by histopathological examination. The technique of immunohistochemical investigation provides improved characteristics histogenéticas from the

osteosarcoma tumor cells and the expression of specific antibodies provides improved estimation of prognosis and patient survival. Surgical removal is essential while chemotherapy and radiotherapy remain few efficient, which generates efforts to the discovery of new chemotherapeutic agents. Among pets, the dog is the one with the clinical presentation, biological behavior, complications and results with greater similarity to human osteosarcoma.

**KEYWORDS:** bone tumors, comparative oncology, metastasis, prognostic

## INTRODUÇÃO

Neoplasias ósseas primárias malignas são relativamente comuns em cães e o osteossarcoma representa a mais prevalente. Corresponde entre 80-85% de todos os tumores ósseos, 5-6% de todos os tumores e está associado a um prognóstico reservado (NELSON & COUTO, 2006; NEUWALD et al., 2006; KARNIK et al., 2012; KRAJARNG et al., 2012). Em humanos é o principal tumor ósseo maligno. A maior incidência ocorre em crianças e adultos jovens, com frequência de 60% nas primeiras duas décadas de vida (HOFSTAETTER et al., 2013; OUYANG et al., 2013).

O osteossarcoma é localmente invasivo, altamente metastático e torna-se progressivamente mais doloroso à medida que vai crescendo e promovendo destruição óssea (KRAJARNG et al., 2012).

Esta revisão tem como objetivo efetuar uma descrição da abordagem clínica do osteossarcoma por meio das características histológicas, localização, tratamento, métodos de diagnóstico, formação das lesões metastáticas, prognóstico e sobrevida do paciente. Também ressalta a relevância da espécie canina como modelo para o estudo do osteossarcoma humano.

## DEFINIÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MODELOS PARA O OSTEOSSARCOMA

O osteossarcoma é um tumor heterogêneo, com padrões histológicos distintos, constituído por vários tipos celulares que são originados de uma única célula mesenquimal pluripotente ou de osteoblastos imaturos. É uma das mais frequentes neoplasias ósseas malignas. Pertence ao grupo de tumores primitivos que produz tecido ósseo, sendo conhecido, também, como sarcoma osteogênico ou sarcoma osteoblástico (PRÓSPERO, 2001; CAVALCANTI et al., 2004).

A utilização de modelos animais para o câncer humano tem evoluído na tentativa de captar a complexidade das doenças. Enquanto os roedores se destacam como o grupo de animais mais utilizado, há um crescente emprego do uso de cães, pois têm apresentado êxito nas pesquisas comparativas de determinados tipos de câncer humano, tais como o osteossarcoma e o câncer de próstata (ROWELL et al., 2011; LANGDON, 2012).

O sistema operacional para o osteossarcoma humano inclui ratos, camundongos e cães. Cada exemplar oferece vantagens únicas. Modelos que utilizam ratos possuem papel importante na avaliação cirúrgica e nos métodos moleculares de tratamento para osteossarcoma apendicular. São usados para estudar a biologia do tumor e desenvolver novas abordagens para o tratamento. A gestação dos ratos é de curta duração, o que faz com que o estudo em diversas gerações seja relativamente rápido e barato, em comparação com outros mamíferos.

Exemplares de camundongos são utilizados para o estudo de tumores primários, progressão de metástase e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Estes animais replicam muitas características do osteossarcoma humano, no entanto, o comportamento biológico observado difere dos aspectos da doença no homem. Uma das características que proporciona limitações é a ocorrência espontânea dos tumores em seres humanos e a necessidade de indução na maioria dos modelos de ratos e camundongos (ROWELL et al., 2011; OSBORNE & KHANNA, 2012).

Dos animais de companhia, o cão é o que possui apresentação clínica, biológica, complicações e resultados com maior semelhança ao osteossarcoma humano. Além da histologia do tumor primário e o padrão de propagação de metástases, existe analogia na capacidade de resposta a drogas, tais como a cisplatina e as antraciclina. Isto faz do cão um modelo para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento do osteossarcoma. Por este motivo, os ensaios clínicos realizados por instituições individuais e estudos multicêntricos são preferencialmente conduzidos em cães com osteossarcoma. As pesquisas possuem a intenção de integrar planos de desenvolvimento de tratamentos comuns à espécie humana, com empresas farmacêuticas (STEIN et al., 2011; WOLFE et al., 2011; LANGDON, 2012; OSBORNE & KHANNA, 2012).

Outra semelhança diz respeito à  $\beta$  catenina que é expressa no citoplasma das células neoplásicas no osteossarcoma canino e humano (STEIN et al., 2011). As anomalias citogenéticas do osteossarcoma são conservadas entre estas espécies, o que reforça o papel do cão como um modelo comparativo válido para o osteossarcoma humano. Existe, também, um interesse crescente na disciplina oncologia comparativa, que integra o estudo da ocorrência natural, biologia e terapia de neoplasias em animais e humanos. Além disso, o estudo das neoplasias em diferentes raças de cães fornece um contexto de diversidade genética, ausente em estudos com animais de laboratório. Os cães têm a maior diversidade fenotípica e o maior número de doenças conhecidas, de ocorrência espontânea, de todos os mamíferos terrestres (ANGSTADT et al., 2011; ROWELL et al., 2011; LANGDON, 2012).

## ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A etiologia ainda é desconhecida e várias hipóteses têm sido consideradas. Sabe-se que a transformação maligna de células mesenquimais leva ao desenvolvimento do osteosarcoma, mas as bases genéticas desses eventos ainda não são compreendidas (OSBORNE & KHANNA, 2012). Apesar de não ter sido isolado nenhum vírus responsável pelo surgimento dessa neoplasia, não se descarta a origem viral, pois pode ocorrer em ninhadas e já foi induzido experimentalmente pela injeção de células neoplásicas em fetos caninos. Também é possível o desenvolvimento de uma linhagem mutante pela indução de sinais mitogênicos, por meio da sensibilização de células das regiões metafisárias dos ossos que sustentam grandes pesos, pois tais regiões são predispostas a pequenos e múltiplos traumas durante o fechamento tardio da placa epifisária (DALECK et al., 2006).

Existem relatos de casos após fraturas não tratadas, processos de atraso na consolidação óssea, osteomielite crônica e sítios prévios de fraturas associadas a implantes metálicos ou enxerto cortical. Também o uso da radiação, empregada como tratamento para sarcoma de tecidos moles, tem sido apontado como uma

possível causa de osteossarcoma canino (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008).

Modificações genéticas e hormonais são listadas como possíveis causas desse tipo de neoplasia. Alterações em genes supressores de tumores, como o retinoblastoma e o P53, têm sido relacionadas ao surgimento de muitos casos de osteossarcoma em humanos, sendo que a mutação de P53 tem sido expressa no osteossarcoma canino. O hormônio de crescimento (GH: *growth hormone*) possui um efeito estimulante para o crescimento de linhagens de células de osteossarcomas humanos e caninos, porque a produção local de RNA mensageiro do GH pode gerar um ambiente altamente produtivo para o crescimento das células tumorais (BERSANO, 2006).

