PAULO RICARDO DE OLIVEIRA BERSANO

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLOXIGENASE-2 (Cox2) E QUANTIFICAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (NORs) NOS DIFERENTES PADRÕES HISTOLÓGICOS DO OSTEOSSARCOMA CANINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

PAULO RICARDO DE OLIVEIRA BERSANO

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLOXIGENASE-2 (Cox2) E QUANTIFICAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (NORs) NOS DIFERENTES PADRÕES HISTOLÓGICOS DO OSTEOSSARCOMA CANINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de dezembro de 2006.

_____	_____
Prof. Cláudio César Fonseca (Co-orientador)	Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
_____	_____
Profª. Rogéria Serakides	Profª. Cleuza M. de Faria Rezende

_____

Profª. Marlene Isabel Vargas Viloria

(Orientadora)

*À **Deus**, pela presença sempre constante em todos os momentos e pelo dom da vida,*

*Aos meus pais **José Guilherme** e **Josepha Maria** (in memorian),*

*À **Zilda**, aos meus queridos **irmãos** e toda a **família,***

pelos exemplos, apoio, dedicação, carinho e amor.

dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e em especial ao Departamento de Veterinária (DVT) pela oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária na área de Patologia Veterinária.

À professora Marlene Isabel Vargas Viloria, pela confiança, paciência, conselhos, competência, sugestões, pela orientação durante toda a Pós-Graduação e sobretudo pela amizade e respeito mútuo.

À professora Rogéria Serakides (UFMG), pela disponibilização do Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela amizade, auxílio nas avaliações histopatológicas, incentivo nos momentos de dificuldades, pela competência, pelos seus imprescindíveis conselhos, confiança, sugestões e ensinamentos.

À professora Cleuza Maria de Faria Resende (UFMG), por toda atenção, sugestões na realização do experimento, dedicação, apoio sempre que necessário, pelas conversas e pelos aconselhamentos e ponderações precisas.

À professora Renée Laufer Amorim (Unesp-Botucatu), pela disponibilização do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp Campus Botucatu, pelo auxílio nas análises histopatológicas, pela prestatividade, preocupação e empenho em querer ajudar, pela orientação, conselhos e pela amizade.

Ao professor Cláudio César Fonseca, pela competência, disponibilidade, paciência, conselhos, auxílio, apoio, orientação desde a gradução, pelas conversas e principalmente amizade e admiração.

Ao professor Laércio dos Anjos Benjamin, pela amizade construída desde o primeiro dia de graduação na aula de anatomia, pelos conselhos, admiração, competência, sugestões e pelo sempre bom humor característico.

Ao médico patologista e amigo José do Carmo Lopes Moreira, pela ajuda nas análises histopatológicas, conversas, sugestões, dedicação, por sempre estar pronto a auxiliar no que fosse preciso e sobretudo, pelo exemplo de humildade.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, por permitir a utilização das dependências do laboratório de biotecnologia (LBCHV-BIOAGRO), pelo apoio, pelos ensinamentos oferecidos e compartilhados por todo curso, pela atenção, respeito e amizade.

Ao professor Eduardo Paulino, pelo grande auxílio nas análises estatísticas e pelas críticas construtivas necessárias no trabalho.

Ao saudoso professor Marco Túlio David das Neves, que apesar de não poder estar presente entre nós durante a finalização deste trabalho, foi uma pessoa fundamental para o meu melhor entendimento dos processos fisiológicos que foram necessários saber neste estudo, sempre com palavras simples pra explicar o que é de difícil compreensão, lembrando que devemos "sempre olhar para o elefante como um todo e nunca apenas para a sua orelha.".

Ao professor Júlio Carlos Canola (Unesp-Jaboticabal) e à professora Naida Cristina Borges (UFGO), pela cortesia com a qual me forneceram os meus primeiros trabalhos sobre o osteossarcoma canino, despertando em mim a vontade de querer saber mais sobre esta doença.

À professora Sílvia Minharro Barbosa (UFT), pelo apoio, respeito, admiração, dedicação, empenho e grande ajuda na finalização dos trabalhos.

Ao professor Geovanni Dantas Cassali (ICB-UFMG), pela disponibilização do Laboratório de Patologia Comparada para a realização das correções sugeridas neste trabalho.

Aos professores Sérgio Luis Pinto da Mata, Lissandro Gonçalves Conceição, Andréa Pacheco Batista Borges, Ricardo Junqueira Del Carlo, Aloísio da Silva Pinto e Noeme Sousa Rocha (Unesp-Botucatu), pelas conversas, disponibilização de material, contatos profissionais e amizade.

Ao professor e grande amigo Ferdinan de Almeida Melo (UEMA), pela amizade, admiração, respeito, companheirismo, torcida e ajuda sempre precisa nos momentos em que mais precisei. Lembrando também do apoio, torcida e amizade de Fernando Andrade, Talmir Quinzeiro e Hélio Martins.

À todos os funcionários do DVT-UFV, em especial à Tatiana (Tatinha), Maria José (Maninha), Maria Lucinda, Camilo, Paulão, Claudinho, Luis Márcio, José Célio, Seu Nenzinho, Cláudio Fialho, Sidney, Causinho, pela ajuda direta ou indireta, pelo apoio, torcida e amizade.

Aos funcionários Adão Carlos Cardoso e Cláudio Veridiano Cardoso do Laboratório de Histopatologia (DVT-UFV) e Marilene Campos de Almeida do setor de Patologia (EV-UFMG), pela paciência, amizade construída e auxílio na confecção das lâminas.

À funcionária da Pós-Graduação Rosi, pela torcida, ajuda, competência e amizade.

Aos funcionários Geraldinho, Eloísa, Fátima e Conceição que por inúmeras vezes com paciência e gentileza atenderam os meus pedidos de viagens com destino à Belo Horizonte/Viçosa, numa fase de necessidade e decisões importantes em meu experimento.

À Lívia Maria da Silva Ribeiro e família, pela paciência, amizade, apoio, força e ajuda pra superar os constantes desafios que surgiram durante todo este tempo de estresse e agitações.

Aos amigos Anna Paula B. R. Ferreira, Fabrício Valente, Gabriel Carvalho e Javier Benevides que compartilharam momentos de alegrias e angústias durante o desenvolvimento de nossos trabalhos, porém, tiramos como mérito disto tudo, a nossa amizade, nosso respeito mútuo e admiração profissional. Tudo regado com bom humor, paciência, responsabilidade e jamais nos deixando abater com os desafios que freqüentemente nos deparávamos. Como sempre dissemos: “No final dá tudo certo...”

À amiga Ana Paula Adry, que forneceu gentilmente grande parte do material bibliográfico deste trabalho, pela ajuda, torcida, preocupação e amizade.

À amiga Michelle Bressan, pela torcida, conversas, discussões sobre Pós-Graduação e sobretudo pela amizade construída.

Aos amigos e colegas Juliana Munique, Juliana De Bortoli, Laila e Lívia Bonfá, Pablo Herthel e muitos outros que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização e desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de Pós-Graduação Abelardo, Miriam, Célber, Alessandro, Cristina, Fábio Moraes, Daniel, Miriam, Priscila, Carol, Vinícius e Diogo simplesmente pela amizade e força.

À minha amiga Andressa Barros Eleotério, por compartilhar a insistente procura de artigos sobre osteossarcoma canino por mais de um ano, pela amizade construída durante toda graduação, pelo apoio, torcida e respeito.

Aos colegas e amigos Celmira Calderon, Pedro Pinczowski e Leandro Teixeira da Pós-Graduação em Patologia Veterinária da Unesp Botucatu, pela grande ajuda durante a realização do experimento, pela amizade, respeito e reconhecimento da importância que tiveram neste trabalho.

Aos amigos Carlos Henryque e Márcio Mendes pela grande ajuda no desenvolvimento e reailzação das inúmeras técnicas laboratoriais que foram necessárias para o desenvolvimento do experimento e de meu aprendizado.

Aos colegas e amigos da Patologia da EV-UFMG Edmilson, Natália, Patrícia Souza, Silvia Araújo, Janquerle, Taismara, Mel, professor Roberto Guedes, Ernani e as funcionárias Júnia e Elizete.

Aos amigos Gustavo Araújo e Carla Moya pela estadia em Botucatu, amizade, torcida, ajuda e força.

Ao meu presente de Graduação que se estendeu pelo Mestrado e certamente me acompanhará por mais de dez anos ainda, que é o meu grande companheiro, amigo sincero, que traz alegria ao meu dia-a-dia e à república. Este é o Wilbhert, meu "filho preto" que eu nunca canso de dizer e amar, sempre carinhoso, obediente e sem igual.

Aos amigos de república Paulo Alexandre Fernandes Marques, Márcio Antônio Vidal Moretto, João Batista Mendes, Jair Camargo Ferreira e Flávio Guiseli Lopes, pelas risadas, companheirismo, convivência, torcida e sobretudo pela grande amizade e é claro, por terem cuidado do Wilbhert quando estive ausente.

À Marinete Batista (Tita), pela amizade durante todos esses anos, risadas, por sua presença sempre alegre e seu exemplo de força e perseverança perante as dificuldades da vida.

A todos que direta ou indiretamente proporcionaram a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

À minha mãe, que é e sempre será motivo de orgulho para mim e a toda Família pelo seu exemplo de vida, perseverança, coragem, luta e por sua linda história. Sinto sua presença desde o momento que acordo, se estende quando vou me deitar e sei que me acompanha em meus sonhos a noite e em todos os outros sonhos de minha vida, compartilhando as conquistas e desilusões, mas também sei que quem persevera sempre alcança. Obrigado pelo nome que me acompanhará por toda eternidade, pela sua presença e amor incondicional de mãe que nunca se ausentou.

Ao meu pai, que é minha base, espelho, minha fortaleza, motivo de orgulho, perseverança, dedicação que tanto fez e faz por mim e a todos meus irmãos, com sua insistência em proporcionar sempre ensino e educação a todos os seus filhos, mostra-nos o quão nobre é o dom do saber. Sempre dando apoio, incentivo, confiança, carinho mesmo distante fisicamente, mas sempre presente com sua torcida, compartilhando passo a passo todos os momentos de minha vida. Não me esquecendo da Zilda que sempre com seu amor também pude sentir sua torcida, incentivo e carinho.

Aos meus queridos e amados irmãos Ana Lúcia, Duda, James, Carminha, Tuca, Janaina, Benê e Álvaro, que tanto fazem e fizeram por mim. Sempre vibrantes e presentes com conselhos, incentivos, acolhimento, carinho e sobretudo exemplo de vida e amor. Meu eterno obrigado por fazerem parte desta conquista que compartilho com todos vocês.

À Nossa Senhora Mãe de Deus, que não cansa de interceder por mim e por todos nós, minha eterna gratidão pela sempre presença de seu doce amor misericordioso e piedoso, rogai por nós.

Ao amor eterno de Deus Pai que nos criou, Deus Filho que nos remiu e o Espírito Santo que nos santifica, sem o qual, nada disso seria possível, pois foram nos momentos de angústias, aflições e desilusões que sua presença foi ainda mais sentida, nunca me deixando só, mostrando com sua compaixão que apesar das turbulências ocorridas Sua mão sempre esteve estendida e pronta pra iluminar e santificar a minha vida.

Vigiai!

Sede firmes na fé!

Sede homens!

Sede fortes!

I Cor 16, 13

BIOGRAFIA

PAULO RICARDO DE OLIVEIRA BERSANO, filho de José Guilherme Bersano e Josepha Maria de Oliveira Bersano (*in memorian*), nasceu em Ibitinga, SP, aos 04 de maio de 1974.

Concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (MG) em janeiro de 2004.

Em agosto deste mesmo ano ingressou no curso de Pós-Graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, cujos trabalhos de mestrado em Medicina Veterinária foram ministrados na área de Patologia Veterinária.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS xiii
LISTA DE TABELAS xvii
RESUMO xviii
ABSTRACT xx
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 4
2.1. Objetivo geral 4
2.2. Objetivos específicos 4
3. REVISÃO DE LITERATURA 5
3.1. Câncer 5
3.2. Osteossarcoma canino 9
3.2.1. Osteossarcomas esqueléticos 10
3.2.1.1. Osteossarcomas periosteais 10
3.2.1.2. Osteossarcomas paraosteais ou justacorticais 11
3.2.2. Osteossarcomas extra-esqueléticos 11
3.2.3. Incidência e fatores de risco associados 12
3.2.4. Tumorogênese e comportamento biológico 14
3.2.4.1. Fatores genético-moleculares 15
3.2.4.2. Hormônio do crescimento (GH) 16
3.2.5. Sinais clínicos 16
3.2.6. Diagnóstico 19
3.2.7. Tratamento 19
3.2.8. Prognóstico 20
3.2.9. Classificação dos osteossarcomas 21
3.2.9.1. Características radiológicas 21

3.2.9.1.1. Osteoblástico 21
3.2.9.1.2. Osteolítico 22
3.2.9.1.3. Misto..... 22
3.2.9.2. Características histológicas..... 22
3.2.9.2.1. Osteossarcoma osteoblástico..... 23
3.2.9.2.2. Osteossarcoma condroblástico..... 23
3.2.9.2.3. Osteossarcoma fibroblástico..... 24
3.2.9.2.4. Osteossarcoma do tipo células gigantes..... 24
3.2.9.2.5. Osteossarcoma teleangectásico..... 24
3.2.9.2.6. Osteossarcoma pobremente diferenciado... 25
3.3. Avaliação da proliferação celular..... 25
3.4. Marcadores histoquímicos para proliferação celular (AgNOR)..... 26
3.5. Cicloxigenases..... 28
3.6. Correlação da cicloxigenase-2 com o câncer..... 29
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 32
4.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo..... 32
4.2. Processamento do material..... 32
4.3. Coloração hematoxilina-eosina (HE)..... 33
4.3.1. Contagem das figuras de mitose..... 33
4.4. Coloração de AgNOR (Impregnação pela prata)..... 33
4.4.1. Contagem e análise das AgNORs..... 34
4.5. Imunoistoquímica..... 34
4.5.1. Técnica de imunoistoquímica..... 34
4.5.2. Estudo imunoistoquímico..... 36
4.6. Análise estatística..... 36
5. RESULTADOS..... 37
5.1. Estudo restrospectivo..... 37
5.1.1. Freqüências encontradas segundo as raças..... 37
5.1.2. Freqüências encontradas segundo o peso..... 38
5.1.3. Freqüências encontradas segundo o sexo..... 39
5.1.4. Freqüências absolutas segundo as idades..... 39
5.1.5. Freqüências encontradas segundo a localização anatômica..... 40
5.2. Análise histológica (HE)..... 40
5.2.1. Principais características histológicas encontradas..... 41
5.2.1.1. Osteossarcoma osteoblástico..... 41

5.2.1.2. Osteossarcoma condroblástico..... 44
5.2.1.3. Osteossarcoma fibroblástico..... 44
5.2.1.4. Osteossarcoma do tipo células gigantes..... 44
5.2.1.5. Osteossarcoma teleangectásico..... 47
5.2.1.6. Osteossarcoma combinado ou misto..... 47
5.2.1.7. Osteossarcoma pobremente diferenciado..... 47
5.3. Contagem de figuras de mitose..... 50
5.4. Coloração de AgNOR..... 50
5.4.1. Contagem e análise das AgNORs..... 51
5.5. Imunoistoquímica..... 56
5.6. Análise estatística..... 62
5.6.1. Mitose..... 62
5.6.2. AgNOR..... 62
5.6.3. Cox2..... 62
6 DISCUSSÃO..... 65
6.1. Estudo retrospectivo..... 65
6.1.1. Freqüências encontradas segundo as raças, peso, sexo, idades e localização anatômica..... 65
6.2. Observações microscópicas (HE)..... 67
6.2.1. Principais características histológicas encontradas..... 67
6.3. Contagem de figuras de mitoses..... 67
6.4. Contagem e análise das AgNORs..... 68
6.5. Imunohistoquímica..... 69
6.6. Osteossarcoma osteoblástico..... 70
6.7. Osteossarcoma condroblástico..... 72
6.8. Osteossarcoma fibroblástico..... 73
6.9. Osteossarcoma combinado ou misto..... 74
6.10 Limitações adicionais encontras no trabalho..... 76
7. CONCLUSÕES..... 78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 80
ANEXO..... 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema adaptado a partir de Goodman & Gilman's – Pharmacological basis of theapeutics, 2001; mostrando a degradação enzimática do ácido araquidônico (Resposta inflamatória) – via das cicloxigenases e da lipoxigenase.....	28
Figura 2	Número de animais e porcentagens das raças caninas acometidas pelo osteossarcoma.....	38
Figura 3	Porcentagem de cães com osteossarcoma em relação aos seus pesos em quilogramas: < 16kg, 16-37,12kg, > 37,13kg e sem informação.....	38
Figura 4	Porcentagem de cães com osteossarcoma por sexo: machos, fêmeas e sem informação.....	39
Figura 5	Freqüência absoluta e porcentagem de cães com osteossarcoma de acordo com o intervalo das idades: 0|-2, 2|-4, 4|-6, 6|-8, 8|-10, 10|-12, 12|-14, ≥ 14 e sem informação.....	39
Figura 6a	Porcentagem de cães com osteossarcoma extra-esquelético, esquelético e sem informação.....	40
Figura 6b	Porcentagem de cães com osteossarcoma no esqueleto axial, apendicular e sem informação.....	40
Figura 7	Porcentagem dos tipos de osteossarcoma segundo a classificação histológica.....	41
Figura 8	Osteossarcoma osteoblástico. Grande número de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Em A, notam-se nas áreas próximas das trabéculas ósseas (a) células gigantes multinucleadas (setas). Em B, há proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada (osteóide) (setas) – HE. 400X.....	42

Figura 9 Osteossarcoma condroblástico. Em A, predomínio de matriz condróide, com pequenas áreas de produção de matriz óssea (osteóide) (setas). Em B, predomínio de matriz condróide maligna com células neoplásicas pleomórficas – HE. 400X..... 43

Figura 10 Osteossarcoma fibroblástico. Presença de grande número de células fusiformes malignas. Em A, observa-se o predomínio de tecido fibrossarcomatoso. Em B, nota-se matriz óssea neoformada, área de diferenciação osteossarcomatosa com focos de mineralização (a), tecido ósseo calcificado (b), células fusiformes malígnas (c) – HE. 600X..... 45

Figura 11 Osteossarcoma de células gigantes. Tumor caracterizado por grande número de células gigantes multinucleadas. Em A, nota-se células sarcomatosas indiferenciadas (a) e área de produção de matriz óssea maligna (b) – HE. 200X. Em B, observam-se muitas células gigantes multinucleadas neoplásicas junto aos osteoblastos neoplásicos pleomóficos – HE. 400X..... 46

Figura 12 Osteossarcoma teleangectásico. Extensas áreas hemorrágicas. Presença de ectasias neovasculares, com células gigantes multinucleadas e produção de matriz óssea maligna. Em A, observa-se vaso ingurgitado de sangue (a), produção de matriz óssea (b), células gigantes multinucleadas (c) e área de necrose tumoral (d). – HE. 200X. Em B, há produção de matriz óssea neoplásica (a). – HE. 400X..... 48

Figura 13 Osteossarcoma combinado ou misto. Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular. Em A, observa-se tecido cartilaginoso maligno (a), matriz óssea maligna (b), vaso sangüíneo (c), trabécula óssea neoplásica circundando um vaso sangüineo (d) e tecido fibrossarcomatoso maligno (e). – HE. 200X. Em B, nota-se matriz condróide maligna (a), células pleomórficas malignas (b) e células malignas fusiformes (c). – HE. 400X..... 49

Figura 14 Valor médio encontrado das figuras de mitose em 10 campos diferentes e os valores médios nos osteossarcomas canino: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e misto respectivamente, com aumento de 400X (Ocular 10X e objetiva 40X)..... 50

Figura 15 Valores médios porcentuais da contagem de pontos de NORs em 100 células nos diferentes padrões histológicos do osteossarcoma canino..... 51

Figura 16 Osteossarcoma osteoblástico corado pela técnica de AgNOR, apresentando pleomorfismo celular moderado a acentuado com núcleos celulares marcados pela prata com múltiplas NORs intra-nucleares (setas). 1.000X 52

Figura 17 Osteossarcoma condroblástico corado pela técnica de AgNOR, apresentando núcleos celulares envoltos por matriz condróide com menor quantidade de NORs intra-nucleares (setas). 1.000X..... 52

Figura 18 Osteossarcoma fibroblástico corado pela técnica de AgNOR, observa-se os núcleos fusiformes a ovalados com núcleos celulares impregnados pela prata com múltiplas NORs intranucleares. 1.000X..... 53

Figura 19 Osteossarcoma combinado (misto) corado pela técnica de AgNOR, observa-se a esquerda padrão histológico osteoblástico e a direita condroblástico, em ambos os núcleos celulares apresentaram impregnação pela prata com múltiplas NORs intranucleares. 1.000X..... 53

Figura 20 (A e B) Osteossarcoma osteoblástico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Este padrão histológico foi o que apresentou maior celularidade e maior número de imunomarcações. Observa-se presença de matriz óssea entre as células neoplásicas (setas)..... 55

Figura 21 (A e B) Osteossarcoma condroblástico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Observa-se presença de matriz condróide (setas) com citoplasma imunomarcado em muitas células tumorais..... 56

Figura 22 (A e B) Osteossarcoma fibroblástico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Nota-se presença de célula gigante multinucleada (seta) entremeada em muitas células fusiformes imunomarcadas..... 58

Figura 23 (A e B) Osteossarcoma combinado (misto). Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Este padrão histológico apresentou imunomarcação discreta como é mostrado em A, moderada, e moderada a intensa como se observa em B..... 59

Figura 24 Osteossarcoma de células gigantes. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Junto dos osteoblastos neoplásicos, observam-se células gigantes multinucleadas em diferentes intensidades de reação (setas)..... 60

Figura 25 Osteossarcoma teleangectásico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 200X. Observa-se imunomarcação no tecido neoplásico do tumor e no êmbulo metastático (setas)..... 60

Figura 26 Controle Positivo; utilizando-se osteossarcoma combinado (misto). Imunomarcação positiva das células inflamatórias pelo anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração hematoxilina. 200X..... 61

Figura 27 Controle Negativo; utilizando-se osteossarcoma combinado (misto). Ausência de imunomarcação. Solução tampão TRIS, DAB. Contra-coloração hematoxilina. 400X..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos positivos (+) e negativos (-) da imunoistoquímica segundo o padrão histológico do osteossarcoma canino.....	54
Tabela 2	Correção de Pearson entre as variáveis mitose, AgNOR e Cox2.....	62
Tabela 3	Expressão da Cox2 segundo o padrão histológico.....	63
Tabela 4	Expressão da Cox2 nos osteossarcomas osteoblásticos.....	63
Tabela 5	Expressão da Cox2 nos osteossarcomas condroblásticos.....	63
Tabela 6	Expressão da Cox2 nos osteossarcomas fibroblástico.....	64
Tabela 7	Expressão da Cox2 nos osteossarcomas misto.....	64

RESUMO

BERSANO, Paulo Ricardo de Oliveira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Expressão imunoistoquímica da cicloxigenase-2 (Cox2) e quantificação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do osteossarcoma canino.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Viloria. Co-orientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, Ricardo Junqueira Del Carlo e Cláudio César Fonseca.

O propósito deste trabalho foi avaliar a intensidade da cicloxigenase 2 (Cox2), as Regiões Organizadoras de Nucléolos Impregnadas pela Prata (AgNORs) e as figuras de mitose por campo nos diferentes tipos de osteossarcomas canino, a partir de um estudo retrospectivo de pouco mais de 10 anos dos casos de osteossarcoma canino que surgiram na rotina da clínica de pequenos animais da Universidade Federal de Viçosa e da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As 78 ocorrências encontradas foram classificadas histologicamente e 6 casos de cada grupo classificados como osteossarcomas osteoblásticos, condroblásticos, fibroblásticos e combinados (mistos) foram submetidos às avaliações histoquímicas e imunoistoquímicas do estudo. Os osteossarcomas teleangectásico, de células gigantes e pobremente diferenciados não foram avaliados em decorrência do pequeno número de casos encontrados. Os resultados mostraram diferenças estatística ($p<0,05$) nas expressões da Cox2 e nas proteínas AgNORs entre os diferentes osteossarcomas, no entanto, esta diferença não acorreu na contagem das figuras de mitoses. Em todas as avaliações, o osteossarcoma osteoblástico que surgiu com 53% dos casos, foi o que apresentou maior número de NORs, de figuras de mitoses por campo e de casos positivos com maior contagem de células imunomarcadas. Desta forma, pode-se sugerir que o osteossarcoma osteoblástico apresenta maior agressividade em relação aos demais tipos de osteossarcomas avaliados neste trabalho, porém, por falta de informações e padronização nos dados clínicos, não

foi possível associar estes achados com a sobrevida e desenvolvimento tumoral, correlacionando-os com a agressividade dos diferentes tipos de osteossarcomas canino.

ABSTRACT

BERSANO, Paulo Ricardo de Oliveira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2006. **Expression immunohistochemistry of the cyclo-oxygenase 2 (Cox2) and quantification of the nucleolus organizing region (NOR) in different histological patterns of a canine osteosarcoma**. Adviser: Marlene Isabel Vargas Viloria. Co-advisers: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, Ricardo Junqueira Del Carlo and Cláudio César Fonseca.

The purpose of this study was to assess the intensity of the cyclo-oxygenase 2 (Cox2), as well as the nucleolus organizing regions impregnated with silver (AgNORs) and mitosis figures in different canine oteosarcomas. The material used for the analysis was obtained from a retrospective study of approximately 10 years, of canine oteosarcomas recorded in the clinics routine at Federal University of Viçosa and at Federal University of Minas Gerais. The 78 cases of osteosarcomas recorded were histologically analysed and 6 cases of each group were classified as being osteoblastics, condroblastics, fibroblastics and combined cases. This material was submitted to both histochemistry and immunohistochemistry evaluation. Telangiectatic giant cell type and poorly differentiated osteosarcomas were not evaluated due to the small number of observed cases. The results presented statistical differences ($p<0,05$) for the Cox2 expressions and for the AgNORs proteins among the different osteosarcomas, however no difference was found for the mitosis figures counting. Considering all the evaluations, the osteoblastic osteosarcoma recorded in 53 % of the cases, presented the highest number of NORs and mitosis figures by field, and also it showed the highest number of positive cases with the higher immunomarked cells counting. The results suggest that the osteoblastic osteosarcoma is more aggressive than the other kinds of osteosarcoma evaluated in this study, but because of the lack of both information and standardized clinics data, it is not possible at this point, to connect these findings with

the over life and tumor development, and not even to correlate the agressivity of the different kinds of canine osteosarcomas.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é o principal problema mundial de saúde e uma das causas mais importantes de morbidade e de mortalidade em crianças e adultos (ABBAS et al., 2003). Em pequenos animais, é a principal causa de morte (WITHROW, 2001). Segundo os dados do INCA[1] (2005), no Brasil, as neoplasias constituem a segunda causa de morte em seres humanos, precedida apenas pelas doenças cardiovasculares. As estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerão 472.050 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de câncer pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e de mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. A elevada incidência da doença é o principal motivo pelo qual a oncologia é um dos ramos mais estudados no mundo (OLIVEIRA, 2005).

As células cancerosas violam as regras mais básicas de comportamento pelos quais os organismos multicelulares são constituídos e mantidos, explorando todos os tipos de oportunidades oferecidas a elas (ALBERTS et al., 2004). Neoplasia é o crescimento anormal de um tumor dentro de um tecido que não é responsivo aos mecanismos de controle normal do organismo, podendo ser benigno ou maligno (POWERS, 2001).

Um tumor é considerado um câncer apenas se for maligno, isto é, somente se suas células tiverem adquirido a capacidade de invadir os tecidos adjacentes. Geralmente a invasividade implica capacidade de desagregação, penetração na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos e formação de tumores secundários, denominados metástases. Quanto mais um tumor se dispersar, mais difícil será erradicá-lo

[1] BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2005. 39p.

(ALBERTS et al., 2004). Tumores pouco diferenciados ou indiferenciados têm um aspecto primitivo de células indiferenciadas. Em geral, os tumores benignos são bem diferenciados. O câncer bem diferenciado evolui da diferenciação ou especialização de células indiferenciadas à medida que elas proliferam (COTRAN et al., 2000). Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e tipos celulares dos quais eles derivam. Os cânceres derivados de células epiteliais, como a pele ou revestimento epitelial de órgãos e glândulas internas, são denominados *carcinomas*, aqueles derivados de tecido mesenquimatoso, como osso, gordura e cartilagem, são denominados de *sarcomas* e os *linfomas* são de natureza linfóide (WEINBERG, 1996; COTRAN et al., 2000; GOLDSBY, 2000). Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas grandes categorias incluem as várias *leucemias,* como exemplos temos: eosinofílica, de mastócitos e a mielóide dentre outras, que são neoplasias malignas derivadas de células hemocitopoiéticas de origem medular que se mantêm em suspensão, e os cânceres derivados do sistema nervoso (BOGLIOLO et al., 1987; ALBERTS et al., 2004).

Estudos experimentais têm mostrado que a cicloxigenase-2 (Cox2) está relacionada ao desenvolvimento e progressão de tumores (GASPARINI et al., 2003). A Cox2 é uma enzima induzida e expressada por células como macrófagos, sinoviócitos, fibroblastos, osteoblastos, células tumorais e células endoteliais "ativadas" (KOKI et al., 2002; ARAKI et al., 2003). Está envolvida na inflamação e em outras condições patológicas como artrite, doença de Alzheimer's, isquemia e câncer (MOHAMMED et al., 2004). Trabalhos recentes sugerem que o papel da Cox2 nas neoplasias inclui a hiperproliferação, transformação celular, crescimento tumoral, invasão e metástases (GASPARINI et al., 2003).

O objetivo final do estudo do câncer em modelos animais é a busca de maior entendimento dos fatores responsáveis pela doença no homem e a expectativa de que estes possam ser identificados, eliminados ou controlados. Dados referentes a ocorrência de tumores espontâneos se originam principalmente das pesquisas veterinárias de tumores em animais domésticos e também animais criados em zoológicos e laboratórios. O estudo dos tumores mais freqüentes em animais, pode fornecer dados epidemiológicos e indicações para melhor compreensão de sua etiologia, bem como material para investigação biológica e terapêutica (MARCHANT, 1987; CASSALI, 2000).

O presente trabalho utilizou seções de tecidos provenientes de diversos tipos de osteossarcoma canino, em animais de diferentes raças. A partir deste material, foi feito

um estudo retrospectivo dos casos, fazendo-se uma classificação e posterior avaliação da intensidade expressa da Cox2, usando-se para isto, uma análise imunoistoquímica.

Muitos trabalhos recentes têm se preocupado com esta importante via da resposta inflamatória no que se refere a sua presença e intensidade em diversos tipos de cânceres, porém, pouco se tem publicado com relação a expressão da Cox2 encontrada no osteossarcoma canino. O intuito desta pesquisa é de procurar oferecer mais uma ferramenta para o melhor entendimento desta e de outras neoplasias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar e correlacionar a intensidade da expressão da cicloxigenase 2 (Cox2), das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e o número de figuras de mitose nos diferentes tipos de osteossarcoma canino, podendo relacioná-los com a agressividade tumoral.

2.2. Objetivo específico

- Fazer um levantamento retrospectivo dos casos de osteossarcoma canino no Departamento de Veterinária – UFV e da Escola de Veterinária – UFMG para:
- Contagem de figuras mitóticas,
- Contagem das AgNORs, usando o método de impregnação pela prata e,
- Avaliação da expressão da Cox2 usando método imunoistoquímico,

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Câncer

Os primeiros indícios de tratamento em pacientes com câncer, vem do papiro datado de 1600 aC do egiptologista Edwin Smith acreditando-se, porém, acredita-se que ele tenha se baseado em documentos ainda mais antigos datados por volta de 3000 aC. O papiro documenta um procedimento cirúrgico no qual, estabeleceu-se como sendo o método primário de tratar tumores sólidos e tomando as devidas proporções, este procedimento permanece até os dias de hoje (ADAM et al., 2003).

O câncer é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de *karcinos* = crustáceo, caranguejo) (BRASILEIRO, 1998) e neoplasia significa "novo crescimento", do grego *neos*: novo, e *plasma*: algo formado (HARNDEN & MCGEE, 1992; OLIVEIRA, 2005) e o que cresceu recentemente é um neoplasma (COTRAN et al., 2000). O termo câncer foi usado pela primeira vez por Galeno (aproximadamente 138 - 201 dC.) para indicar um tumor maligno de mama no qual as veias superficiais desse órgão eram túrgidas e ramificadas, lembrando as patas de um caranguejo. O termo generalizou-se e hoje é usado para indicar qualquer neoplasia maligna.

Cancerologia ou oncologia é a parte da medicina que estuda os tumores. Cancerígeno ou oncogênico é o estímulo ou agente causador de câncer. Os tumores são classificados segundo critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com os critérios: 1) pelo comportamento clínico (benigno ou maligno); 2) pelo aspecto microscópico (critério histomorfológico); 3) pela origem da neoplasia (critério histogenético), porém, nem sempre esses elementos são usados na denominação da lesão, sendo comuns alguns epônimos, como tumor de Wilms, linfoma de Hodgkin, tumor de Burkitt etc.

Assim sendo, o critério mais utilizado é o histomorfológico, no qual a neoplasia é identificada pelo tecido ou célula que está proliferando. Nesse sentido, algumas regras são importantes: 1) o sufixo "oma" é empregado na denominação de qualquer neoplasia, benigna ou maligna; 2) a palavra "carcinoma" indica tumor maligno que reproduz epitélio de revestimento; 3) o termo "sarcoma" se refere a uma neoplasia maligna mesenquimal; 4) a palavra "blastoma" pode ser usada como sinônimo de neoplasia e, quando empregada como sufixo, indica que o tumor reproduz estruturas com características embrionárias (nefroblastoma, neuroblastoma etc) (BRASILEIRO, 1998).