Os osteossarcomas acometem o esqueleto apendicular ou axial (NELSON & COUTO, 2006; KARNIK et al., 2012). A maioria dos tumores se origina nos ossos longos, distantes do cotovelo (metáfises proximal do úmero e distal do rádio) e ao redor do joelho (metáfises distal do fêmur e proximal da tíbia), sendo que aproximadamente 75% dos tumores irão crescer na metáfise (ETTINGER & FELDMAN, 2004; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; OSBORNE & KHANNA, 2012). O envolvimento do esqueleto axial está presente em aproximadamente 25% dos cães portadores de osteossarcoma, ou seja, o esqueleto apendicular pode ser até quatro vezes mais afetado que o axial (NEUWALD et al., 2006; WOLFE et al., 2011). Os membros torácicos são mais acometidos que os pélvicos, na proporção de 2:1 (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; ANGSTADT et al., 2011). Osteossarcomas primários também são relatados em local extra-ósseo como o retroperitônio, pênis e músculos das coxas. Esta condição é rara, representando apenas 1% dos sarcomas de tecido mole (SHRINGARPURE et al., 2012).

Esta neoplasia acomete mais os cães com peso superior a 36,5 kg, sendo que 95% de todos os casos ocorrem em caninos com peso superior a 15 kg. A idade média de ocorrência é de oito anos, porém também existem relatos em cães jovens com menos de dois anos de idade. Cães de pequeno porte são raramente acometidos porque as placas de crescimento se fecham precocemente (BERSANO, 2006; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; KRAJARNG et al., 2012). A maioria dos casos acomete cães grandes e gigantes, machos, a partir da meia idade, principalmente das raças Greyhound, Cão dos Pirineus, São Bernardo, Dogue Alemão, Setter Irlandês, Doberman, Pastor Alemão, Rottweiler, Golden Retriever, Irish Setter, Boxer, Labrador e Mastiff (DALECK et al., 2006; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; ANGSTADT et al., 2011). Cães machos são uma vez e meia mais acometidos que as fêmeas, entretanto, nos osteossarcomas do esqueleto axial, a incidência é maior em fêmeas (NEUWALD et al., 2006). Animais castrados têm menor incidência dessa neoplasia que os animais não castrados (BERSANO, 2006).

Em humanos, o osteossarcoma ocorre com maior frequência em homens do que em mulheres. Pode advir em qualquer idade, no entanto, tem maior incidência na segunda década de vida, durante a fase de crescimento do adolescente. Portanto, é mais comum em áreas de crescimento ósseo rápido, o que sugere uma relação entre a formação do tumor e o crescimento acelerado (OSBORNE & KHANNA, 2012).

## CLASSIFICAÇÃO

O osteossarcoma é um tumor mesenquimal maligno das células ósseas primitivas, que se caracteriza por produzir a matriz óssea. Esta matriz extracelular de

osteóide é a base histológica para sua diferenciação. O osteossarcoma pode ser classificado de acordo com o tipo e quantidade de matriz e pelas características celulares (NEUWALD et al., 2006). Histologicamente, predomina o padrão morfológico puro que o padrão combinado (CAVALCANTI et al., 2004). O sistema mais utilizado é baseado na classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde em Forma Central e Forma Periférica (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002).

A Forma Central é a forma clássica mais comum, com aspectos clínicos, radiográficos e anatomopatológicos bem definidos. Cresce no interior do osso, rompe a barreira cortical e periosteal, comprimindo as partes moles adjacentes, tornando-se tumor extracompartmental. Possui uma variabilidade de aspectos histológicos e, levando em consideração o aspecto predominante, é classificada nos subtipos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, telangectásico, indiferenciado ou anaplásico, do tipo células gigantes e padrão misto ou com variantes celulares (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002; WOLFE et al., 2011).

A Forma Periférica é a forma menos frequente, com caracteres clínicos, evolutivos e anatomopatológicos distintos da forma central. Cresce na superfície óssea e também é classificado em subtipos. O subtipo periosteal ou periosteal cresce na cortical óssea sob o periosteio e não invade o canal medular. Já o parosteal ou parosteal cresce na superfície óssea sobre a cortical, estando delimitado por uma linha transparente com largura variável de 1 a 3 mm (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002).

## SINAIS E SINTOMAS

Os sinais clínicos incluem claudicação e, ocasionalmente, febre e anorexia (ETTINGER & FELDMAN, 2004). O exame físico revela tumefação dolorosa, com ou sem envolvimento dos tecidos moles (NELSON & COUTO, 2006). Aumento de volume, edema e fraturas espontâneas também são relatados. A dor ocorre como resultado da interrupção do periosteio induzida pela lise óssea proveniente do desenvolvimento neoplásico. Tremores e atrofia muscular por desuso, dificuldade em se levantar, incontinência urinária e fecal, letargia e anorexia também têm sido observados em pacientes com osteossarcoma no esqueleto axial (DALECK et al., 2006). Nos casos de osteossarcoma craniano pode ser observado sangramento, edema e dor, devido à destruição óssea e de tecidos adjacentes (NEUWALD et al., 2006).

Na forma central, o principal sintoma é a dor intermitente e crescente, sendo o aumento de volume da região com tempo variável entre semanas a três meses. Por outro lado, na forma periférica a queixa mais importante é o aumento de volume progressivo, tendo a dor apenas um caráter leve (PRÓSPERO, 2001). O edema, em todos os casos, é justificado pela obstrução tecidual que impede a drenagem linfática normal e promove uma obstrução linfática, podendo ser percebido pelo sinal de Godet positivo (KLEINER & SILVA, 2003).

DALECK et al., (2002) relataram sintomas característicos conforme a região acometida. No sítio oral: disfagia. No sítio orbital ou mandíbula caudal: exoftalmia e dor ao abrir a boca. Nos ossos da face: deformidade facial. No sítio da cavidade e seios nasais: descargas nasais e espirros. No sítio da medula espinhal: hiperestesia com ou sem sinais neurológicos.

Tosse, dispnéia, perda de peso, apatia e anorexia podem estar presentes quando há metástase pulmonar (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008).

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo do osteossarcoma pode ser baseado na história clínica, exame físico e achados radiográficos. Quando possível, a cintilografia óssea e a tomografia computadorizada fornecem grande auxílio. A confirmação é feita por meio do exame histopatológico, no entanto a avaliação citológica por biópsia aspirativa é uma técnica menos invasiva, com diagnóstico preciso em curto intervalo de tempo (DALECK et al., 2006; NEUWALD et al., 2006; RYSEFF & BOHN, 2012).

A determinação da extensão apendicular do osteossarcoma é importante para auxiliar a demarcação das margens cirúrgicas. Técnicas de imaginologia são utilizadas para medir o comprimento do osteossarcoma apendicular. A cintilografia e a radiografia promovem uma sobre avaliação do comprimento do osteossarcoma. Enquanto a ressonância magnética pode resultar em superestimativa do comprimento. Já na tomografia computadorizada, as alterações detectadas estão relacionadas ao comprimento apendicular do osteossarcoma (KARNIK et al., 2012).