Os cânceres derivam da proliferação descontrolada e propagação de clones de células transformadas (ABBAS et al., 2003), cuja proliferação é devido à alta expressão de fatores de crescimento, começando a partir do momento em que os receptores da membrana celular reconhecem seus próprios fatores de crescimento (ADAM et al., 2003). Se esta proliferação estiver fora de controle, ela dará início a um tumor, ou neoplasia, que é uma massa compacta de células anormais continuamente em crescimento (ALBERTS et al., 2004). Esta massa é predadora do hospedeiro no sentido de que o crescimento do tecido neoplásico compete com as células e tecidos normais quanto ao fornecimento de energia e substrato nutricional (COTRAN et al., 2000). O crescimento de células tumorais malignas é determinado em grande parte pela capacidade proliferativa dessas células invadirem os tecidos do hospedeiro e formarem metástase em sítios distantes (ABBAS et al., 2003).

Não é mais nenhum grande mistério como o câncer se desenvolve (WEINBERG, 1996). Ele é uma doença genética, e danos no genoma celular são características comuns em praticamente todas as neoplasias (CULLEN et al., 2002). Elas surgem de uma grande variedade de tecidos e de diversos fatores ambientais que podem influenciar o seu surgimento, como agentes físicos (raios ultravioleta, radiação ionizante), químicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos principalmente os derivados do tabaco e da queima de combustíveis fosseis, nitrosaminas, aflatoxinas, dentre outras) e biológicos (vírus) (COTRAN et al., 2000; CULLEN et al., 2002); e também as influências culturais (alimentação, estresse, tabagismo), raciais (possivelmente genéticos), e principalmente fatores como idade e hereditariedade que podem culminar em sucessivas mutações, contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (COTRAN et al., 2000). Acredita-se que os danos genéticos produzidos pelos carcinógenos ocorrem ao acaso, e muitas mutações podem não ter nenhuma conseqüência ou dano. O câncer pode desenvolver, no entanto, a partir de mutações não letais que ocorrem em pequenos subconjuntos do genoma, talvez em algumas centenas

dos 10 mil genes que se acredita fazer parte do genoma dos mamíferos (CULLEN et al., 2002). Desta forma, ele é causado em quase todos os casos, senão em todos, por mutação ou por ativação anômala dos genes celulares que controlam o crescimento e as mitoses. Os genes anormais são chamados oncogenes. Cerca de 100 diferentes oncogenes já foram identificados (GUYTON, 1997a) e a expectativa é que este número venha a aumentar com as análises contínuas das neoplasias.

Esses subconjuntos de genes críticos podem subdividir adiante em duas subclasses, os oncogenes já citados e os genes supressores de tumores, baseados nas suas funções e atributos (CULLEN et al., 2002). A causa básica do desenvolvimento neoplásico está relacionada também ao funcionamento inadequado destes genes reguladores da proliferação das células transformadas (COTRAN et al., 2000). Os principais alvos da alteração genética são os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes que controlam a morte celular programada ou apoptose (SILVA, 2004).

Em condições normais o crescimento celular é controlado por duas classes de genes, uma que codifica proteínas indutoras da transmissão de sinais positivos para proliferação (proto-oncogenes), e outra que participa do controle negativo da proliferação (genes supressores) (COTRAN et al., 2000). Proto-oncogenes são convertidos em oncogenes de duas formas principalmente: alteração da expressão gênica ou alteração da estrutura do gene (CULLEN et al., 2002). Após alterações mutacionais, os proto-oncogenes se tornam ativados atuando como oncogenes, proporcionando estímulos para o crescimento celular desordenado ao passo que a inativação dos genes supressores desempenha papel chave na progressão da maioria dos cânceres humanos (COTRAN et al., 2000).

Os genes supressores de tumor estão envolvidos no controle de pontos estratégicos da cadeia de eventos que controla o crescimento e a diferenciação celular, evitando multiplicação desordenada (BRASILEIRO FILHO, 1998). Dentre os genes supressores tumorais, estão aqueles que regulam a transcrição nuclear e o ciclo celular (*Rb, p53, BRCA-1, BRCA-2*), os genes que regulam a transdução de sinais (NF-1, APC) e os receptores de superfície celular (receptor do TGF-β e caderinas) (DENG & BRODIE, 2001). A proteína pRb, produto do gene Rb, é uma fosfoproteína nuclear expressa em todos os tipos celulares, que em sua forma ativa, inibe a progressão das células da fase G1 para a fase S do ciclo celular (LOURO, 2000). O gene p53, denominado guardião do genoma, produz uma proteína que controla a replicação do DNA, o ciclo e a proliferação celular, a manutenção da estabilidade genética e a

apoptose (ALBERTS et al., 2004). Nas células com DNA alterado, a proteína p53 acumula-se no núcleo e liga-se ao DNA evitando sua replicação. Esta pausa no crescimento celular na fase G1 permite a célula reparar o seu genoma (COTRAN et al., 2000). As mutações somáticas no gene p53 são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos, tornando este gene de câncer o mais comumente alterado (JORD et al., 2000). Embora tenha um papel preciso no processo de carcinogenese, o p53 ainda permanece em grande parte com suas funções não muito bem conhecidas (SAGARTZ, 1996). Os genes BRCA-1 e BRCA-2 são supressores tumorais, cuja função não está totalmente elucidada, porém, acredita-se que estejam envolvidos no controle da transcrição (COTRAN et al., 2000).

A morte celular programada é um fator importante para a carcinogenese. Todavia, o grande estimulador da apoptose é a mitocôndria, que libera o mais potente catalisador de morte celular, o citocromo-c. A família *Bcl-2* contém elementos pró-apoptóticos (*Bax, Bak, Bid, Bim*) e anti apoptóticos (*Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W*), os quais, de maneira geral, regulam a liberação de citocromo-c pelas mitocôndrias. O p53 é capaz de iniciar a apoptose através da indução da expressão do membro pró-apoptótico *Bax*, da família *Bcl-2* (COTRAN et al., 2000; SILVA, 2004). Por sua vez, o *Bax* induz a liberação de citocromo-c pelas mitocôndrias. Abaixo das mitocôndrias, atuam as enzimas caspases, responsáveis finais pela destruição celular. Inicialmente, as caspases 8 e 9 - ativadas respectivamente pelo receptor de membrana *Fas*, e pelo citocromo-c - desencadeiam um efeito dominó, que leva à ativação de dezenas de outras caspases, que destroem por completo a estrutura celular.

Existe um último mecanismo de proteção contra a imortalidade celular, inicialmente descrito por Hayflick - em cuja homenagem se cunhou o termo "limite de Hayflick". Ele refere-se ao número de divisões celulares que limita o crescimento de uma população de células em cultura. A observação inicial refere-se ao fato de que células em cultura, após algum tempo de repetidas divisões, entram num estágio denominado "crise", no qual a morte celular ocorre de forma maciça, com desorganização da cromatina e fusão das porções terminais dos cromossomos. Porém, é comum observar-se que, aleatoriamente, uma das células da cultura adquire a habilidade de continuar se dividindo, superando a "crise" e tornando-se imortal. É interessante notar que a maioria das células tumorais propagadas em cultura, mostram-se imortais, sem jamais entrar em "crise", o que sugere ser a imortalização celular um fenômeno necessário para o estabelecimento do processo oncológico (LOURO, 2000).

Admite-se que os tumores malignos são capazes de evadir ou superar os mecanismos de defesa do hospedeiro de formas diferentes, incluindo a seleção das células que não expressem antígenos tumorais, produção de substâncias imunossupressoras e indução de tolerância aos antígenos tumorais (ABBAS et al., 2003).

Metástases só se formam em tumores malignos; contudo, nem todo câncer origina metástases. Por definição, neoplasias benignas não originam metástases (BRASILEIRO, 1998). Esse fenômeno talvez seja o mais complexo e o menos compreendido de todos. Alguns resultados experimentais indicam que as moléculas de adesão intercelular, assim como as proteases intersticiais são os principais componentes deste complicado processo (LOURO, 2000). Todavia, as moléculas de adesão celular são de fundamental importância em diversos processos fisiológicos celulares como: proliferação, migração, diferenciação e morte. Qualquer mudança nestas moléculas pode resultar como conseqüência na indução de apoptose ou contribuir para as metástases do câncer (THIERY, 2003).

Segundo descrito por Janik et al. (1981), a presença do tumor primário é capaz de inibir o crescimento do tumor secundário. Isto se dá em decorrência da produção de diversos fatores antiangiogênicos sintetizados pela massa do tumor primário. Como conseqüência, a remoção do tumor primário resulta frequentemente num rápido crescimento das metastases (BELO et al., 2004).

O estudo imunoistoquímico da expressão de constituintes protéicos em tecidos normais ou neoplásicos é caracterizado pela utilização de anticorpos que reagem com as estruturas desejadas. Cassali (2000) ressalta a importância do estudo da expressão de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama em mulheres através de imunoistoquímica, com o intuito de auxiliar no diagnóstico e na pesquisa, definindo muitas vezes a conduta terapêutica. A imunoistoquímica é comumente utilizada para auxiliar no diagnóstico em neoplasias malignas indiferenciadas e para detectar o sítio primário em neoplasias metastáticas (CASSALI, 2000; AMSTALDEN, 2003; OLIVEIRA, 2005).

3.2. Osteossarcoma canino (OSA)

O osteossarcoma (OSA) ou sarcoma osteogênico é a neoplasia óssea primária mais freqüentemente diagnosticada em cães (STRAW et al., 1990; HAMMER et al.,

1995; WOLFESBERGER et al., 2006), e representa um excelente modelo *in vivo* para o OSA humano (KIRPENSTEIJN et al., 2002a; MULLINS et al., 2004) é caracterizado pela proliferação de células mesenquimais primitivas malignas, com diferenciação osteoblástica, que produzem osteóide ou osso imaturo, não sendo esta matriz óssea de caráter reativo ou metaplásico (STRAW et al., 1990; STRAW et al., 2001). O osteossarcoma originado do esqueleto, especialmente o de origem central ou medular, é considerado o mais comum e o mais maligno das neoplasias esqueléticas em cães (LING et al., 1974; GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; PALMER, 1992; WITHROW, 2001; THOMPSON & POOL, 2002). É responsável por mais de 85% das neoplasias com origem no esqueleto (STRAW et al., 2001) compreendendo aproximadamente de 2% a 5% de todas as malignidades caninas (HAMMER et al., 1995), sendo caracterizado pelo comportamento altamente metastático e localmente agressivo (KIRPENSTEIJN et al., 2002a).

O OSA é divido em duas formas principais: esquelético e extra-esquelético. O esquelético é o mais frequentemente observado, tendo uma origem central no canal medular de ossos longos ocorrendo preferencialmente na região metafisária. Entretanto ele pode se originar na superfície cortical ou no periósteo (STRAW et al., 1990; PALMER, 1992). Assim sendo, dois tipos de osteossarcoma surgem do perióteo, um com o mesmo comportamento do OSA de origem central que é chamado de OSA periosteal, e o outro tipo é o OSA justacortical (paraosteal), que é encontrado em humanos com um alto grau de diferenciação estrutural, cujo crescimento é relativamente lento, apresentando um melhor prognóstico quando comparado com o osteossarcoma de origem central. Alguns destes tumores ocorrem em animais domésticos e seu comportamento, em contrapartida é semelhante ao encontrado no osteossarcoma humano (PALMER, 1992). Já o OSA extra-esquelético é encontrado em sítios como glândula mamária, fígado, baço ou intestino (STRAW et al., 1990).

3.2.1. Osteossarcomas esqueléticos

3.2.1.1. Osteossarcomas periosteais

Originam-se da superfície da diáfise com maior freqüência que na metáfise, sendo neoplasias de diferenciação intermediárias (JONES, 2000). O aspecto radiológico é de lesão relacionada à superfície externa da cortical, com triângulo de Codman sólido e focos de calcificação nodular. Histologicamente, mostra formação de nódulos de

cartilagem circundados por células fusiformes com atipias e formação de pouca matriz osteóide e osso tumoral. É, portanto, uma neoplasia com padrão predominantemente cartilaginoso, cujas metástases são raras (BRASILEIRO FILHO, 2006).

3.2.1.2. Osteossarcomas paraosteais ou justacorticais

São tumores que têm origem na superfície do osso, não envolvem a cavidade medular (JONES, 2000), e têm um padrão histológico bem diferenciado com tecido maligno ósseo ou cartilaginoso ou ainda fibroso, todos os três padrões podendo estar presentes num único tumor (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). Os OSA paraosteais não apresentam tendência para a metástase, mas há recorrência local em seguida a uma remoção incompleta (JONES, 2000). São menos comuns que os periosteais, não sendo considerados tumores por alguns autores. Acomete tanto o esqueleto axial, principalmente o crânio, quanto o apendicular (WITHROW & DOIGE, 1980), possui uma baixa velocidade de crescimento e não invade a região cortical do osso, mesmo na fase terminal da doença (JONGEWARD, 1985, WITHROW & DOIGE, 1980), isto porque as margens do tumor são envolvidas por uma cápsula conjuntiva (WITHROW & DOIGE, 1980). Machos são acometidos duas vezes mais que fêmeas, sendo que a idade principal de ocorrência é por volta dos 7 anos, podendo também acometer animais jovens (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). Radiograficamente pode ser visto uma linha radioluscente entre a região cortical do osso e o tumor (WITHROW & DOIGE, 1980).

3.2.2. Osteossarcomas extra-esqueléticos

A freqüência de osteossarcoma é mais elevada em cães que em outras espécies animais e é considerada a neoplasia óssea mais comum nesta espécie (LING et al., 1974; THOMPSON & POOL, 2002). Entretanto, os osteossarcomas de origem extra-esquelética são considerados extremamente raros, tanto em cães quanto nas demais espécies, incluindo a humana (PATNAIK, 1990; STIMSON, 2000). São tumores incomuns, que afetam mais frequentemente as vísceras de cães (JONES, 2000) e são considerados altamente malignos (PATNAIK, 1990).

O osteossarcoma extra-esquelético é uma neoplasia mesenquimal produtora de osteóide, sem envolvimento periosteal ou ósseo. Isto significa que nesses locais não há nem periosteo nem osso que justifique o aparecimento do tumor. (LARUE, 1986;

LANGEBANBACH et al., 1998). Constitui apenas 12,6% dos casos de OSA (LANGEBANBACH et al., 1998; STIMSON et al., 2000). Geralmente acomete cães idosos, não apresenta predisposição sexual e se pode dizer que os cães das raças Beagle e Rottweiler são os mais afetados (KIRPENSTEIJN et al., 2002a).

Nos cães, possui predileção pela glândula mamária (CASSALI, 2000) (principalmente as abdominais caudais e as inguinais) (LANGEBANBACH et al., 1998), trato gastrintestinal, tecidos subcutâneos e fígado (PATNAIK, 1990; LANGEBANBACH et al., 1998; THOMSEN & MYERS, 1999; STIMSON et al., 2000; KLEINER & SILVA, 2003), mas há relatos em glândulas salivares e tireóide (LANGEBANBACH et al., 1998; THOMSEN & MYERS, 1999; STIMSON et al., 2000; KLEINER & SILVA, 2003), adrenais (PATNAIK, 1990), pulmão (GARZOTTO et al., 2000; KLEINER & SILVA, 2003), rim, bexiga, olhos, mesentério (PATNAIK, 1990; LANGEBANBACH et al., 1998; STIMSON et al., 2000; KLEINER & SILVA, 2003), ligamento gástrico, íleo, baço, testículo e vagina (PATNAIK, 1990), meninges (RINGENBERG et al., 2000), sacos anais (BARDET et al., 1983), e em menor proporção em tecidos moles das extremidades (PATNAIK, 1990).

A mineralização de tecidos moles adjacentes à articulação sem evidência de lise óssea periarticular, pode indicar a presença de um OSA sinovial, embora de raríssima freqüência, com apenas um relato em cão (THAMM et al., 2000). Sua patogênese pode ser uma metaplasia de tecido conjuntivo secundária a uma irritação ou trauma, uma produção proveniente de células mioepiteliais em tecido glandular (LANGEBANBACH et al., 1998) ou ainda uma infecção por *Spirocerca lupi* em cães com OSA esofágico (BARDET et al., 1983; JONES, 2000). A ossificação de tecidos moles pode ocorrer em resposta à irritação crônica ou também através da metaplasia do tecido conjuntivo (BARDET et al., 1983; FOX et al., 1994). Para o diagnóstico definitivo de um OSA extra-esquelético, em qualquer espécie, primeiramente deve ser realizada uma busca exaustiva por evidências de neoplasias ósseas primárias (KLEINER & SILVA, 2003).

3.2.3. Incidência e fatores de risco associados

Em relação à distribuição anatômica em cães, o esqueleto apendicular é acometido 2,3 vezes mais que o esqueleto axial, sendo que os membros torácicos acometidos 1,8 vezes mais que os membros pélvicos (JONGEWARD, 1985). Mais de 60% dos casos descritos de OSA espontâneos afetam a metáfise, tais como: distal do

rádio, proximal do úmero, distal do fêmur e distal da tíbia, respectivamente (JONGEWARD, 1985).

O aumento do peso é um fator de risco de grande importância que está associado ao aumento da incidência do tumor (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; RU et al., 1998; THOMPSON & POOL, 2002). Foi constatado que a ocorrência de OSA está mais relacionada ao porte do animal do que a raça, e os cães com peso acima de 36,5kg possuem 61 a 185 vezes mais risco de desenvolver tumores esqueléticos quando comparados a cães que pesam menos de 9kg (JONGEWARD, 1985), tais variáveis, peso e porte do animal possuem um efeito mais proeminente no risco de OSA apendicular quando comparado ao OSA axial (RU et al., 1998).

Acredita-se que a intensa atividade do cão de grande porte, enquanto filhote, resulte no aparecimento de microfraturas ósseas durante o rápido período de crescimento de seu esqueleto, o que pode vir a induzir a formação do tumor na fase adulta (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). O OSA tende a ocorrer nos ossos que sustentam maior peso corporal e adjacente às placas de fechamento tardio, devido à maior possibilidade de pequenos e múltiplos traumas nestas regiões (JONGEWARD, 1985; RU et al., 1998; STRAW et al., 2001). Este crescimento ósseo rápido tem sido reconhecido como um fator relevante para o desenvolvimento de osteossarcoma em cães (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985) A sensibilização das células nesta região pode iniciar a doença pela indução de sinais mitogênicos, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de uma linhagem mutante (STRAW et al., 2001).

O OSA já foi identificado na maioria das espécies; contudo são mais freqüentemente encontrados em cães (JONES, 2000), especialmente em raças gigantes (JONES, 2000; STRAW et al., 2001). Desta forma, São Bernardo, Dinamarquês, Setter Irlandês, Doberman, Pastor Alemão, Golden Retriever e Boxer, estão sob maior risco (STRAW et al., 2001; RU et al., 1998). Cães de pequeno porte são raramente afetados, isso porque as placas epifisárias se fecham precocemente, quando comparados com cães de grande porte (DALECK et al., 2002). Estes tumores originam-se mais freqüentemente na metáfise dos ossos longos, onde é maior a taxa de substituição do tecido ósseo; contudo, osteossarcomas podem ocorrer em qualquer local, inclusive nos sesamóides (JONES, 2000).

Em cães, esta neoplasia ocorre na faixa etária que oscila desde alguns meses, até 17 anos. A idade média é de 7,7 anos, e o risco aumenta repentinamente ao redor dos 10 anos (51% dos cães acometidos apresentam a moléstia durante este período), decrescendo subitamente após esta faixa. O OSA primário de costelas é uma exceção,

acometendo cães adultos numa idade mais jovem, entre 4,5 e 5,4 anos (STRAW et al., 2001). Os animais inteiros, aparentemente apresentam maior risco ao OSA quando comparados a animais castrados.

Há relatos de OSA associado a fraturas (STRAW et al., 2001; DALECK et al., 2002), em especial as que passaram por processos de reparação complicados, assim como fraturas cominutivas que cursam com osteomielite, além de atraso na reparação e a não-união. O OSA pode ser induzido, ainda, pela presença de implantes metálicos, por enxerto cortical ou mesmo em fraturas em que não foi utilizada nenhuma forma de fixação interna (DALECK et al., 2002, STRAW et al., 2001; JONGEWARD, 1985; KLEINER & SILVA, 2003). Os sarcomas associados às fraturas ocorrem no local da mesma e aparecem após 5 anos ou mais. São comuns nas raças de grande porte, com idade acima de 7 anos (STEVENSON, 1991). Ocasionalmente pode-se estabelecer de 6 a 9 meses após a fixação de fraturas metafisárias para a como manifestação de um OSA pré-existente (JONGEWARD, 1985).

Os pinos intramedulares são mais freqüentemente associados ao desenvolvimento do tumor que outras formas de fixação como placas, parafusos, fios de cerclagem e fixações externas (JONGEWARD, 1985). O aço inoxidável convencional e as ligas que contém cobalto podem sensibilizar pacientes, assim como promover estimulação crônica do sistema imune em pacientes previamente sensibilizados, pelo fato desses metais se unirem às proteínas e formarem imunocomplexos (STEVENSON, 1991). Alguns autores concluem que os implantes metálicos podem ser carcinogênicos pela simples presença física ou pela corrosão, causando um distúrbio na regulação do crescimento celular, visto que estes metais mostram predileção pelo DNA das células (JONGEWARD, 1985; STEVENSON, 1991).

3.2.4. Tumorogênese e comportamento biológico

A etiologia é desconhecida para mais da metade das moléstias que afetam os animais domésticos, por isso, este fato cria dificuldades nas tentativas para classificação lógica. Além disso, algumas afecções ósseas possuem múltiplas etiologias, como os distúrbios congênitos, hereditário, e metabólicos (JOHNSON et al., 1997).

Como o osteossarcoma não apresenta etiologia bem elucidada, várias associações para o desenvolvimento do tumor são reconhecidas em cães (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; RU et al., 1998; THOMPSON & POOL, 2002).

Em cães, os OSA de origem central são considerados os mais malignos do grupo dos tumores, não tendo um prognóstico muito favorável nos seus diferentes subtipos (THOMPSON & POOL, 2002). As metástases ocorrem por via hematogênica para os pulmões em mais de 75% dos casos dos tumores de origem central e geralmente ainda no início da doença (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; PALMER, 1992; THOMPSON & POOL, 2002). O OSA extra-esquelético primário apresenta comportamento biológico agressivo com elevada freqüência metastática, variando entre 60 a 85% em cães com tempo médio de vida pós-cirúrgico de 26 a 90 dias, o que varia de acordo com sua localização (THAMM et al., 2000).

Especula-se a importância viral na etiologia desta neoplasia já que pode ocorrer em ninhadas e pode ser induzido experimentalmente pela injeção de células tumorais em fetos caninos (OWEN, 1969). Porém, nenhum envolvimento ou presença retroviral foi detectada durante o exame de microscopia eletrônica em amostras de linhagens celulares, ou quando estas amostras foram analisadas pela técnica de RT-PCR, com a finalidade de detectar a presença de RNA retroviral, embora esta possibilidade de envolvimento de vírus ainda não possa ser totalmente excluída (STRAW et al., 2001; LOUKOPOULOS et al., 2004). Agentes químicos, radiação e agentes virais têm causado experimentalmente osteossarcoma em animais (PRITCHARD et al., 1975).

3.2.4.1. Fatores genético-moleculares

Araki et al. (1991) concluíram, em seu trabalho, que alterações no gene retinoblastoma (Rb) são pertinentes para o surgimento de muitos casos de osteossarcoma em humanos e alguns outros tumores ósseos e de tecido mole. Evidências genéticas adicionais sugerem que uma alteração no homozigoto de outro gene, p53, esteja ligada ao crescimento e desenvolvimento do OSA. Ambos os genes Rb e p53 têm o propósito de atuar como genes supressores de tumores (STRAW et al., 2001). Portanto, a tumorogênese do osteossarcoma pode estar envolvida numa pequena perda da função destes dois genes, e talvez de outros genes. O gene supressor p53 mutante mostrou ser altamente expressado no osteossarcoma canino, com maior freqüência nos ossos dos membros apendiculares que em ossos chatos, o que poderia explicar o fato da doença ser mais agressiva nestes locais em que esse gene é altamente expressado (SAGARTZ, 1996; STRAW et al., 2001). Em outro estudo, Mendoza et al. (1998) mostraram que o p53 mutante estava presente em 38% das amostras de osteossarcoma, indicando uma relação potencial para a causa. Sherwood-Johnson et al.

(1999) em seu trabalho, também com p53 mutante, mostraram que 44% das amostras de OSA canino apresentaram defeitos em sítios similares aos que são observados em tumores humanos (STRAW et al., 2001).

3.2.4.2. Hormônio de crescimento (GH)

O hormônio de crescimento (growth hormone - GH) foi mensurado em amostras de OSA apendicular, o que demonstrou ser uma causa potencial ou uma resposta relacionada (KIRPENSTEIJN et al., 1999; STRAW et al., 2001). Segundo Kirpensteijn et al. (2002a), a maioria dos osteossarcomas caninos não são bem diferenciados, o que pode explicar o porquê de apenas 25% dos tumores expressarem RNAm de GH. Ainda, segundo este autor, os osteossarcomas constituídos, principalmente, por células pouco diferenciadas e aqueles que freqüentemente se desenvolvem no esqueleto de cães podem ter perdido a capacidade de produzir GH localmente.

O GH pode também ter um papel importante na tumorogênese, porque a produção local de RNAm do GH pode gerar um ambiente altamente condutivo para o crescimento das células tumorais. Pesquisas *in vitro* têm demonstrado que o GH possui um efeito estimulante para o crescimento de linhagens de células de OSA humano (SCHEVEN et al., 1991), tendo um efeito, em parte, dependente do IGF-1 (Insulin growth factor-1) (SCHEVEN et al., 1991; KAPPEL et al., 1994; KIRPENSTEIJN et al., 2002a), que é uma pequena proteína de efeito potencializante para o crescimento ósseo, também denominada de somatomedina. (GUYTON, 1997b). O GH tem este mesmo efeito em células de osteossarcoma canino, já que elas são capazes de produzir seu próprio hormônio, podendo ter uma estimulação autócrina sobre o tumor, embora não sejam responsivas para os mecanismos de *feedback* normal (SCHEVEN et al., 1991; KAPPEL et al., 1994; KIRPENSTEIJN et al., 2002a)

Muitos outros fatores podem ter um papel importante nas vias de indução do OSA, como a osteogênese induzida pelas proteínas morfogenéticas ósseas (bone morphogenetic proteins - BMPs), os genes supressores de tumores, incluindo o p53, e a atividade local das vias de crescimento que podem interagir com o GH que é produzido localmente (KIRPENSTEIJN et al., 2002a).

3.2.5. Sinais clínicos

Cães com tumores ósseos apendiculares apresentam dor e claudicação no local do tumor primário (STRAW et al., 2001), sendo a dor detectada pelo exame clínico e palpação. Os sinais clínicos associados com o osteossarcoma são inespecíficos e dependem do sítio primário e do envolvimento de estruturas subjacentes. A dor é devido a microfraturas ou à interrupção do periósteo induzido pela osteólise do osso cortical e pela extensão tumoral do canal medular (LIU, 1996; STRAW et al., 2001) A dor pode causar outros problemas como irritabilidade, agressão, perda de apetite, perda de peso, gemidos, choro, insônia e relutância para se exercitar (LING et al., 1974; GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; JOHNSON et al., 1997; COUTO, 2001; THOMPSON & POOL, 2002; KLEINER & SILVA, 2003). As lesões antigas tendem a ser menos dolorosas (THOMPSON & POOL, 2002). Por ser um tumor altamente invasivo, o OSA causa após algum tempo, uma compressão tecidual significativa, impedindo a drenagem linfática normal, levando à formação de edema e sinal de Godet positivo (KLEINER & SILVA, 2003).

Este tumor ósseo é o sarcoma que mais está associado a fraturas patológicas, em especial àquelas que sofreram consolidação complicada, a exemplo das fraturas cominutivas que cursam com osteomielite (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; THOMPSON & POOL, 2002; KLEINER & SILVA, 2003). Também é comum a ocorrência de fraturas espontâneas no osso afetado durante a evolução da doença devido à osteólise (STEVENSON, 1991; STRAW et al., 2001). Com o aumento do tamanho da lesão, nota-se uma limitação do movimento da articulação adjacente (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). Outros sinais como assimetria, deformidade, atrofia muscular do membro afetado (JONGEWARD, 1985), linfonodos regionais aumentados de volume e de consistência firme (THOMPSON & POOL, 2002), dificuldade em sentar e levantar, e aumento da temperatura local, podem ser constatadas à palpação do tumor (JONGEWARD, 1985).

O reconhecimento clínico do OSA axial é mais difícil quando comparado com o OSA que afeta o esqueleto apendicular, devido principalmente a que os sinais clínicos se manifestam de acordo com o local acometido (STRAW et al., 1990; DALECK et al., 2002). Aqueles com sítio primário nas costelas, arco zigomático, maxila e mandíbula, normalmente se apresentam à palpação como um aumento de volume regional firme (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; HEYMAN et al., 1992; GINEL et al., 1996; THOMPSON & POOL, 2002). Estes sinais variam desde edema localizado, com ou

sem claudicação e disfagia, quando há comprometimento oral, exoftalmia, dor ao abrir a boca no caso de tumor orbital ou na mandíbula, deformidade facial, descargas nasais, espirros quando acomete a cavidade e seios nasais, e hiperestesia com ou sem sinais neurológicos quando afeta a medula espinhal (JONGEWARD, 1985; STRAW et al., 1990; STRAW et al., 2001; DALECK et al., 2002). A extensão do tumor para o interior da cavidade oral produz halitose, sialorréia e alterações na estabilidade e alinhamento dos dentes (JONGEWARD, 1985).

O OSA que envolve os seios nasais e paranasais freqüentemente gera sinais como descargas nasais sanguinolentas, uni ou bilaterais, espirros, deformidade, assimetrias, estridores nasais (JONGEWARD, 1985) e dispnéia (PATNAIK et al., 1984; GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; THOMPSON & POOL, 2002). Estes tumores podem invadir os palatos, a região retrobulbar e as narinas, podendo levar a obstrução (JONGEWARD, 1985).

Aproximadamente 74% dos tumores que acometem as vértebras, inicialmente promovem dor. O desenvolvimento progressivo de déficits neurológicos uni ou bilaterais ocorrerá se houver lesão da medula espinhal ou dos nervos periféricos. O súbito avanço dos sinais de mielopatia pode ser resultante de fraturas patológicas das vértebras (JONGEWARD, 1985; STRAW et al., 2001). Estes animais apresentam alteração no modo de andar, dificuldade em sentar e levantar, tremores, atrofia por desuso, incontinência urinária e fecal, letargia e anorexia (JONGEWARD, 1985).

Os tumores nas costelas acometem principalmente a região da articulação costocondral, não sendo observada freqüentemente a dor neste local. Pode ocorrer envolvimento das costelas adjacentes e da cavidade torácica. Quando a cavidade abdominal também é acometida, por extensão a partir das costelas caudais, pode ser observado um quadro de dispnéia secundária (JONGEWARD, 1985). Entretanto, a dispnéia como sinal de efusão maligna é rara (STRAW et al., 2001). Os tumores pélvicos levam à deformidade e assimetria, claudicação, dor ao se fazer o toque retal, constipação, tenesmo, fezes de formato anormal, e diâmetro reduzido do reto devido ao estreitamento do canal pélvico (JONGEWARD, 1985).

O período de ocorrência dos sinais clínicos do osteossarcoma é variável e dependente do local de seu surgimento primário. Os tumores originados de ossos chatos, como os da cabeça, apresentam curso clínico e tempo de sobrevida maior quando comparados àqueles originados do esqueleto apendicular, que por sua vez podem ter um curso rápido, causando a morte em um curto período de tempo, variando de um a seis meses (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). No osteossarcoma extra-

esquelético, os sinais clínicos variam de acordo com o órgão ou tecido afetado, podendo inicialmente surgir como uma massa sólida e firme (PATNICK; 1990).

3.2.6. Diagnóstico

O diagnóstico do osteossarcoma canino é dado a partir da história clínica do animal, exame físico completo, exames de sangue, radiografias do sítio primário e dos pulmões (LING et al., 1974; WITHROW, 2001) e pelos achados radiográficos e cintilográficos (DALECK et al., 2002). O diagnóstico diferencial inclui outras neoplasias primárias dos ossos (malignas e benignas), neoplasias ósseas secundárias, osteomielite bacteriana e micótica, avulsões e fraturas, deslocamentos, doenças metabólicas ósseas, injúrias ocorridas em ligamentos e tendões, miopatias, injúrias aos tecidos moles, corpo estranho, periostite, artrites e doenças secundárias da articulação, osteoartropatia hipertrófica pulmonar, panosteíte eosinofílica, osteopatia metafiseal e infecções (LING et al., 1974).

Outros exames complementares indicados são: ultrassonografia, tomografia computadorizada do tumor primário e dos pulmões (STRAW et al., 2001). A confirmação é feita por biópsia e exame histopatológico (DALECK et al., 2002).

3.2.7. Tratamento

A amputação tem sido a viga-mestra do tratamento para os tumores ósseos primários há muitos anos. Sua principal vantagem é que o procedimento confiavelmente proporciona a ressecção completa do tumor primário. Outro fator importante que justifica a amputação radical do membro é o alívio da dor (BERG & STRAW, 1996). É o tratamento tradicional para cães com OSA apendicular, porém, apesar do alívio do desconforto local, raramente resulta em cura (DALECK et al., 2002). A cirurgia deve ser considerada tratamento paliativo, quando realizada isoladamente (WATERS, 1998).