### Radiografia

A aparência radiológica do osteossarcoma pode ser dividida em três categorias: osteolíticas, esclerótica e padrão misto lítico/proliferativo (HOFSTAETTER et al., 2013). A reação perióstica está presente em 95% das lesões, sendo que 33% demonstram reação perióstica do tipo irradiante. A formação de osso periosteal adjacente desenvolve o “triângulo de Codman”, composto por córtex destruído na área acometida e proliferação do perióstio. As lesões osteolíticas apresentam bordas irregulares ou onduladas com aspecto “comido por traça” ou contorno ósseo alargado ao longo de toda a parte trabecular da epífise, estendendo-se até a metáfise ou diáfise. As reações periosteais também podem assumir aspecto de “explosão solar” (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; SANTOS, 2009).

Na forma central, a perda do trabéculo ósseo é substituída por áreas de maior densidade, com ou sem focos de lise. O processo atinge a cortical e rompe o perióstio, formando o triângulo de Codman, limitado pelo perióstio, cortical e tumor. O crescimento extra-ósseo forma espículas grosseiras ou esporões do tecido ósseo neoformado caracterizando o aspecto em “raios de sol” (PRÓSPERO, 2001; NANJI NETO et al., 2007; SANTOS, 2009).

Na forma periférica, o osteossarcoma parosteal forma uma saliência na superfície cortical do osso, ficando delimitado por uma linha transparente demarcatória. Já o osteossarcoma periosteal, forma periférica, apresenta densidade radiográfica semelhante à da cortical do osso em que cresceu, sem comprometimento do canal medular (PRÓSPERO, 2001, NANJI NETO et al., 2007).

Osteossarcomas podem ser diagnosticados, pelo exame radiográfico, em diversas partes do corpo. É um procedimento rápido, simples, não invasivo, de baixo custo e com resultado imediato (NANJI NETO et al., 2007; SOAVE et al., 2008). Além disso, fornece informações adicionais valiosas sobre o padrão de destruição, resposta da matriz, padrão de erosão cortical e presença de tecidos moles adjacentes. Outras informações obtidas pelo exame radiográfico são a localização exata e a extensão da lesão, por exemplo: epifisária, metafisária ou diafisária; intramedular, cortical, paracortical, periosteal ou justacortical; e se existe

comprometimento articular (MEUTEN, 2002).

O exame radiográfico também desempenha um papel importante no acompanhamento da evolução do quadro neoplásico do osteossarcoma, que varia em relação à localização da neoplasia, sua classificação histológica e, principalmente, pelo não estabelecimento de um protocolo de tratamento imediato (SANTOS, 2009).

Além disso, radiografias torácicas devem ser realizadas antes do tratamento com o objetivo de detectar doença metastática (DALECK et al., 2006). Elas fornecem uma oportunidade de examinar esta cavidade do corpo que é relativamente pouco acessível através de outros métodos (SANTOS et al., 2007). Radiograficamente a metástase pulmonar pode ser caracterizada por nódulos bem definidos, mal demarcados ou como derrame pleural (BURK & FEENEY, 2003). Nódulos pulmonares podem ser encontrados em tecidos moles e lobos pulmonares, sendo solitários ou múltiplos, cavitários ou não cavitários (OWENS & BIERY, 1999). Devem ser realizadas em todos os pacientes da oncologia, pois podem evidenciar a doença metastática pulmonar, delimitando a área comprometida e auxiliando no monitoramento durante e após o tratamento cirúrgico e quimioterápico (SOAVE et al., 2008). O padrão alveolar difuso infiltrado geralmente é resultado de fatores complicadores como pneumonia, necrose e hemorragia (OWENS & BIERY, 1999).

As radiografias para avaliação geral do tórax devem incluir as vistas: lateral esquerda-direita, lateral direita-esquerda, ventrodorsal e dorsoventral. Nem todos os radiologistas veterinários concordam com essa recomendação, porém, é necessário expor todas as vistas para conseguir diagnosticar metástase sutil (LAVIN, 2007). Para manter o controle de qualidade das radiografias deve haver um claro contraste entre as estruturas, observando a silhueta cardíaca, traquéia, mediastino, espaço pleural e pulmões (OTONI et al., 2010). O resultado falso negativo para o diagnóstico radiográfico de metástase pulmonar pode ocorrer em 11% dos casos, onde as lesões são menores que 10mm ou apresentam ausência de contraste com o parênquima pulmonar e quando há derrame pleural ou atelectasia (SANTOS et al., 2007).

## **Ultrassonografia**

A avaliação do sistema ósseo pela ultrassonografia é bastante limitada, em virtude da intensa reflexão e absorção das ondas sonoras, o que impede a observação da estrutura interna dos ossos. Porém, devido à incidência perpendicular das ondas sonoras sobre a superfície óssea, é possível avaliar os contornos, onde a superfície óssea normal é visibilizada como uma linha hiperecogênica e, abaixo dessa, observa-se sombra acústica. Esta técnica pode auxiliar o diagnóstico radiográfico das neoplasias ósseas, analisando os tecidos adjacentes e detectando áreas de osteólise. Consiste, também, em importante ferramenta para guiar biópsias do tecido ósseo lesado (CARVALHO, 2004).

A procura por focos de metástase na cavidade abdominal pode ser feita utilizando um protocolo de varredura onde, para abordar cada órgão, são realizados planos transversais e longitudinais em toda a extensão da região, movimentando o transdutor gradualmente, acompanhando o trajeto de estruturas vasculares e acidentes anatômicos. O cão deve ser submetido a jejum alimentar visando a diminuição da quantidade de gás no trato digestivo e realização de tricotomia ampla do abdome ventral. O posicionamento precisa ser em decúbito dorsal e lateral direito

e esquerdo (CARVALHO, 2004; BERSANO, 2006).

### **Cintilografia**

A cintilografia é uma técnica de elevada sensibilidade para detecção de lesões esqueléticas, mas não é específica para identificação de sítios ósseos tumorais. O exame cintilográfico é feito mediante o uso de um radiofármaco TcMD (metileno difosfato marcado com tecnésio 99m), sendo mais eficiente que o exame radiográfico no que se refere a precocidade de detecção de metástases. O radiofármaco é administrado por via intravenosa e incorpora-se à matriz cristalina do esqueleto, sendo dependente do aporte vascular e reação osteogênica, refletindo, em consequência, as condições do metabolismo ósseo, por meio de uma câmara gama que registra a radioatividade entre os sítios do osso, o que pode ser exibido como imagem. A detecção do radionucleotídeo no osso pela câmara é indicativa de atividade metabólica esquelética, completando, assim, a informação estrutural das radiografias (DALECK et al., 2002).

### **Tomografia computadorizada**

A tomografia computadorizada promove uma boa visualização dos tecidos moles envolvidos, auxiliando no estabelecimento do plano cirúrgico e na procura por metástases (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008). É uma boa técnica para detecção de metástases pulmonares não visualizadas pela radiografia simples, fornecendo, também, importantes detalhes sobre o comprometimento cortical e a presença de calcificação e ossificação da matriz celular (PRÓSPERO, 2001).

### **Ressonância Nuclear Magnética**

A ressonância magnética promove uma boa visualização dos tecidos moles envolvidos, auxiliando no estabelecimento do plano cirúrgico principalmente quando a escolha é a cirurgia de preservação do membro, sendo uma boa opção para avaliação pré-operatória (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008). Este método fornece maiores informações sobre a extensão intramedular das lesões na sequência de imagens longitudinais (sagitais e coronais) e das relações entre o tumor e as partes moles adjacentes na sequência de imagens axiais (PRÓSPERO, 2001).