Em sua maioria, os cães toleram a amputação de modo satisfatório, apresentando pouco ou nenhum decréscimo na atividade em geral seguida à cirurgia (BERG & STRAW, 1996). Apesar da boa adaptação do animal após amputação, a preservação do membro é a melhor opção em casos como doença ortopédica e neurológica severas, raças gigantes, animais obesos e em animais cujos proprietários são resistentes à amputação. Na maioria dos casos, a função do membro é considerada excelente, porém

não foram observadas diferenças significantes no tempo de sobrevida quando comparada à amputação (BERG & STRAW, 1996; STRAW et al., 2001).

Os agentes quimioterápicos são utilizados para indução da remissão do tumor e como terapia de manutenção (FONSECA et al., 2002). A resposta individual de cães à quimioterapia é imprevisível, podendo resultar em insucesso em responder à droga citotóxica.

A carboplatina (cis-diamino-1,1-ciclobutano decarboxilato-platina) é um derivado platinado de segunda geração. Foi desenvolvido na medicina humana para atenuar os efeitos colaterais da cisplatina com eficácia equivalente. Em medicina veterinária, existem inúmeras diferenças entre estes dois produtos.

No cão, a carboplatina tem menor potencial emético que a cisplatina, podendo ser dispensado o uso de anti-eméticos em alguns casos, embora haja relatos de que ela pode promover vômito no cão. É indicada no tratamento de OSA apendiculares, sendo tão eficaz quanto à cisplatina. (LARONE & DELPRAT, 2004).

A imunoterapia no tratamento da neoplasia envolve a estimulação ou moderação do sistema imune do paciente, com relação à lesão ou destruição das células neoplásicas (WATERS, 1998).

3.2.8. Prognóstico

O prognóstico para cães com OSA é reservado. Embora menos de 5% dos cães tenham metástases pulmonares, radiograficamente evidentes por ocasião da apresentação, e como a amputação é o único tratamento, 90% morrem ou sofrem eutanásia em decorrência da moléstia metastática dentro de um ano.

Para o OSA canino, o prognóstico varia de acordo com a idade do paciente, sendo desfavorável para animais acima dos 10 anos e para os jovens com menos de 7 anos, de acordo com o local do tumor primário, com a porcentagem de necrose tumoral após a quimioterapia adjuvante, com o crescimento tumoral nos vasos e com a atividade da enzima fosfatase alcalina plasmática (HAMMER et al., 1995).

O sistema de classificação mais amplamente aceito e considerado indicador do prognóstico é a designação TNM (Tumor Node Metastasis - presença de metástase do tumor nos linfonodos regionais) (WATERS, 1998; KIRPENSTEIJN et al., 2002a), que é uma nova graduação histológica do OSA canino, e que vem sendo utilizada como um ótimo indicador de prognóstico, proporcionando uma avaliação biológica qualitativa da agressividade do tumor. Nesta nova escala, a quantidade e o tipo de matriz produzida

pelo tumor não são de grande importância. As variáveis histológicas de maior importância associadas à agressividade são o índice de mitoses e a invasão dos vasos sangüíneos pelas células tumorais (KIRPENSTEIJN et al., 2002a).

3.2.9. Classificação dos osteossarcomas

A classificação dos ostessarcomas é dada segundo o padrão radiológico e as características histológicas.

3.2.9.1. Características radiológicas

O exame radiográfico é o método auxiliar de diagnóstico que fornece informações acuradas sobre injúrias e doenças osteoarticulares (MORGAN & LEIGHTON, 1995). Entretanto, é importante lembrar que somente componentes ósseos mineralizados são visualizados ao exame radiográfico (WRIGLEY, 2000). A radiografia promove uma valiosa informação adicional sobre a extensão, natureza, e comportamento de um tumor ósseo; elas podem ser de valor considerável ao cirurgião ou ao patologista, estabelecendo uma lista de diagnóstico diferencial provável nos locais selecionados para o exame citológico ou histológico (THOMPSON & POOL, 2002).

Os sarcomas ósseos primários em cães podem ser reconhecidos como malignos a partir do exame radiográfico e clínico, mas o diagnóstico final para os achados histológicos ou citológicos de osteossarcoma, condrossarcoma e fibrossarcoma no osso não produzem um padrão radiográfico patognomônico (THOMPSON & POOL, 2002). Desta forma, radiologicamente os osteossarcomas são subdivididos em:

3.2.9.1.1. Osteoblástico

É conhecido também como OSA esclerótico, e se caracteriza pela produção de matriz óssea. Nesta classificação se encontram exclusivamente os osteossarcomas osteoblásticos do tipo produtivo, com padrão radiográfico produtivo (PALMER, 1992; THOMPSON & POOL, 2002).

3.2.9.1.2. Osteolítico

Para os tumores ósseos que produzem indistintamente o padrão radiográfico osteolítico em que se observa a destruição da matriz óssea, geralmente se incluem os osteossarcomas pobremente diferenciados, a maioria dos osteossarcomas teleangectásicos e do tipo células gigantes, cerca de 50% dos osteossarcomas fibroblásticos e em menor número os osteossarcomas condroblásticos e alguns tipos de osteossarcomas combinados (PALMER, 1992; THOMPSON & POOL, 2002).

3.2.9.1.3. Misto

Os tumores ósseos malignos podem produzir padrões radiográficos mistos (THOMPSON & POOL, 2002). Neste padrão, ocorre lise e produção óssea concomitante, observado na maioria dos osteossarcomas osteoblásticos moderadamente produtivos, osteossarcomas condroblásticos e osteossarcomas do tipo combinados e em cerca de 50% dos osteossarcomas fibroblásticos (THOMPSON & POOL, 2002).

Segundo PATNAIK (1990), nos osteossarcomas extra-esqueléticos podem ser visualizadas radiologicamente em algumas áreas ou em todo o órgão ou num tecido acometido uma certa radio-densidade devido à ossificação e mineralização produzidas pelo tumor.

3.2.9.2. Características histológicas

Varias classificações têm sido usadas para os osteossarcomas, ambas validas para o homem e os animais. O método usado neste trabalho é baseado no produto resultante das células malignas da matriz e está de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde - Classificação Histológica de Tumores Ósseos e das Articulações dos Animais Domésticos (THOMPSON & POOL, 2002).

O osteossarcoma possui uma ampla variedade de características microscópicas, desta forma, o seu diagnóstico definitivo é dado apenas com a presença da produção de osteóide ou ainda de osso neoformado pelas células mesenquimais malignas (PALMER, 1992; KIRPENSTEIJN et al., 2002(b); THOMPSON & POOL, 2002). As características histológicas baseiam-se no tipo celular e na atividade das células tumorais, podendo ser dividido em seis categorias quando for determinado por um padrão predominante: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, teleangectásico,

pobremente diferenciado e do tipo células gigantes (PALMER, 1992; DOIGE & WEISBRODE, 1998; THOMPSON & POOL, 2002). Quando não há um padrão dominante, o tumor deve ser classificado como osteossarcoma do tipo combinado (THOMPSON & POOL, 2002).

Em virtude da natureza multipotencial das células mesenquimais primitivas, a matriz neoplásica pode conter variável quantidade de cartilagem, colágeno, e osteóide, porém, mesmo em tumores cujo predomínio de cartilagem seja encontrado, a presença de osteóide caracteriza um diagnóstico de osteossarcoma (THOMPSON & POOL 2002). Assim sendo, quando se observa um padrão predominante, os tipos de osteossarcomas podem ser diferenciados segundo as características histológicas encontradas, nas quais são descritas a seguir..

3.2.9.2.1. Osteossarcoma osteoblástico

É formado por osteoblastos anaplásicos, cujas células apresentam bordas angulares com núcleo hipercromático posicionado excentricamente no citoplasma escurecido (THOMPSON & POOL, 2002). Há uma quantidade variável de osteóide neoplásico e osso. As células tumorais se assemelham a osteoblastos, com um grau variável de pleomorfismo celular, podendo ainda ser encontradas células gigantes multinucleadas espalhadas por todo o tumor (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). São ainda sub-categorizados em OSA osteoblástico não produtivo, OSA osteoblástico moderadamente produtivo e OSA osteoblástico produtivo (THOMPSON & POOL, 2002).

3.2.9.2.2. Osteossarcoma condroblástico

As células mesênquimais malignas deste tumor produzem matrizes celulares condróide e osteóide (THOMPSON & POOL, 2002), sendo uma produção combinada de cartilagem tumoral na presença de osteóide tumoral e osso neoformado (PALMER; 1992), em que há predomínio do componente cartilaginoso. Esse tipo de tumor pode ser confundido com um condrossarcoma (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; THOMPSON & POOL, 2002),

3.2.9.2.3. Osteossarcoma fibroblástico

Este subtipo normalmente apresenta lesões ósseas líticas e cerca de 50% deste subtipo progridem para uma forma mista, enquanto que as células fusiformes neoplásicas do tumor aumentam sua capacidade de formar matriz óssea mineralizada (THOMPSON & POOL, 2002). As células neoplásicas fusiformes produzem abundante estroma conjuntivo, com quantidade variável de osteóide neoplásico e osso neoformado (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985). A diferenciação deste tumor para um fibrossarcoma está na formação inequívoca de matriz óssea, as vezes difícil de ser encontrada (THOMPSON & POOL, 2002).

3.2.9.2.4. Osteossarcoma do tipo células gigantes

Neste subtipo de osteossarcoma há escassa produção de matriz óssea e predomínio de grandes áreas contendo inúmeras células gigantes multinucleadas tumorais (PALMER, 1992; THOMPSON & POOL, 2002). Este tumor é diferente do tumor ósseo maligno de células gigantes (THOMPSON & POOL, 2002). Se forem feitas várias coletas do material a ser examinado, as chances de se confundir este tumor com o tumor ósseo de células gigantes tornam-se remotas, pois nesse tumor a presença de osteóide é bem característica, condição *sene qua non* para o osteossarcoma, já no outro tumor, esta presença é esparsa e bem reduzida (PALMER, 1992).

3.2.9.2.5. Osteossarcoma teleangectásico

Este subtipo é caracteristicamente muito agressivo, com padrão radiográfico osteolítico e lesões sanguíneas císticas. Pode ser confundido com uma metástase de um hemangiossarcoma. Microscopicamente, o osteossarcoma teleangectásico pode ser diferenciado do hemangiossarcoma pela presença ocasional de espículas entre os osteóides pleomórficos e as células mesênquimais malignas, embora uma procura cuidadosa seja freqüentemente exigida para descobrir estes osteóides (THOMPSON & POOL, 2002). Presença ocasional de espículas de osteóide neoplásico, sendo que em algumas áreas há espaços preenchidos com sangue circundados por células neoplásicas e não por células endoteliais (MAHAFFEY & GREENE, 1985; PALMER, 1992; DOIGE & WEISBRODE, 1998; THOMPSON & POOL, 2002). Tanto em pacientes

humanos quanto em cães, este subtipo está associado com prognóstico pouco favorável em comparação às demais formas de osteossarcoma (THOMPSON & POOL, 2002).

3.2.9.2.6. Osteossarcoma pobremente diferenciado

Neste tumor ósseo primário há produção de pequena quantidade de osteóide maligno e algumas espículas de osso neoformado. As células mesenquimais malignas podem variar de pequena a grande na aparência, semelhantes às células reticulares da medula óssea, podendo haver presença de células pleomóficas sarcomatosas indiferenciadas. Muitos destes tumores ósseos são altamente agressivos e promovem lesões ósseas líticas (THOMPSON & POOL, 2002).

Há ainda o osteossarcoma do tipo combinado (misto), onde não há um padrão predominante, ou seja, dois ou mais subtipos se organizam para dar origem a um único tumor (THOMPSON & POOL, 2002). Em todas as subclassificações de osteossarcoma, muitas das células gigantes nos tumores são osteoclastos normais (PALMER, 1992). Metaplasia óssea de células mesenquimais multipotentes em tumores de origem não óssea pode criar confusão (THOMPSON & POOL, 2002).

3.3. Avaliação da proliferação celular

As neoplasias apresentam taxas de multiplicação celular elevada, com alto índice mitótico, e crescimento é usualmente rápido. O mesmo não acontece com o estroma e os vasos sangüíneos, que se desenvolvem mais lentamente, resultando muitas vezes em degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações (BRASILEIRO FILHO, 1998). Elas apresentam distúrbios no controle do ciclo celular, independente de suas causas primárias, o que por sua vez em muitas ocasiões, proporcionam o aumento da proliferação celular, perda da diferenciação e a formação de massas tumorais (BACCHI & GOWN, 1993; RABENHORST et a., 1993; RABENHORST et al., 1994).

A capacidade proliferativa tem sido considerada como um bom parâmetro de identificação de neoplasias, cuja detecção e quantificação estão associadas ao seu grau de malignidade, constituindo um importante prognóstico de diferentes tumores (BACCHI & GOWN, 1993; RABENHORST et a,. 1993; RABENHORST et al., 1994). Desta forma, as mitoses em grande número podem indicar atividade proliferativa tumoral (MITCHELL, 2006).

A contagem de figuras mitóticas só é possível na fase do ciclo celular que corresponde à mitose propriamente dita. Células em interfase não são consideradas neste tipo de análise, mesmo esta fase correspondendo ao período relativamente mais longo do ciclo celular. Portanto, a contagem de figuras mitóticas é o método tradicional para obtenção do índice de proliferação celular e pode ser apresentada em porcentagens, definindo o índice mitótico (QUINN & WRIGHT, 1990; RABENHORST et al,. 1993; RUBIN & FARBER, 2002).

Este método não deve ser utilizado como único parâmetro da proliferação celular do tumor, devendo ser associado a um contexto de outros achados clínicos e patológicos, com isso, deve-se lembrar também que a mitose representa um período curto no ciclo celular, o que leva a uma subestimação da população celular em proliferação. (QUINN & WRIGHT, 1990; RABENHORST et al,. 1993; RUBIN & FARBER, 2002).

3.4. Marcadores histoquímicos para proliferação celular (AgNOR)

O termo "regiões organizadoras nucleolares" ou NORs (do inglês "*nucleolar organizer regions*") é utilizado para descrever regiões constituídas por fragmentos de cromossomos em torno das quais se formam os nucléolos ao final da mitose. Estas regiões correspondem a segmentos de DNA contendo genes responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico (rRNA) de 18S e 28S, situados no núcleo da célula. Estes segmentos de rRNA estão associados à proteínas com grande afinidade argirofílica, cujas estruturas coradas pela prata são chamadas de proteínas AgNORs (PLOTON, 1994; UNDERWOOD & GIRI, 1998; OSHIMA & FORONES, 2001).

Estruturalmente, as proteínas argirófilas (AgNORs) estão localizadas nos componentes fibrilares (centro fibrilar e componente denso fibrilar) dos nucléolos (TRERÈ et al., 1989) e podem se configurar principalmente em três tipos, apresentando-se de forma agrupada formando uma única estrutura (o próprio nucléolo), podendo ser vistas dentro do nucléolo nas células em proliferação e distribuídas por todo o núcleo, geralmente nas células altamente malignas (CROCKER et al., 1989). Sobretudo, dois tipos de AgNORs são encontrados: o tipo 1 com vários tamanhos, com margens bem definidas, em que as maiores representam o próprio nucléolo, apresentando ou não pontos negros acastanhados em seu interior, e o tipo 2 que são pequenas e únicas, sem

margens definidas, normalmente ao lado das do tipo 1 e dentro do núcleo ou agregados (SHIRO et al., 1992).

O uso do método da coloração das NOR é justificada por permitir seletivas ligações de prata a algumas proteínas ácidas da região organizadora de nucléolo ou mais precisamente a nucleolina (proteína C_{23}), nucleofosmina (proteína B_{23}) e subunidades de RNA polimerase I (VIDAL et al., 1994; UNDERWOOD & GIRI, 1988). As NORs são definidas como componentes nucleares e podem ser facilmente identificadas por pontos negros acastanhados localizados na área nuclear (TRERÈ, 2000).

A contagem do AgNOR pode variar dependendo do estágio do ciclo celular. Uma elevada contagem das NORs pode representar um aumento do numero de cromossomos ou diminuição do "*turn-over*" celular (SIMÕES et al., 1994).

A quantificação das NORs tem sido usada para caracterizar neoplasias e hiperplasias a partir da marcação de genes ribossomais e, consequentemente, ainda tem sido usada como um marcador da atividade nucleolar (KANEMATSU et al., 1997; SERAKIDES, et al., 1999). Contudo, o número de NORs também tem sido relacionado à proliferação celular, mais precisamente à replicação do DNA (VIDAL et al., 1994; UNDERWOOD & GIRI et al., 1988; DERENZINI & TRERÈ, 1994).

Os genes RNA ribossomais têm um papel importante na síntese protéica, crescimento, diferenciação e transformação maligna das células que permitem a distinção entre células neoplásicas malignas e benignas (DESTEXHE et al., 1995; HARMELIN et al., 1995), em que é frequentemente maior o número de NORs em células neoplásicas malignas em relação as benignas, ou ainda em comparação as células normais (UNDERWOOD & GIRI, 1988; TRERÈ, 1993) o que tem demonstrado grande aplicação no diagnóstico histopatológico de rotina na oncologia humana (CROCKER & NAR, 1987; SHIRO et al., 1992). Algumas neoplasias têm demonstrado um grau variável de sobreposição no número de NORs entre lesões benignas e malignas (UNDERWOOD & GIRI, 1988).

A técnica de AgNOR apresenta como vantagens, a facilidade, rapidez de execução e baixo custo, podendo ser realizada em amostras de material de rotina (DERENZINI & TRERÈ, 1994).

3.5. Cicloxigenases

As cicloxigenases são enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Das três isoformas descritas (WOLFESBERGER et al., 2006), a cicloxigenase-1 (Cox1), é constitutiva e expressada em muitos tecidos, tem papel importante em algumas funções fisiológicas como a citoproteção do estômago, a agregação plaquetária e a fluidez do sangue nos rins; a segunda isoforma é a Cox2, que é induzida e expressada por células que participam do processo inflamatório, por tecidos neoplásicos e por outras condições patológicas; e a terceira prostaglandina anti-inflamatória tem sido descrita recentemente como sendo da família ciclopentanona (15-deoxiΔ-12, 14-PGJ_2) postulada como sendo a Cox3, expressa principalmente em células do coração e córtex cerebral (GASPARINI et al., 2003). A alta expressão da Cox2 conduz a uma elevada concentração de prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E_2 (PGE_2) (MOHAMMED et al., 2004). Pai et al. (2002) mostraram uma estreita ligação entre PGE_2 e receptores de EGF (Fator de crescimento endodérmico). A PGE_2 induz a ativação de metaloproteases MMP2 e MMP9, aumentando a expressão de TGFα (Fator de crescimento transformante α), combinando com receptores de EGF, o que promove ou desencadeia sinalizadores mitogênicos (GASPARINI et al., 2003).

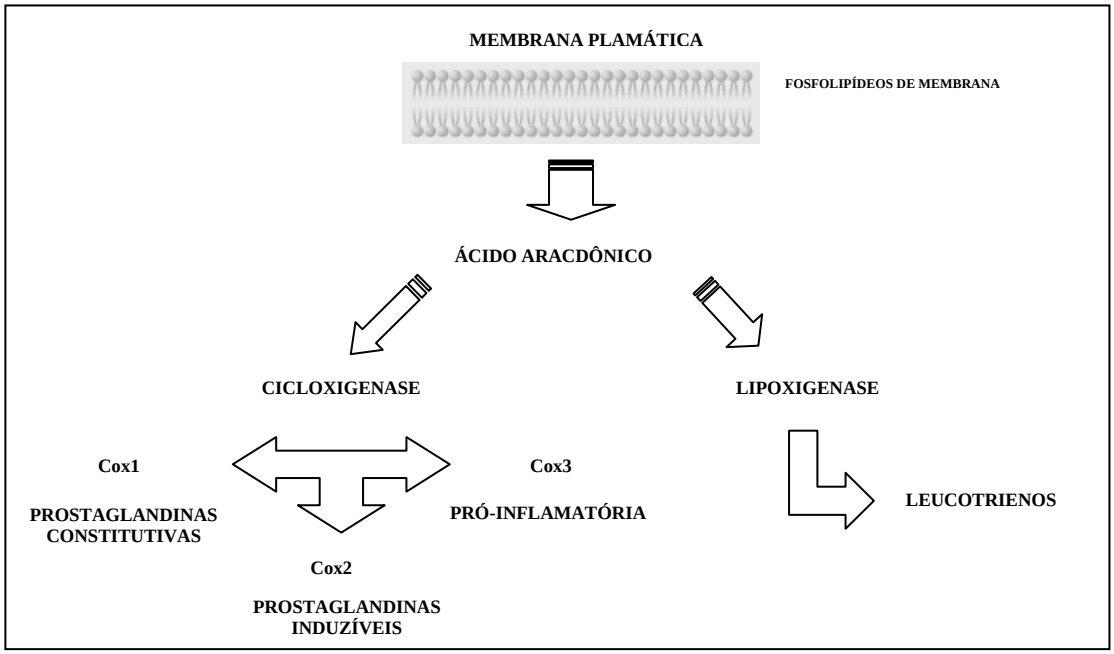


Figura 1 - Esquema adaptado a partir de Goodman & Gilman's – Pharmacological basis of therapeutics, 2001; mostrando a degradação enzimática do ácido araquidônico (Resposta inflamatória) – via das cicloxigenases e da lipoxigenase.

As prostaglandinas produzidas pela Cox2 também são importantes na ovulação e ruptura do folículo, provavelmente mediado pela geração direta ou ativação de enzimas proteolíticas. Na gestação podem ser importantes para a implantação do ovócito e na angiogênese necessária para o estabelecimento da placenta (DUBOIS et al., 1998). A Cox2 está presente fisiologicamente de forma limitada no cérebro, medula espinhal, podendo estar envolvida na transmissão nervosa, particularmente na dor e na febre (DUBOIS et al., 1998; VANE et al., 1998).

3.6. Correlação da cicloxigenase-2 com o câncer

A correlação entre inflamação e câncer existe desde 1863, quando Rudolf Virchow observou leucócitos em tecidos neoplásicos. Por sua vez, os macrófagos associados a tumores são os principais componentes presentes no infiltrado inflamatório. Muitos tumores produzem fatores estimuladores de colônias que prolongam a sobrevida dos macrófagos associados a tumores (BALKWILL & MONTOVANI, 2001, BELO et al., 2004). Esta ligação surgiu a partir de diversos estudos que correlacionavam o uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) com a diminuição da incidência do carcionoma de cólon. Porém, em meados dos anos noventa ainda não havia base científica que explicasse estas observações (OSHIMA et al., 1996; BAKHLE, 2001).

Estas observações foram hipotetizadas e finalmente testadas, cuja atividade da Cox2 estaria associada ao crescimento celular e ação de oncogenes. Um resultado crucial para esta hipótese foi descrita por Eberhart et al. (1994), que mostraram a presença de Cox2 no tecido neoplásico (câncer de cólon) e sua ausência em tecido normal (intestino). Já a Cox1 estava expressa igualmente em ambos tecidos (normal e neoplásico) (BAKHLE, 2001).

Acredita-se que a PGE_2 ofereça maior resistência das células tumorais à apoptose, aumentando a angiogênese e a proliferação, além de induzir imunossupressão pela baixa regulação de linfocinas, proliferação de células B e células T, promoção de baixa atividade citotóxica de células natural killer (NK), secreção de fator de necrose tumoral-α (TNFα) e interleucina 10 (MORITA et al., 1995; DEMPKE, 2001; MOHAMMED et al., 2002), bem como outros efeitos diretos em células tumorais (DEMPKE, 2001; MOHAMMED et al., 2002).

A Cox2 também pode ser induzida por estímulos mitóticos, mediados por fatores de crescimento, tais como: EGF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), TNF- α, Interleucinas 1α e 1β (VADLAMUDI et al., 1999; ARAKI et al., 2003). Há evidências de que a Cox2 esteja envolvida na patogênese de alguns carcinomas como mostraram Tsujii & DuBois (1995), que observram em ratos transfectados com células epiteliais a alta estabilidade destas células, cuja expressão de Cox2 foi elevada e houve resistência a apoptose e expressão aumentada de *Bcl-2*. Estas células mostraram aumento em sua adesão a matrix extracelular e reduzidos níveis dos receptores de TGF-β (TSUJII & DuBOIS, 1995). Observaram também mudanças no fenótipo destas células que expressaram altos níveis de Cox2 e aumento tumorigênico potencial. Muitos tipos de cânceres produzem altos níveis de PG, provavelmente devido ao aumento de Cox2, incluindo câncer de mama e boca (BENNETT et al., 1977; JUNG, 1985). Estes dados sugerem que o aumento da produção de prostaglandina seja devido à elevada expressão da Cox2, podendo ser este um mecanismo comum no qual o fenótipo celular é alterado permitindo uma desregulada proliferação celular (CROFFORD, 1997). Já a alta expressão da Cox2 isoladamente não é suficiente para induzir uma neoplasia, mas sua expressão é suficiente para induzir a carcinogênese em certos tipos de tecidos (CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DuBOIS, 2004)

Muitos estudos têm mostrado a relação entre a angiogênese e a expressão da Cox2. Ela induz fatores proangiogênicos como VEGF, indutores da síntese de óxido nítrico (NO), interleucinas 6 e 8, e TIE_2 (receptores de angiopoietinas 1-2), catalisando prostaglandinas que têm efeitos tanto autócrino como parácrino na proliferação e migração de células endoteliais *in vitro*. Ela é altamente expressada na "atividade" de células tumorais, considerando que a Cox1 é expressa em células endoteliais normais. Em geral, a expressão da Cox2 é alta em tumores moderadamente diferenciados e também em metástases (GASPARINI et al., 2003).

Alguns estudos preliminares sugerem que a Cox2 pode ter um papel importante na tumorogênese do osteossarcoma canino. A porcentagem da enzima expressa neste tumor e a distribuição celular paralelamente encontrada no osteossarcoma humano tornam evidente que o OSA canino serve como um modelo animal para o OSA humano espontâneo. Soma-se a isto a forte marcação de Cox2 encontrada nas formas mais agressivas da doença (MULLINS et al., 2004).

Levantamentos epidemiológicos em humanos e em cães com tumores espontâneos, mostraram que inibidores não seletivos da Cox (bloqueadores da Cox1 e

Cox2) têm efeitos quimiopreventivo e atividade antitumoral em diversos tipos de cânceres. A Cox, especialmente a Cox2, está sendo avaliada com objetivos de tratamento e prevenção do câncer. O uso de inibidores seletivos da Cox2 (coxibes) bloqueia o crescimento de muitos tumores por diversos mecanismos, principalmente pela anti-angiogênese e pelos efeitos pró-apoptóticos. Os achados pré-clínicos desses estudos mostraram que a alta expressão da Cox2 observada em tumores humanos em estágios avançados, é a base para uma nova estratégia de terapêutica anti-câncer, baseada na combinação de inibidores seletivos da Cox2 e outras modalidades de tratamentos (GASPARINI et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo

Para a condução do experimento não se utilizaram cães vivos. Foram utilizados apenas cortes histológicos de fragmentos originados de biópsias e disponíveis nos arquivos do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT-UFV) e do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

Foram analisados 78 casos de osteossarcoma canino provenientes destas Universidades. Assim sendo, a partir de um estudo retrospectivo dos casos e uma triagem realizada nos arquivos dos blocos do Laboratório de Histopatologia do DVT-UFV e do setor de Patologia da EV-UFMG, foram obtidos 20 casos no período de 01/01/1996 a 30/09/2006 no DVT-UFV e 58 casos no período de 01/01/1996 a 31/08/2006 na EV-UFMG. Para este estudo foram considerados apenas os casos registrados e confirmados de osteossarcoma canino a partir das fichas clínicas e histopatológicas das respectivas Instituições de Ensino.

4.2. Processamento do material

Os blocos selecionados já haviam sido fixados em formol, descalcificados em ácido fórmico, desidratados em álcool, diafanizados em Xilol e incluídos em parafina. Posteriormente foram seccionados em fragmentos de 5 μm de espessura.

4.3. Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)

Todos os blocos previamente selecionados, recortados e seccionados em laminas, foram corados pela hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz para a confirmação do diagnóstico e mediante isto, os cortes destes casos foram classificados histopatologicamente por três patologistas, seguindo os critérios adotados por THOMPSON & POOL (2002).

Realizada esta classificação, os casos foram selecionados para o desenvolvimento das técnicas histoquímicas e imonoistoquímicas deste trabalho.

4.3.1. Contagem das figuras de mitose

Para os casos de osteossarcoma osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e combinado foram feitas as contagens das figuras de mitose em 10 campos nas 24 lâminas com aumento de 400X (ocular 10X e objetiva de 40X). Para esta análise, foram selecionados 6 casos diferentes de cada tipo osteossarcomatoso. Esta contagem foi feita com microscópio de luz Olympus® BX41, cujas médias calculadas seguiram os respectivos padrões histológicos previamente selecionados da neoplasia.

4.4. Coloração de AgNOR (Impregnação pela prata)

Para esta técnica histoquímica foram selecionados 6 cortes histológicos com 5μm de espessura dos osteossarcomas osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e combinado. As lâminas foram devidamente preparadas com 3-aminopropyltrimethoxy silane (Sigma A3648) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes e evitar perdas de material durante o processamento da técnica descrita por Ploton et al. (1986), com modificações apresentadas a seguir:

A técnica seguiu o protocolo do Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, onde a técnica foi realizada. As lâminas foram incubadas por 1 hora em estufa a 42°C posteriormente, passaram pelos processos de diafanização em Xilol I, Xilol II e Xilol III (10 minutos cada) em temperatura ambiente, foram reidratadas em álcool absoluto (20 minutos), álcool 70% , 50% e água deionizada (10 minutos cada). Os cortes foram cobertos com a mistura da solução de nitrato de prata a 50% com solução de ácido fórmico a 1% contendo 2% de

gelatina incolor, a solução foi dissolvida na proporção de 2:1 e misturadas apenas no momento da incubação dos cortes. Ela se deu em câmara úmida e escura em estufa a 42°C por 40 minutos. Passado este tempo, as lâminas foram submetidas a 2 banhos em água deionizada por 5 minutos cada. Posteriormente, seguiram os processos de desidratação em álcool 50 % e 70% (5 minutos) e álcool absoluto (15 minutos). Depois foram diafanizadas em Xilol I e Xilol II (5 minutos cada), seguidos da montagem das lâminas com resina sintética (Entelan®) e lamínula.

A padronização do processamento do material foi conduzida fixando a temperatura da estufa e avaliando diferentes tempos para se chegar no valor mais adequado.

4.4.1. Contagem e análise das AgNORs

A contagem das AgNORs foi realizada usando-se um microscópio de luz com aumento de 1.000X (objetiva de imersão 100X e ocular de 10X). Estas lâminas foram fotografadas usando uma câmera fotográfica digital Olympus® FE-150/X730 de 5.0 mega pixels. A quantificação dos NORs por núcleo foi feita por meio de captura de imagem em monitor de um microcomputador.

Para a contagem de NORs foram escolhidos 6 casos de cada um dos tipos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e misto, cujas lâminas foram coradas pela técnica histoquímica de impregnação pela prata, ou seja, foram coradas 24 lâminas nesta técnica. As NORs por núcleo encontradas em 100 células de cada lâmina correspondiam àquelas que apresentavam melhor definição de imagem para estas contagens. O número total encontrado foi divido por 100 para a obtenção das médias de NORs por caso, para isto utilizou-se a equação ($N=\Sigma$ AgNORs/100). A morforlogia das AgNORs foi caracterizada segundo descrito por Shiro et al. (1992) e Rüschoff et al. (1989).

4.5. Imunoistoquímica

4.5.1. Técnica de imunoistoquímica

Para a realização desta técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina selecionados segundo sua classificação histológica foram seccionados em micrótomo à espessura de 5μm e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com

3-aminopropiyltrimethoxy silane (Sigma A3648) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes nas lâminas de vidro, evitando assim perda de material durante o processamento imunoistoquímico. Desta forma, foram feitos 6 cortes de cada caso para as classificações de osteossarcoma osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e combinado, já para os tipos de células-gigantes e teleangectásico, foram feitos 2 e 1 cortes respectivamente, num total de 27 casos.

A técnica utilizada seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp Campus Botucatu, onde a técnica foi realizada. As lâminas foram incubadas por 24 horas em estufa a 56°C, posteriormente passaram pelos processos de diafanização em Xilol I (30 min) e Xilol II (20min) em temperatura ambiente, reidratação em álcool 95% (3min), Absoluto I, II, III, 95% e 85% por 5 minutos cada, seguido de enxágüe em água destilada. A recuperação antigênica foi feita com EDTA (ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico – SYNTH) 10mM pH 8,0 (95°C – 25 min) em banho-maria, deixando-se em temperatura ambiente para esfriar. Depois passaram pelo enxágüe em água destilada, bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes por 3 minutos, dois banhos de solução tampão TRIS [TRIZMA® BASE – Tris (hidroximetil) aminometrane – SIGMA – cód: T-1503] por 5 minutos. A partir daí, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida para incubação com BSA 5% (Albumina Bovina – Sigma – cód: A7906) diluída em solução TRIS, por 1h em temperatura ambiente. Retirou-se o excesso de BSA 5% e iniciou-se a incubação com o anticorpo primário anti-Cox2 (Clone: CX-294 – DAKO – cód: M3617) com o diluente S3022 (DAKO) na proporção 1:50, e em seguida, foram colocados em câmara úmida por 18 horas ("overnight") a 4°C, passado este período, as lâminas foram lavadas com dois banhos de 5 minutos cada com solução tampão TRIS.

Após este procedimento, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com o anticorpo secundário por 1hora em temperatura ambiente. Para isto foi utilizado o kit EnVision™ Peroxidase Dual Link System – HRP – DAKO – cód: K4061 e, em seguida, dois banhos de tampão TRIS por cinco minutos.