### **Exames Sorológicos**

Os parâmetros sorológicos minerais de cães com osteossarcoma tendem a se distanciar da normalidade. Geralmente as concentrações de cromo e ferro, assim como a capacidade de ligação do ferro, apresentam-se extremamente reduzidas, quando comparadas com as de cães saudáveis, e o mesmo ocorre em relação ao zinco, embora com menor diferença entre as concentrações (KLEINER & SILVA, 2003).

A fosfatase alcalina atinge elevados níveis no sangue, relacionada à maior ou menor atividade dos osteoblastos no tumor. Dosagens repetidas são indicadas para



avaliar o índice da velocidade de crescimento da neoplasia ou de recidiva após a ressecção do tumor primário (PRÓSPERO, 2001).

### Exames Anatomopatológicos

Para confirmação do diagnóstico radiográfico, é prudente realizar um aspirado com agulha fina (se houver lise cortical considerável) ou um aspirado da área acometida com agulha de aspiração de medula óssea. As células geralmente são redondas ou ovais, possuem bordas citoplasmáticas distintas, citoplasma azul brilhante granular e núcleos de tecido do centro da lesão e da área entre lesão acometida e não acometida do osso (NELSON & COUTO, 2006). Os aspirados revelam células mesenquimais imaturas com osteóide intracitoplasmático ou extracelular, osteoblastos malignos, osteoblastos benignos, osteoclastos e células inflamatórias (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008). Apesar da aspiração com agulha fina encontrar limitações em virtude da natureza dos tecidos, rígidos e calcificados, apresenta baixo custo, é menos invasiva e, na maioria das vezes, é possível estabelecer diagnósticos precisos (SANTOS, 2009).

A biópsia incisional permite a obtenção da quantidade ideal de tecido e maior precisão do resultado. No entanto, essa técnica apresenta como desvantagem a necessidade de procedimento cirúrgico, o que acarreta risco de complicações pós-cirúrgicas como formação de hematoma, infecção, disseminação do tumor e fratura patológica. Múltiplos fragmentos, obtidos do centro da lesão, aumentam as chances de precisão do diagnóstico. A biópsia poderá ser aberta ou fechada, sendo a principal vantagem da aberta a quantidade de material colhido para exame. Entretanto, ela poderá trazer riscos de infecção e produção de hematomas, que podem retardar a utilização da quimioterapia ou radioterapia. Já a biópsia fechada, que utiliza a agulha de Jamshidi calibre 13 ou 11 (*monoject*), é feita para obter um mínimo de dois ou preferencialmente três núcleos de tecido, tanto do centro da lesão como da área entre lesões acometidas e não acometidas do osso. Esse tipo de biópsia fornece precisão de 91,9% para diferenciação entre o tumor e outras desordens, e 82,3% para diagnóstico específico do tumor (DALECK et al., 2002).

Após o procedimento cirúrgico, o membro amputado ou amostras representativas devem ser encaminhados para histopatologia (NELSON & COUTO, 2006). O diagnóstico histopatológico é definitivo e considera o tipo celular e a natureza da matriz produzida pelas células neoplásicas, sendo as características histológicas dos diversos subtipos descritas isoladamente no Quadro 1 (MEUTEM, 2002; BERSANO, 2006; DALECK et al., 2006).

RYSEFF & BOHN (2012) analisaram a expressão da fosfatase alcalina em material citológico previamente corado com Wright-Giemsa (*Wright-Giemsa stain*; Astral Diagnostics Inc., West Deptford, NJ, USA) e concluíram que a técnica auxilia na diferenciação do osteossarcoma canino de outras neoplasias mesenquimais.

**QUADRO 1:** Características histológicas observadas nos subtipos do osteossarcoma da forma central

SUBTIPOS	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
Osteoblástico	Constituído por osteoblastos anaplásicos, volumosos e células fusiformes com citoplasma basofílico, núcleos hipercromáticos e excêntricos. De acordo com as variações na quantidade de osteóide são subclassificados em: produtivos, com células tumorais com quantidade abundante de matriz osteóide tumoral dispostas em trabéculas conferindo um padrão entrelaçado com células neoplásicas; pouco produtivos, com lesões ósseas líticas e discreta quantidade de osteóide tumoral em permeio às células osteoblásticas atípicas com o padrão acima descrito.
Condroblástico	Possui células tumorais mesenquimatosas e produz matriz condróide em abundância, além de osteóide tumoral, dispostas lado-a-lado ou entremeando-se.
Fibroblástico	Apresenta predomínio de células tumorais fusiformes e, à medida que a lesão evolui, extensas áreas de matriz osteóide envolvendo aglomerados de células tumorais.
Do tipo células gigantes	Exibe escassa produção de matriz óssea e predomínio de grandes áreas contendo inúmeras células gigantes multinucleadas tumorais e presença de osteóide.
Telangectásico	Caracterizado pela presença de canais vasculares de diâmetros variados, revestidos por células e reduzida quantidade de osteóide.
Indiferenciado ou anaplásico	Apresenta quantidade mínima de osteóide típico, ausência de espículas ou trabéculas de osso tumoral, células neoplásicas volumosas e pleomórficas ou pequenas, semelhantes às células reticulares do estroma da medula óssea.
Misto	Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular.
Periostal	Exibe formação de nódulos de cartilagem circundados por células fusiformes com atipias e formação de pouca matriz osteóide e osso tumoral, predominando padrão cartilaginoso.
Parostal	É bem diferenciado, com tecido maligno ósseo, cartilaginoso ou fibroso, ou ainda, os três padrões no mesmo tumor.

Fonte: MEUTEM (2002); BERSANO (2006); DALECK et al. (2006)

### Imunoistoquímica

A imunoistoquímica proporciona uma melhor investigação das características histogenéticas das células tumorais do osteossarcoma. É possível encontrar células

mesenquimais indiferenciadas e células semelhantes a histiócitos. Esta técnica é empregada na caracterização do imunofenótipo do osteossarcoma e no diagnóstico diferencial com outros sarcomas ósseos (CAVALVANTI, 2007).

As proteínas argirófilas (AgNORs) estão localizadas no centro fibrilar e componentes denso fibrilar dos nucléolos. Podem se configurar apresentando-se de forma agrupada no nucléolo das células em proliferação e distribuídas por todo o núcleo nas células altamente malignas (BERSANO, 2006).

A cicloxigenase – 2 (Cox 2) é uma das enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas a partir do araquidônico. Está associada ao crescimento celular, ação de oncogenes e pode ser induzida por estímulos mitóticos mediados por fatores de crescimento. Possui um papel importante na tumorigênese do osteossarcoma e de diferentes neoplasias caninas, humanas e de roedores. Cox 2 é marcada no citoplasma das células tumorais e o aumento da sua expressão está relacionado com a transformação maligna das neoplasias (BERSANO, 2006; GIANTIN et al., 2013).

A survivina é uma proteína com funções de regular a divisão celular e inibir a apoptose nas células neoplásicas. A expressão de survivina pode ser útil para determinação do prognóstico e do grau de malignidade em muitos tipos de câncer. No osteossarcoma canino, marcações de survivina se correlacionam com o grau histológico e índice mitótico (SHOENEMAN et al., 2012).