Para visualização da reação, utilizou-se a solução cromógena de DAB líquido (3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorídrico – DAKO – cód: K34466), com as lâminas sendo cobertas por esta solução durante cinco minutos em câmara úmida. Imediatamente após, as lâminas foram lavadas com solução de tampão TRIS para interrupção da reação. Logo em seguida, lavadas em água destilada por 10 vezes, sendo que os dois últimos banhos foram por dez minutos.

Posteriormente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Meyer por 3 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, passando por um banho de água destilada, depois foram desidratadas em álcoois 85%, 95% (3 minutos) e absoluto I, II e III por 5 minutos cada, passadas posteriormente por três banhos de 5 minutos cada de Xilol I e II. Em seguida as lâminas foram montadas com lamínula e resina sintética (Permont).

Como controle positivo, adotou-se como referência os leucócitos imunomarcados do tecido tumoral que não apresentou imunomarcação em suas células neoplásicas, pois as células inflamatórias expressam normalmente Cox2. Para o controle negativo, foi separada uma lâmina previamente e instilado solução tampão TRIS ao invés do anticorpo primário anti-Cox2 antes de ser incubado em câmara úmida, seguindo posteriormente os demais passos da técnica.

4.5.2. Estudo imunoistoquímico

O percentual de positividade para a Cox2 nos osteossarcomas analisados foi dado pela marcação identificada com coloração marrom-acastanhada granular presente no citoplasma das células tumorais, sendo consideradas como células positivas pela imunoistoquímica, todas aquelas que possuíam esta característica independente da variação da intensidade desta marcação. As células marcadas foram contadas com o auxílio do equipamento de análise de imagens capturadas pela câmera digital Leica® DFC 500 acoplada ao microscópio Leica® DMR, utilizando-se para isto o programa computacional de análise morfométrica Leica® QWin V3.

4.6. Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e posteriormente a análise de variância. Caso apresentassem significância seria realizado o teste de Duncan. As variáveis mitose, AgNOR e Cox2 foram submetidas ao teste de correlação de Pearson (SAEG, 1999).

As variáveis qualitativas foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de Qui-Quadrado a 5% de probabilidade. (SAMPAIO, 2002).

5. RESULTADOS

5.1. Estudo retrospectivo

A partir deste estudo retrospectivo foi possível obter informações sobre as raças, sexo, idade, peso, tipo de esqueleto acometido e padrão histológico do tumor. Os dados referentes à localização exata, evolução tumoral ou história clínica não foram discutidos neste trabalho por falta de dados suficientes e padronização destas poucas informações encontradas.

5.1.1. Freqüências encontradas segundo as raças

Setenta e oito casos de osteossarcoma foram diagnosticados histologicamente. Destes casos, as raças acometidas encontradas foram Collie, Golden Retriever, Labrador, Mastim Napolitano, Pinscher e Pointer com 1 cão (1,28%), Afegan Hound, Akita, Cocker e Dog Alemão com 2 cães (2,56%), Doberman e Fila Brasileiro com 8 cães (10,26%), Pastor Alemão com 12 cães (15,38%), Rottweiler e sem raça definida (SRD) com 16 cães (20,51%) e sem informações relativas nas fichas de arquivo, 4 animais (5,13%) acometidos (Figura 2).

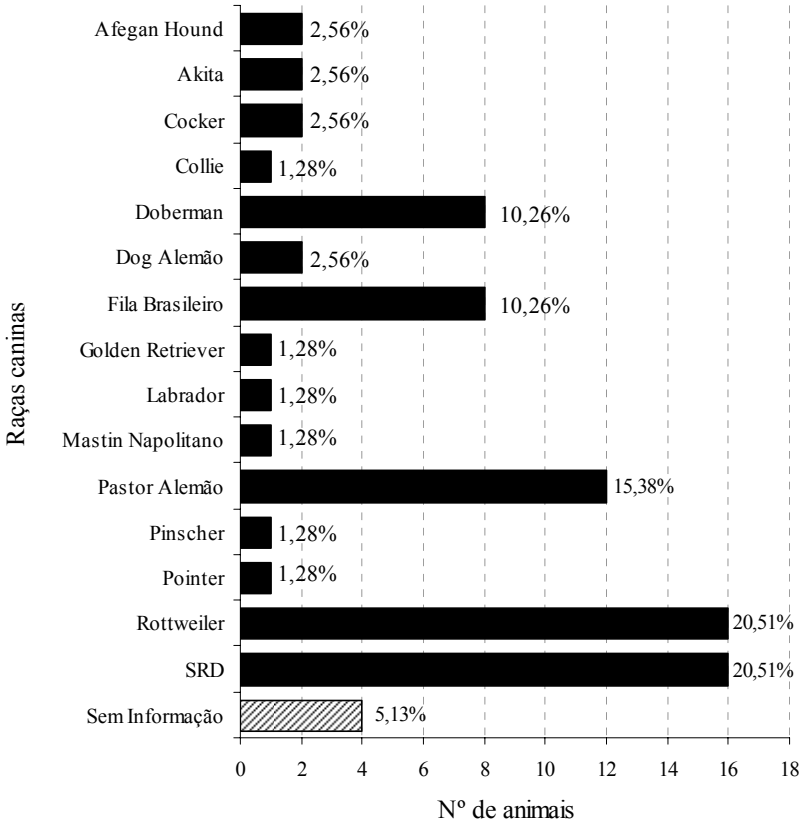


Figura 2 – Número de animais e porcentagens das raças caninas acometidas pelo osteossarcoma.

5.1.2. Freqüências encontradas segundo o peso

A média dos pesos dos 78 animais deste trabalho foi de 37,1kg. Os demais valores encontrados foram de seis cães (8%) com peso abaixo de 16kg; 24 (31%) com peso entre 16 e 37,1kg e 34 animais (43%) com peso acima de 37,1 kg (Figura 3).

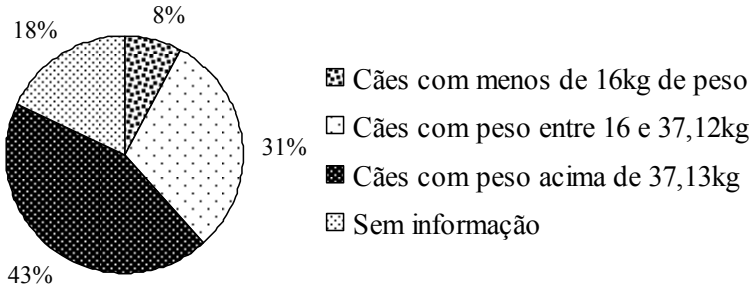


Figura 3 – Porcentagem de cães com osteossarcoma em relação aos seus pesos em quilogramas: < 16kg, 16-37,12kg, > 37,13kg e sem informação.

5.1.3. Freqüências encontradas segundo o sexo

Dentre estes animais supracitados, 48 foram machos (61%), 27 fêmeas (35%) e 3 (4%) não possuíam informações como mostra a Figura 4. A relação é de cada 1 fêmea afetada, observam-se 1,8 machos também afetados.

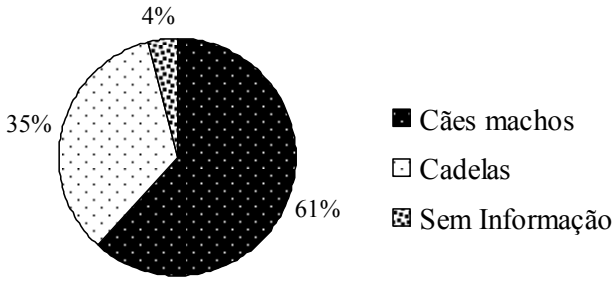


Figura 4 – Porcentagem de cães com osteossarcoma por sexo: machos, fêmeas e sem informação.

5.1.4. Freqüências absolutas segundo as idades

Existe certa variação na idade de aparecimento do osteossarcoma, cujos intervalos das idades mais acometidas por este tumor encontrando-se entre os 6|-12 anos, sendo que os que apresentam maior incidência aparecem entre 10|-12 anos (21,79%), seguidos dos intervalos de 6|-8 anos (20,51%) e 8|-10 anos (17,95%).

A média de idade dos animais acometidos foi de 7,9 anos. Foi encontrado um caso com idade muito jovem entre 0|-2 anos. Os demais intervalos e seus respectivos índices de incidências encontram-se descritos na Figura 5.

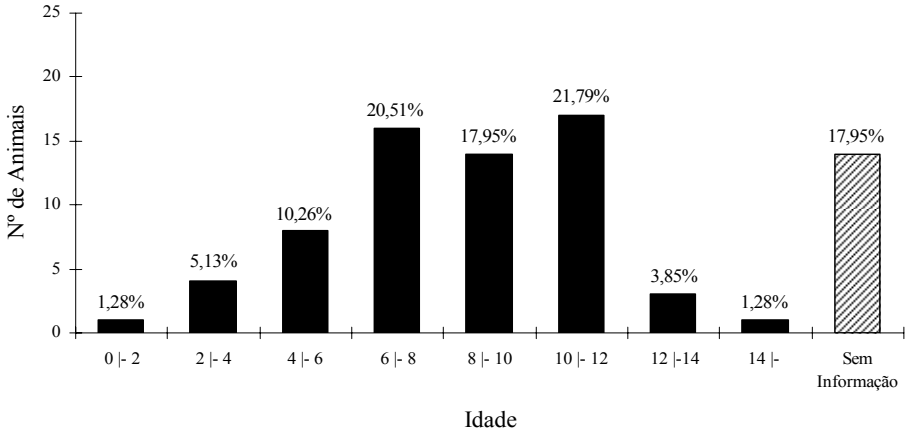


Figura 5 – Freqüência absoluta e porcentagem de cães com osteossarcoma de acordo com o intervalo das idades: 0|-2, 2|-4, 4|-6, 6|-8, 8|-10, 10|-12, 12|-14, ≥ 14 e sem informação.

5.1.5. Freqüências encontradas segundo a localização anatômica

O osteossarcoma com origem no esqueleto obteve maior incidência com 61 casos (78%), já os de origem extra-esquelética somaram 6 casos (8%) e 11 deles (14%) não havia registros de sua localização (Figura 6a).

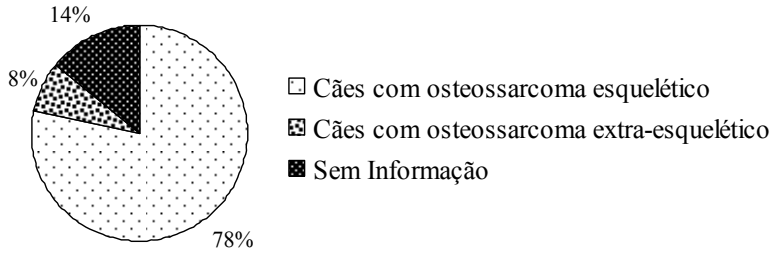


Figura 6a – Porcentagem de cães com osteossarcoma extra-esquelético, esquelético e sem informação.

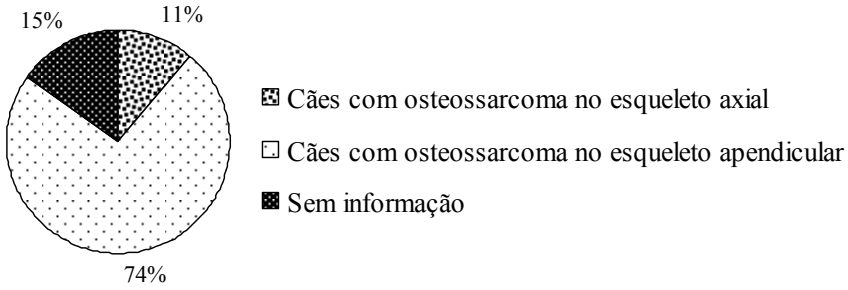


Figura 6b – Porcentagem de cães com osteossarcoma no esqueleto axial, apendicular e sem informação.

Desconsiderando os 6 osteossarcomas de origem extra-esquelética, tivemos 53 (74%) casos de origem do esqueleto apendicular e 8 (11%) casos de origem do esqueleto axial, sendo 11 (15%) casos sem informação da origem do tumor (Figura 6b). Neste trabalho foi encontrado um acomentimento de 6,6 vezes mais incidente no esqueleto apendicular que o axial.

5.2. Análise Histológica

A análise histológica permitiu confirmar o diagnóstico de osteossarcoma e classificar segundo padrão histopatológico descrito por Thompson & Pool (2002). A avaliação foi feita de forma criteriosa de acordo com o que foi visualizado nas lâminas

confeccionadas a partir dos blocos arquivados. Estas avaliações e classificações foram feitas por 3 patologistas diferentes. Desta forma, foram encontrados 42 casos de osteossarcoma osteoblástico (53%), 11 condroblásticos (14%), 10 do tipo combinado ou misto (13%), 7 fibroblásticos (9%), 3 de células gigantes e teleangectásico (4% cada), nenhum do tipo pobremente diferenciado e 2 outros casos (3%) que não foram classificados histologicamente por não terem sido encontrados os blocos em parafina nos arquivos (Figura 7).

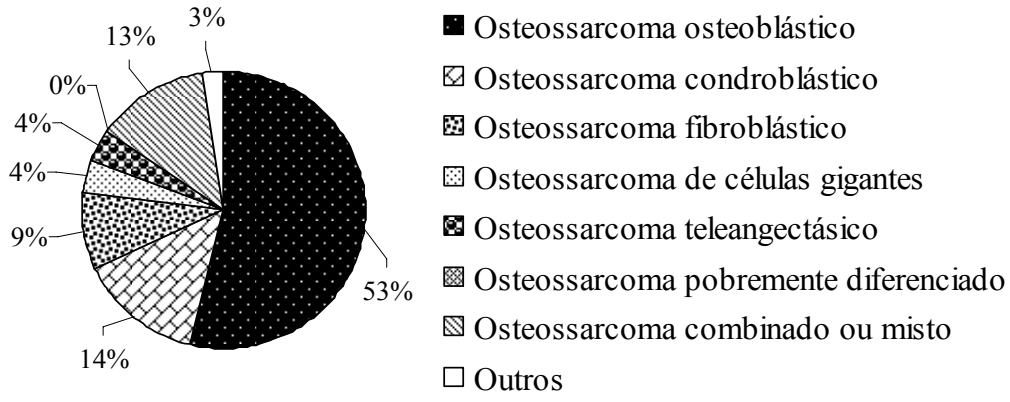


Figura 7 – Porcentagem dos tipos de osteossarcoma segundo a classificação histológica.

5.2.1. Principais características histológicas encontradas

5.2.1.1. Osteossarcoma osteoblástico

Esta neoplasia foi caracterizada por apresentar áreas de intensa produção de matriz óssea e outras com um padrão celular mais intenso, cujas células gigantes tumorais se encontravam de forma significativa principalmente em áreas onde havia osso neoformado. Áreas focais de necrose de tamanhos variáveis foram observadas em muitas lâminas. Não foram encontradas áreas de encapsulamento tumoral, porém apresentou um padrão infiltrativo com desorganização celular, índice mitótico variável dependendo do campo e do caso em que se estava observando. As células apresentaram um padrão pleomórfico muito intenso, núcleos de arredondados a ovalados, dois ou mais núcleos sendo observados em algumas células. A cromatina estava disposta de forma frouxa com um ou mais nucléolos proeminentes (Figura 8).