A osteocalcina é uma proteína de baixo peso molecular, que liga cálcio e localiza-se no tecido ósseo. Anticorpos monoclonais ou policlonais anti-osteocalcina podem se depositar nos osteoblastos, possibilitando a utilização desta proteína como marcador de diferenciação celular no osteossarcoma canino (CAVALCANTI, 2007).

Adrenomedullin é um peptídeo endógeno vasoativo, composto por 52 aminoácidos, que promove a angiogênese e o crescimento tumoral. Sua expressão está associada com o grau histológico. Tecidos com osteossarcoma apresentam maiores níveis de expressão de Adrenomedullin e áreas de metástase exibem marcação ainda maior (DAI et al., 2013).

EMMPRIN/CD147 é uma proteína transmembranar glicosilada que pertence à família das imunoglobulinas. Promove a aderência, invasão e metástase de células neoplásicas. É expresso por linhagens de células humanas de osteossarcoma e os níveis relativos de marcação estão correlacionados com o grau de patogenicidade desta neoplasia. Sua expressão também pode ser usada como um fator prognóstico para estimar a sobrevida dos pacientes (LU et al., 2013).

O c-Flip é um homólogo da caspase-protease, com função reguladora da ativação da caspase-8 e apoptose mediada por CD95. Sua expressão correlaciona-se com a progressão tumoral e pobre prognóstico, especialmente na metástase pulmonar do osteossarcoma (RAO-BINDAL et al., 2012).

## **METÁSTASE**

O desenvolvimento do ponto de metástase inicia-se com a invasão de células do tumor primário para os tecidos circundantes e penetração da corrente linfática ou sanguínea. Em seguida, ocorre a liberação dos êmbolos tumorais para a circulação, que podem se alojar nos capilares ou vasos linfáticos de órgãos distantes. Os clones celulares atípicos iniciam então a penetração da parede do vaso onde o êmbolo

estacionou, infiltram-se no tecido conjuntivo ao redor e se proliferam no novo ambiente, promovendo a vascularização do novo sítio do tumor (ETTINGER & FELDMAN, 2004; SANTOS, 2009). O osteossarcoma caracteriza-se por infiltração local agressiva dos tecidos subjacentes e disseminação hematogênica rápida (NELSON & COUTO, 2006). No entanto, existem diferenças fundamentais e um grande número de vias discordantes que aumentam a dificuldade de priorizar e identificar os principais reguladores comuns no processo de metastatase do osteossarcoma (FLORES et al., 2012).

A cascata metastática é um processo de múltiplos estágios e cada etapa está sujeita a uma grande variedade de influências. O não preenchimento de qualquer passo resulta na falha da colonização de um local distante. As células neoplásicas precisam evitar a detecção e destruição pelo sistema imunitário e conseguir desenvolver um suprimento vascular para sobreviver e proliferar. A escolha do local específico para metástases à distância envolve interações entre as células tumorais e o microambiente local do sítio secundário (OSBORNE & KHANNA, 2012).

O *Derma-centor variabilis*, um gênero de carrapato da família Ixodidae, tem a capacidade de modular a atividade migratória das células envolvidas na resposta da cicatrização de feridas, durante a ingestão do sangue e secreção de saliva no hospedeiro. A aquisição de motilidade é um fator importante para as células neoplásicas tornarem-se metastáticas e os constituintes da saliva deste carrapato são capazes de modular, também, a atividade migratória e invasiva das células do osteossarcoma (POOLE et al., 2013).

As metástases ocorrem nos pulmões em 80% dos casos e podem ser detectadas em 11 a 17% de cães acometidos com osteossarcoma no momento do diagnóstico (SANTOS et al., 2007; SANTOS, 2009). Em humanos, o local mais comum de metástase também é o pulmão e é possível que 90% dos pacientes já tenham disseminação microscópica neste órgão no momento do diagnóstico (RAO-BINDAL et al., 2012). O desenvolvimento de metástases para pulmões representa a causa mais comum de morte em pacientes com osteossarcoma (OSBORNE & KHANNA, 2012).

Focos de metástases podem ser observados, também, no fígado, rim, tecido ósseo, baço, miocárdio, linfonodos, diafragma, mediastino, medula e intestinos. No entanto, a ocorrência de metástases cutâneas de osteossarcoma é um fato considerado de ocorrência extraordinariamente rara e de patogênese ainda incerta (SPODNICK et al., 1992; MYHAND et al., 1995; BERSANO, 2006).

Para OUYANG et al. (2013), um número significativo de pacientes com osteossarcoma ainda respondem fracamente à quimioterapia intensiva e têm risco de recidiva local ou metástases à distância. Além disso, tratar a metástase continua a ser um desafio para os oncologistas. Os regimes terapêuticos que visam os tumores primários podem não ser bem sucedidos no tratamento da metástase (OSBORNE & KHANNA, 2012). A análise e compreensão da via molecular envolvida no processo de formação da metástase, por meio da caracterização genômica e proteômica, pode auxiliar no desenvolvimento de biomarcadores para detectar a progressão do osteossarcoma e permitir que as células do sistema operacional parem de crescer no microambiente pulmonar. Ao investigar o procedimento de desenvolvimento da metástase é possível descobrir os mecanismos de resistência às drogas e desenvolver novas estratégias terapêuticas para os pacientes (FLORES et al., 2012; RAO-BINDAL et al., 2012).

## **TRATAMENTO**

### **Tratamento cirúrgico**

O tratamento cirúrgico de escolha é a amputação do membro envolvido (ETTINGER & FELDMAN, 2004; SANTOS, 2009). Para as neoplasias com localização na pelve, a hemipelvectomy parcial ou total, embora seja um procedimento cirúrgico agressivo, também pode ser realizada com sucesso. Porém a margem de segurança pode ficar comprometida se o estágio do comprometimento ósseo estiver avançado. Muitos proprietários se mostram relutantes em aceitar a indicação da amputação e devem ser informados da habilidade do cão em se adaptar à nova realidade (DALECK et al., 2006). A amputação irá aliviar a dor, embora não prolongue necessariamente a vida dos cães, a menos que seja conjugada a um programa agressivo de outras modalidades terapêuticas, como a quimioterapia simples ou combinada, imunoterapia e radioterapia (ETTINGER & FELDMAN, 2004; CAVALCANTI, 2007; SANTOS, 2009). Para KARNIK et al. (2012), o tratamento da lesão primária somente por amputação ou ressecção do osso doente raramente é curativo, evoluindo para metástase.

Como alternativa aos casos onde o proprietário se recusa a autorizar a amputação do membro afetado ou para animais que, além da neoplasia óssea, apresentam alterações neurológicas ou outras afecções ortopédicas, existe a técnica que envolve a substituição do osso afetado por uma prótese. Para a realização desta cirurgia é necessário poupar parte do membro afetado e, com isso, a margem cirúrgica da excisão se torna crítica, aumentando a incidência de metástases (KARNIK et al., 2012).

### **Quimioterapia**

A terapia para induzir a remissão do tumor em cães e humanos inclui a cisplatina, carboplastina, doxorubicina e metotrexato (CINEGAGLIA et al., 2012; OSBORNE & KHANNA, 2012). Os efeitos colaterais refletem em cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade (GALLAGHER et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Em cães, a droga de escolha é a cisplatina que possui o efeito de prolongar significativamente os intervalos livres da doença e a sobrevida do animal (DALECK et al., 2002; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008).

Uma forma de auxiliar na escolha do protocolo de quimioterapia a ser adotado é o sistema de classificação Huvos. Trata-se de uma estimativa quantitativa da porcentagem de necrose das células tumorais, observadas no tumor após a cirurgia. Os pacientes que apresentam necrose tumoral, em pelo menos 90% da amostra do tumor ressecado, são classificados como bons respondedores e têm prognóstico melhor. Pacientes com escores baixos de necrose são encaminhados a receber protocolos quimioterápicos alternativos e mais agressivos (OSBORNE & KHANNA, 2012).

A utilização da quimioterapia antes do procedimento cirúrgico tem a vantagem de proporcionar oportunidade de maior sucesso para ressecção do tumor primário, preservando o membro afetado (OSBORNE & KHANNA, 2012). O paciente que for tratado com quimioterapia após a amputação, e que for vítima de metástase

pulmonar, deverá ser submetido a metastasectomia seguida de protocolo de quimioterapia adicional (NELSON & COUTO, 2006).

A resistência à quimioterapia pode estar associada à mutação da proteína p53 (CAVALCANTI, 2007). Além disso, os resultados da quimioterapia para osteossarcoma, na presença de metástase, continuam a ser pouco satisfatórios (ZHANG et al., 2013). DAI et al. (2013), consideram o atual manejo terapêutico pouco eficaz e reconhecem a necessidade da descoberta de novos agentes.

### **A busca por novos agentes antineoplásicos**

Nos últimos anos, a comunidade científica tem se esforçado para desenvolver novos agentes antineoplásicos por meio da descoberta de novos quimioterápicos, da utilização de plantas e outras fontes naturais (ZHANG et al., 2013).

Própolis é uma substância obtida pelas abelhas, que apresenta atividades antimicrobianas, antioxidante e anti-inflamatória. Além disso, exerce efeito citotóxico em células de osteossarcoma canino, com potencial para o desenvolvimento de um novo agente terapêutico (CINEGAGLIA et al., 2012).

Os bifosfonatos são uma classe de substâncias que evitam a perda da massa óssea. Esta categoria terapêutica tem demonstrado atividades antineoplásicas no osteossarcoma, em modelos de camundongos, por meio da inibição da reabsorção mediada pelos osteoclastos no local do tumor primário. Desta forma, é possível reduzir a lise e a dor óssea (WOLFE et al., 2011).

A baicaleína é um flavonóide obtido por meio do *Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA), utilizado na China para o tratamento de diversas doenças. O estudo de ZHANG et al. (2013), demonstrou que a baicaleína pode inibir a proliferação celular, promover a apoptose das células do osteossarcoma, dificultar o processo de metástase, aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais de outros quimioterápicos.

A survivina é uma proteína com funções de regular a divisão celular e inibir a apoptose nas células neoplásicas. A inibição da survivina em linhagens de osteosarcoma canino *in vitro*, mostrou diminuição do número de células malignas viáveis, aumento de apoptose, impossibilidade mitótica e maior sensibilidade à ação da terapia utilizando carboplatina e doxorrubicina (SHOENEMAN et al., 2012).

A vitamina D tem um papel importante no desenvolvimento e manutenção dos ossos. Possui, também, atividade antineoplásica em cultivos celulares de alguns carcinomas humanos, como diminuição do índice de proliferação e de apoptose. Para o osteossarcoma, estudos *in vitro* sugerem que esta vitamina pode vir a ser um agente terapêutico adicional, melhorando a resposta à quimioterapia e diminuindo os índices de efeitos adversos (GALLAGHER et al., 2012).

Columbamine é um componente ativo da erva *Coptis chinensis* que pode inibir a proliferação e neovascularização das células do osteossarcoma metastático, por reduzir a migração celular, adesão, invasão e promover a diminuição da capacidade de formar estruturas semelhantes a tubos capilares (BAO et al., 2012).

### **Radioterapia**

A radioterapia pode ocasionar a remissão da dor por longos períodos e o

retardo no crescimento neoplásico, sendo um procedimento indicado em casos em que há impossibilidade de excisão cirúrgica tumoral. Apesar de existirem casos de osteossarcoma induzido por radiação em animais, a combinação entre a radioterapia e a cirurgia pode prolongar a sobrevivência dos pacientes (ETTINGER & FELDMAN, 2004; BERSANO, 2006). A radioterapia local associada à quimioterapia, sem amputação, pode trazer algum benefício, porém com a diminuição do limiar de dor à neoplasia, o cão recobra o uso normal do membro e fraturas patológicas podem ocorrer na área, além de osteomielite e evolução para metástases (NELSON & COUTO, 2006). SHRINGARPURE et al. (2012), consideram o osteossarcoma um tumor ósseo relativamente radorresistente.

### **Osteossarcoma secundário a radiações ou sarcoma ósseo radioinduzido**

O primeiro relato da ação cancerígena das radiações ocorreu em 1895. O caso de uma pessoa que trabalhava com tubos de raios X e desenvolveu epitelioma cutâneo foi descrito em 1902. O osteossarcoma foi relatado em dois homens que trabalhavam com material radioativo para pintar mostradores luminosos de relógios, em 1929. Diversas neoplasias têm sido observadas em inúmeros pacientes humanos com histórico de radioterapia e o osteossarcoma é apontado como o mais frequente tumor maligno radioinduzido. Para estabelecer a radiação como causa, é necessário que haja ausência prévia de neoplasia maligna no osso comprometido, desenvolvimento do sarcoma na área do campo irradiado e confirmação microscópica da neoplasia (PRÓSPERO, 2001).

Na medicina veterinária, GILLETTE et al. (1990), iniciaram experimentos com base na preocupação com os efeitos tardios da terapia de radiação, incluindo a indução de tumores ósseos. Concluíram que a sequência de radiações fracionadas, com doses acima de 3,5Gy, seguidas de uma dose única maior parece aumentar a carcinogenicidade. Em 1992, um total de 66 sarcomas ósseos, sendo 49 osteossarcomas, foi diagnosticado num experimento envolvendo 403 cães e o uso do estrôncio-90. No grupo de dose mais elevada, a proporção de osteossarcoma aumentou acentuadamente. As maiores ocorrências foram no úmero, fêmur e mandíbula. O estudo estatístico mostrou uma correlação refletindo uma combinação crítica das células precursoras de osteossarcoma, taxa de divisão celular e dose de radiação (GILLETTE et al., 1992).

Em 2008 foi feita uma investigação sobre os fatores de risco em 119 cães que receberam terapia de radiação, ficando constatados, radiograficamente e histologicamente, dez tumores ósseos. O período de aparecimento da neoplasia foi em torno de 2,6 a 8,7 anos após a terapia. As complicações foram maiores no úmero e em cães com menos de sete anos de idade. Chegaram, então, à conclusão que essas são complicações raras da terapia de radiação e pouca informação a respeito dessas complexidades está disponível na medicina veterinária (HOSOYA et al., 2008).

Em pacientes humanos, os osteossarcomas que ocorrem na quinta e sexta décadas de vida, frequentemente, são secundários à radioterapia (GALLAGHER et al., 2012). O osteossarcoma da próstata, por exemplo, é relatado como consequência da radioterapia em pacientes com câncer de próstata. Ocorre, raramente, um ano após a radioterapia e se caracteriza pelo prognóstico desfavorável (STANGELBERGER et al., 2012).

## PROGNÓSTICO

Para avaliação do prognóstico, alguns indicadores são muito importantes: raça, peso corporal, localização da lesão, subtipo histológico do tumor, presença de metástases, níveis séricos de fosfatase alcalina, graduação do tumor, diâmetro e volume do tumor, densidade vascular do tumor e grau de necrose tumoral após a quimioterapia (CAVALCANTI, 2007). A maioria dos animais com osteossarcoma do esqueleto axial morrem ou são submetidos à eutanásia por problemas associados ao tumor primário (NEUWALD et al., 2006).

O tempo médio de sobrevivência de cães tratados apenas com amputação é de aproximadamente quatro meses, sendo que para cães tratados com amputação e quimioterapia a sobrevivência é de aproximadamente um ano. Osteossarcomas localizados na escápula têm prognóstico ruim, havendo relatos de maior sobrevida quando acometem as articulações cárpicas e társicas (NELSON & COUTO, 2006; SANTOS, 2009). Tumores primários localizados nas extremidades, principalmente fêmur, têm maior atividade proliferativa quando comparados aos tumores originários em outros sítios (GALLAGHER et al., 2012).

A combinação de agentes na quimioterapia e o avanço nas técnicas cirúrgicas ortopédicas vêm aumentando a taxa de sobrevida em humanos. Pacientes com osteossarcoma primário, sem focos de metástase da doença na apresentação clínica, têm chance de 60% a 70% de cinco anos de sobrevida livre de recidiva (ANGSTADT et al., 2011; OSBORNE & KHANNA, 2012; OUYANG et al., 2013). A principal razão para a baixa taxa de sobrevivência é o fato da evolução para metástase. Pacientes com metástases têm prognóstico desfavorável, com taxa de sobrevivência entre 10% e 30% em longo prazo (FLORES et al., 2012; OSBORNE & KHANNA, 2012).

A ocorrência de metástases cutâneas de osteossarcoma em animais da espécie canina é um fator agravante para o prognóstico desta enfermidade (COSTA et al., 2001). Outro fator que torna o prognóstico desfavorável é o nível elevado de fosfatase alcalina, funcionando como um possível indicador de metástase e advertindo um tempo de sobrevida mais curto (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, vários aspectos na busca de uma melhor abordagem clínica do osteossarcoma vêm ao encontro da necessidade de diminuir a incidência das metástases, aumentar o tempo de sobrevida e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes. Torna-se essencial, também, a ação multidisciplinar envolvendo clínicos, anatomopatologistas, radiologistas e cirurgiões, trabalhando em conjunto para a obtenção de melhores resultados quanto ao diagnóstico, prognóstico e tratamento do osteossarcoma.

## REFERÊNCIAS

ANGSTADT, A. Y.; MOTSINGER-REIF, A.; THOMAS, R.; WILLIAM C. KISSEBERTH, W. C.; COUTO, C. G.; DUVAL, D. L.; NIELSEN, D. M.; MODIANO, J.



F.; BREEN, M. Characterization of Canine Osteosarcoma by Array Comparative Genomic Hybridization and RT-qPCR: Signatures of Genomic Imbalance in Canine Osteosarcoma Parallel the Human Counterpart. **Genes, Chromosomes & Cancer**. v.50, p.859–874, 2011.

BAO, M.; CAO, Z.; YU, D.; FU, S.; ZHANG, G.; YANG, P.; PAN, Y.; YANG, B.; HAN, H.; ZHOU, Q. Columbamine suppresses the proliferation and neovascularization of metastatic osteosarcoma U2OS cells with low cytotoxicity. **Toxicology Letters**. v.215, p.174– 180, 2012.

BERSANO, P.R.O. **Expressão imunoistoquímica da cicloxigenase–2 (Cox2) e quantificação das regiões organizadas de nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do osteossarcoma canino**. 2006. 120f. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa.

BURK, R.L.; FEENEY, D.A. **Small Animal Radiology and Ultrasonography. A Diagnostic Atlas and Text**. Missouri: Saunders, 2003, 728p.

CARVALHO, C.F. **Ultra-Sonografia em Pequenos Animais**. São Paulo: Editora Roca Ltda., 2004, 365p.

CAVALCANTI, J.N. **Osteossarcoma canino: estudo histopatológico, imunoistoquímico e da atividade proliferativa**. 2007. 96f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

CAVALCANTI, J.N.; AMSTALDEN, E.M.I.; GUERRA, J.L.; MAGNA, L.C. Osteossarcoma em cães: estudo clínico-morfológico e correlação prognóstica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.41, n.5, p.299-305, 2004.

CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, P. R. O.; M. C. BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. **Cytotoxic Action of Brazilian Propolis In Vitro on Canine Osteosarcoma Cells**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4861>. 2012. Acesso em: 18.01.2013.

COSTA, F.S.; TOSTES, R.A.; FARIAS, M.R.; SAMPAIO, R.L.; PEREZ, J.A. Metástase cutânea de osteossarcoma em um cão – relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.5, 2001.

DAI, X.; MA, W.; HE, X.; JHA, R. K. Elevated expression of adrenomedullin is correlated with prognosis and disease severity in osteosarcoma. **Medical Oncology**. v.30, p.1-9, 2013.

DALECK, C.R.; FONSECA, C.S.; CANOLA, J.L. Osteossarcoma canino revisão. **Revista Educação Continuada CRMV – SP**. v.5, n.3, p.233-242, 2002.

DALECK, C.R.; CANOLA, J.C.; STEFANES, S.A.; SHOCKEN, P.F.L.; DE NARDI, A.B. 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, 2006.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, v.1 e v.2, 3194p.

FLORES, R. J.; LI, Y.; YU, A.; SHEN, J.; RAO, P. H.; LAU, S. S.; VANNUCCI, M.; LAU, C. C.; MAN, T. K. **A systems biology approach reveals common metastatic pathways in osteosarcoma**. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/6/50>. 2012. Acesso em: 24.01.2013.

GALLAGHER, R.; KEIGHLEY, J.; TANCABELIC, J.; GARIMELLA, R.; PINSON, D.; TEMPLETON, K.; TAWFIK, O. Clinicopathologic correlation of vitamin D receptor expression with retinoid X receptor and MIB-1 expression in primary and metastatic osteosarcoma. **Annals of Diagnostic Pathology**. v.16, p.323–329, 2012.

GIANTIN, M.; VASCELLARI, M.; LOPPARELLI, R. M.; ARIANI, P.; VERCELLI, A.; MORELLO, E. M.; CRISTOFORI, P.; GRANATO, A.; BURACCO, P.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of the aryl hydrocarbon receptor pathway and cyclooxygenase-2 in dog tumors. **Research in Veterinary Science**. v.94, p.90–99, 2013.

GILLETTE, N.A.; POOL, R.R.; TAYLOR, G.N.; MUGGENBURG, B.A.; BOECKER, B.B. Strontium-90 induced bone tumors in beagle dogs: Effects of route of exposure and dose rate. **Internation Journal Radiation Biology**. v.61, p.821-831, 1992.

GILLETTE, S.M.; GILLETTE, E.L.; POWERS, B.E. Radiation-induced osteosarcoma in dogs after external beam or intraoperative radiation therapy. **Cancer Res**. v.50, p.54-57, 1990.

HOFSTAETTER, J. G.; ROSCHGER, A.; PUCHNER, S.; DOMINKUS, M.; SULZBACHER, I.; WINDHAGER, R.; KLAUSHOFER, K.; ROSCHGER, P. **Altered matrix mineralization in a case of a sclerosing osteosarcoma**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.12.043>. 2013. Acesso em: 18 de janeiro de 2013.

HOSOYA, K.; POUSON, J.M.; AZUMA, C. Osteoradionecrosis and radiation induced bone tumors following orthovoltage radiation therapy in dogs. **Veterinary radiology & Ultrasound**. v.49, p.189-195, 2008.

KARNIK, K. S.; SAMII, V. F.; WEISBRODE, S. W.; LONDON, C. A.; GREEN, E. M. Accuracy of computed tomography in determining lesion size in canine appendicular osteosarcoma. **Veterinary Radiology Ultrasound**. v.53, p.273–279, 2012.

KLEINER, J.A.; SILVA, E.G. Bone Tumors Affecting Small Animals. **MedVep**. v.1, n.3, 2003.

KRAJARNG, A.; NILWARANKOON, S.; SUKSAMRARN, S.; WATANAPOKASIN, R. Antiproliferative effect of a-mangostin on canine osteosarcoma cells. **Research in Veterinary Science**. v.93, p.788-794, 2012.

LANGDON, S. P. Animal Modeling of Cancer Pathology and Studying Tumor Response to Therapy. **Current Drug Targets**. v.13, p.1535-1547, 2012.

LAVIN, L.M. **Radiography in Veterinary Technology**. St. Louis: Saunders/Elsevier, 2007, 378p.

LU, Q.; LV, Q.; KIM, A.; HA, J. M.; KIM, S. Expression and clinical significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147, in human osteosarcoma. **Oncology Letters**. v.5, p.201-207, 2013.

MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4.ed., Iowa: Iowa State Press, 2002, 778p.

MYHAND, R.C.; HUNG, P.S.; CALDWELL, J.B.; JAMES, W.D.; SAL, P.; HARGIS, J.B. Osteogenic sarcoma with skin metastases. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.32, p.803-805, 1995.

NANCI NETO, F.; MARCHIORI, E.; VIANNA, A.D.; AYMORÉ, I.L.; ALMEIDA, A.L.B.; IRION, K.L.; COLLARES, F.B. Osteossarcoma Parosteal: Aspectos na Radiologia Convencional. **Radiologia Brasileira**. v.40, n.2, p.81-86, 2007.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 737p.

NEUWALD, E.B.; VELGA, D.C.; OLIVEIRA, E.C.; CONTESINI, E.A. Osteossarcoma craniano em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, p.215-219, 2006.

OLIVEIRA, F.; SILVEIRA, P.R. Osteossarcoma em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n.10, 2008.

OSBORNE, T. S.; KHANNA, C. A Review of the Association between Osteosarcoma Metastasis and Protein Translation. **Journal of Comparative Pathology**. v.146, p.132-142, 2012.

OTONI, C.C.; RAHAL, S.C.; VULCANO, L.C.; RIBEIRO, S.M. HETTE, K.; GIORDANO, T.; DOICHE, D.P.; AMORIM, R.L. Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.52, n.20, p.1-10, 2010.

OUYANG, L.; LIU, P.; YANG, S.; YE, S.; XU, W.; LIU, X. A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. **Medical Oncology**. v.30, p.340, 2013.

OWENS, J.M.; BIERY, D.N. **Radiographic Interpretation for the Small Animal Clinician**. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999, 313p.

POOLE, N. M.; OGARI, L. N.; KRAMER, C.; COONS, L. B.; COLE, J. A. Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-

MB-231 breast cancer cells. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.4, p.120– 127, 2013.

PRÓSPERO, J.D. **Tumores ósseos**. São Paulo: Editora Roca Ltda., 2001, 280p.

RAO-BINDAL, K.; RAO, C. K.; YU, L.; KLEINERMAN, E. S. **Expression of c-FLIP in Pulmonary Metastases in Osteosarcoma Patients and Human Xenografts**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.24412>. 2012. Acesso em: 24.01.2013.

RYSEFF, J. K.; BOHN, A. A. Detection of alkaline phosphatase in canine cells previously stained with Wright–Giemsa and its utility in differentiating osteosarcoma from other mesenchymal tumors. **Veterinary Clinical Pathology**. v.41, p.391-395, 2012.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**. v. 17, P.380-388, 2011.

SANTOS, M.C.S.; ROMÃO, M.A.P.; FERREIRA, M.L.; ALMEIDA, F.M.; CARVALHO, L.C.R. Uso da radiologia na pesquisa de metástase pulmonar em cadelas portadoras de nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, p.564-566, 2007.

SANTOS, S.O. **Osteossarcoma canino: Relato de casos**. 2009. 48f. TCC (Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco.

SHOENEMAN, J. K.; EHRHART, E. J.; EICKHOFF, J. C.; CHARLES, J. B.; POWERS, B. E.; THAMM, D. H. Expression and Function of Survivin in Canine Osteosarcoma. **Cancer Research**. v.72, p.249-259, 2012.

SHRINGARPURE, S. S.; KUMAR, A.; SHANKAR, S.; MENON, M. A case of primary extraosseous penile osteosarcoma and review of the literature. **Indian Journal of Urology**. v.28, p.102-104, 2012.

SOAVE, T.; SOUSA, O.P.; MORENO, K.;BELONI, S.N.E.; GONZALES, J.R.M.; GROTTI, C.C.B.; REIS, A.C.F. A importância do exame radiográfico torácico na abordagem de animais portadores de neoplasias. **Semina: ciências Agrárias**. v.29, p.399-406, 2008.

SPODNICK, G.J.; BERG, J.; RAND, W.M. Prognosis for Dogs with Appendicular Osteosarcoma Treated by Amputation alone: 162 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.200, n.7, p.995-999, 1992.

STANGELBERGER, A.; RIEDL, C. R.; SUSANI, M. Osteosarcoma of the prostate after radiotherapy. **Aktuelle Urologie**. v.43, p.409-11, 2012.

STEIN, T. J.; HOLMES, K. E.; MUTHUSWAMY, A.; THOMPSON, V.; HUELSMEYER, M. K. Characterization of  $\beta$ -catenin expression in canine osteosarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.9, p.65–73, 2011.

WOLFE, T. D.; PILLAI, S. P. S.; HILDRETH, B. E.; LANIGAN, L. G.; MARTIN, C. K.; WERBECK, J. L.; ROSOL, T. J. Effect of zoledronic acid and amputation on bone invasion and lung metastasis of canine osteosarcoma in nude mice. **Clinical and Experimental Metastasis**. v.28, p.377–389, 2011.

ZHANG, Y.; SONG, L.; CAI, L.; WEI, R.; HU, H.; JIN, W. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. **Food and Chemical Toxicology**. v.53, p.325–333, 2013.