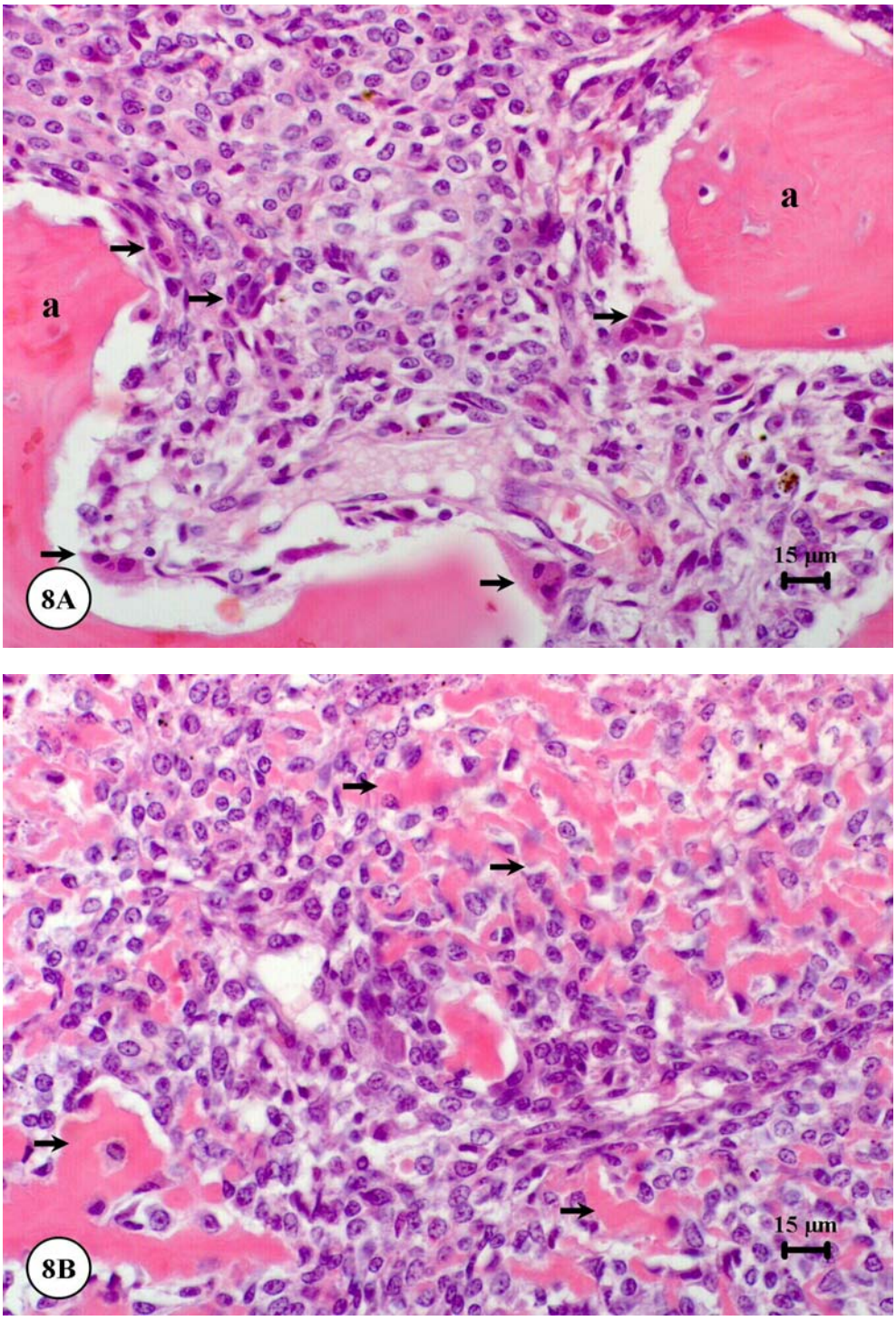


Figura 8 – Osteossarcoma osteoblástico. Grande número de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Em A, notam-se nas áreas próximas das trabéculas ósseas (a) células gigantes multinucleadas (setas). Em B, há proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada (osteóide) (setas) – HE. 400X.

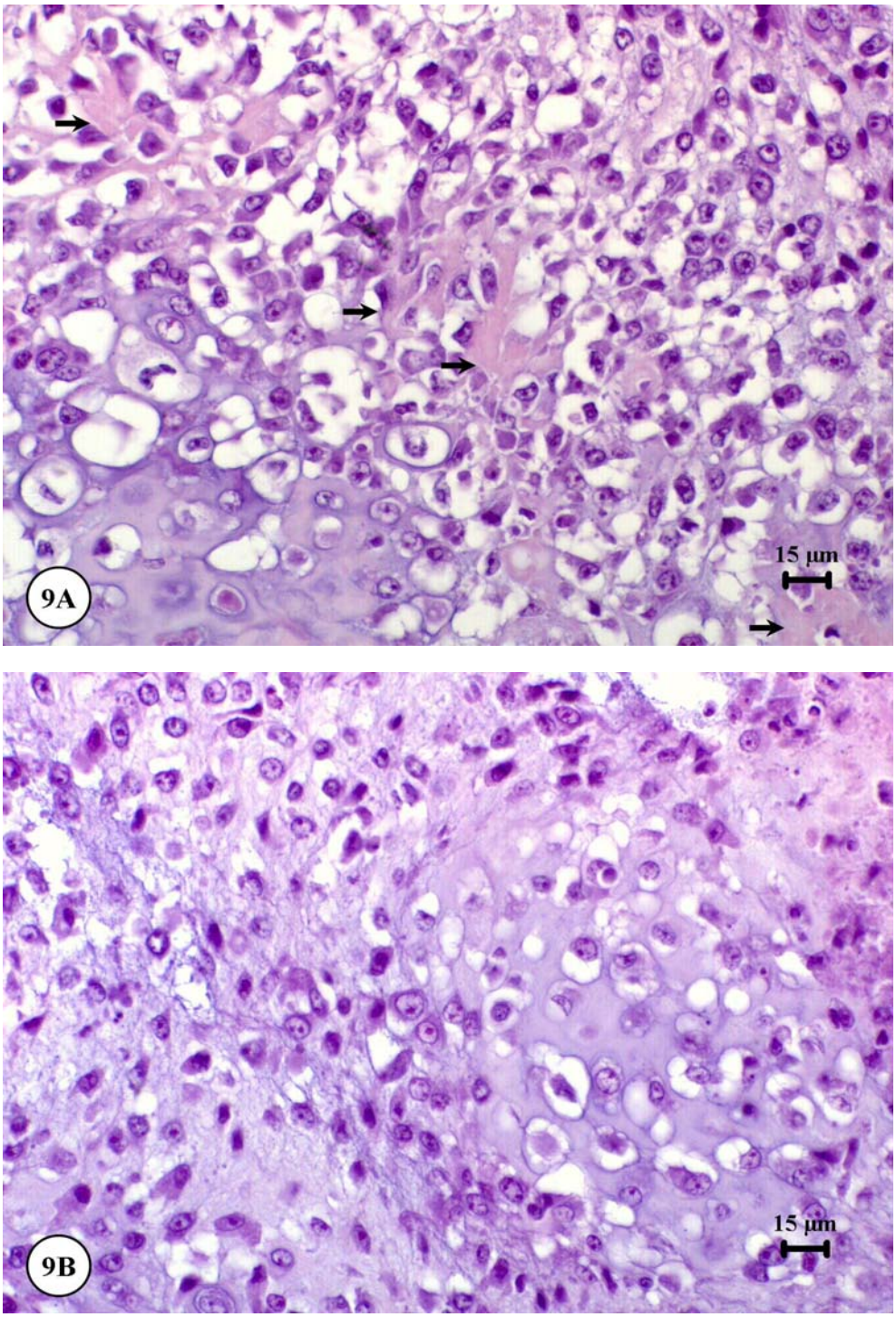


Figura 9 – Osteossarcoma condroblástico. Em A, predomínio de matriz condróide, com pequenas áreas de produção de matriz óssea (osteóide) (setas). Em B, predomínio de matriz condróide maligna com células neoplásicas pleomórficas – HE. 400X.

5.2.1.2. Osteossarcoma condroblástico

É uma neoplasia que se caracteriza pela produção moderada de matriz óssea a partir de um predomínio de tecido cartilaginoso maligno, infiltrativo, minimamente delimitado e não encapsulado. Necrose foi encontrada em praticamente todos os casos desta subclassificação, de forma pontual em alguns casos e mais intensa em outros. Foram encontradas células gigantes em número reduzido, assim como mitoses por campo foram menores quando comparados ao OSA osteoblástico. As células apresentavam intenso pleomorfismo com núcleos ora alongados, ora arredondados com a cromatina frouxa e nucléolos evidentes (Figura 9).

5.2.1.3. Osteossarcoma fibroblástico

As células mesenquimais tumorais apresentaram pleomorfismo acentuado com um padrão infiltrativo, com rara produção de matriz óssea, possuindo um padrão sólido não encapsulado e pouco delimitado. Em menor aumento, era fácil a identificação do padrão fibrossarcomatoso do tumor, com feixes celulares ora organizados, ora desorganizados. Poucas áreas de necrose foram encontradas. O índice mitótico foi menor se comparados com o OSA osteoblástico e condroblástico. Em todos os casos quase não se verificou uma presença significativa de células gigantes. O padrão celular foi muito variável, cujas células possuíam um padrão volumétrico citoplasmático maior ou menor dependendo do caso em que se estava analisando, os núcleos variavam de alongados a fusiformes com cromatina frouxa e nucléolos evidentes (Figura 10).

5.2.1.4. Osteossarcoma de células gigantes

Nestes casos, as células apresentavam um padrão celular muito pleomórfico e desorganizado, as células multinucleadas eram encontradas em grande quantidade em todos os aumentos do microscópio. Além da presença característica deste padrão celular, foram verificadas algumas áreas com produção de matriz óssea. Figuras de mitoses foram encontradas nesta neoplasia em índice baixo a moderado. Caracterizou-se por ser um tumor infiltrativo, bem vascularizado, com extensas áreas de necrose e não encapsulado. As células mesnquimais malignas apresentaram um padrão eosinofílico, com núcleos arredondados, ovalados a alongados, com cromatina frouxa e nucléolos evidentes (Figura 11).

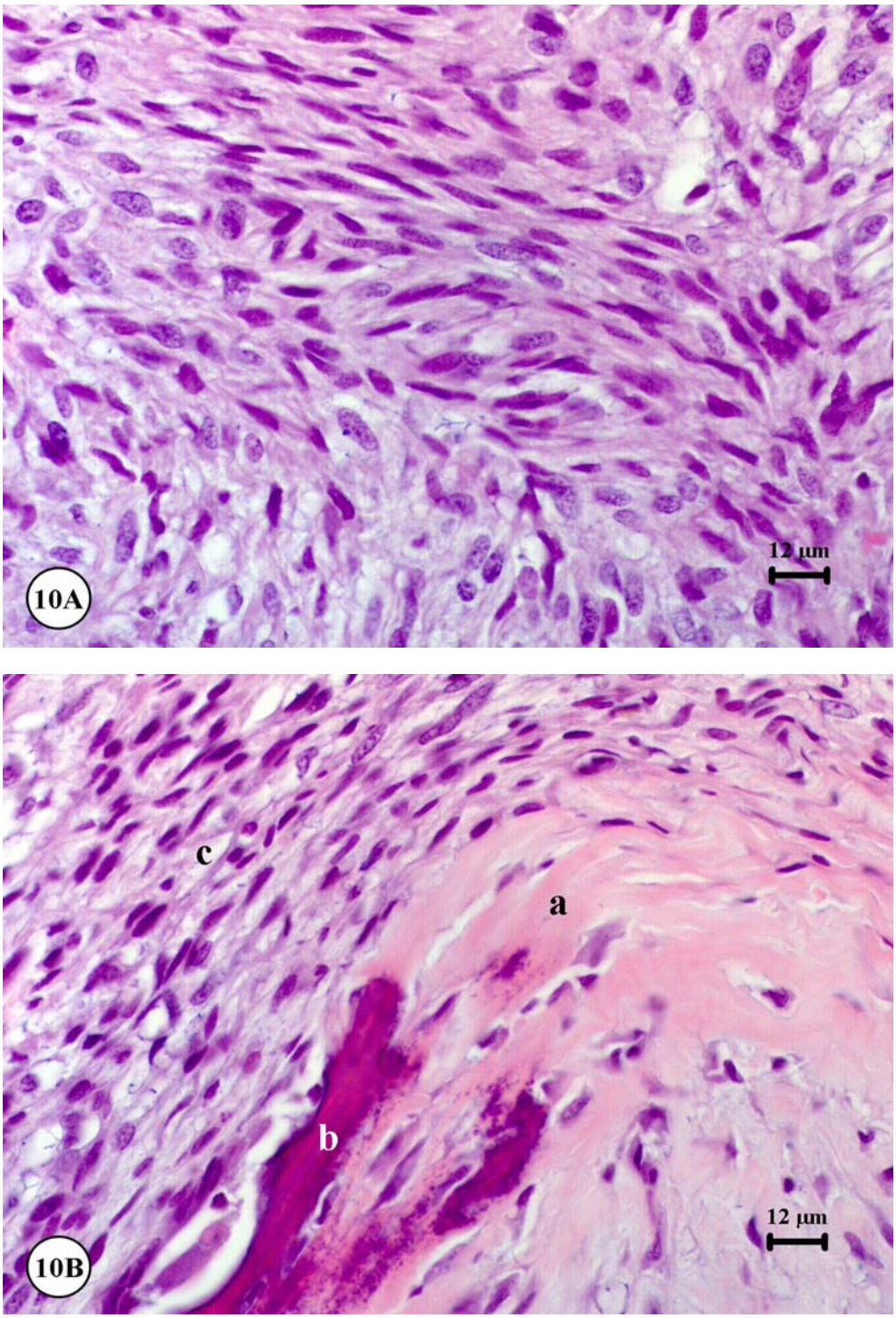


Figura 10 – Osteossarcoma fibroblástico. Presença de grande número de células fusiformes malignas. Em A, observa-se o predomínio de tecido fibrossarcomatoso. Em B, nota-se matriz óssea neoformada, área de diferenciação osteossarcomatosa com focos de mineralização (a), tecido ósseo calcificado (b), células fusiformes malígnas (c) – HE. 600X.

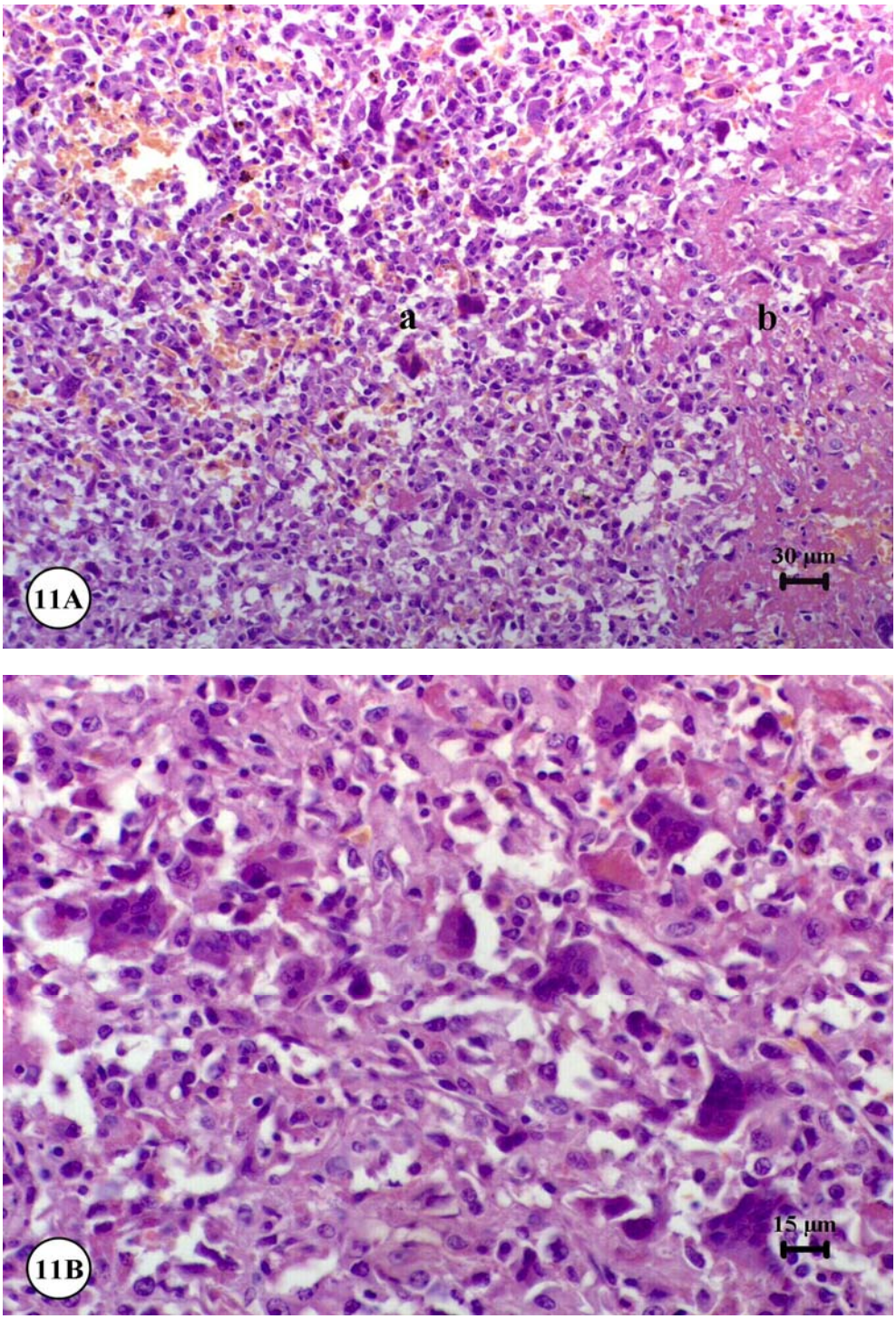


Figura 11 – Osteossarcoma de células gigantes. Tumor caracterizado por grande número de células gigantes multinucleadas. Em A, nota-se células sarcomatosas indiferenciadas (a) e área de produção de matriz óssea maligna (b) – HE. 200X. Em B, observam-se muitas células gigantes multinucleadas neoplásicas junto aos osteoblastos neoplásicos pleomóficos – HE. 400X.

5.2.1.5. Osteossarcoma teleangectásico

As células desta neoplasia apresentaram um padrão altamente pleomórfico com pequena formação de matriz óssea, cujas características apresentaram um padrão infiltrativo, pouco delimitado e não encapsulado. Distinguiu-se por apresentar algumas cavidades tipo aneurismáticas e ectasias neovasculares de forma desorganizada e de diversos tamanhos, estando preenchidos por hemácias com paredes formadas por células anaplásicas. Grande presença de células gigantes malignas foi encontrada por praticamente todos os campos das lâminas. As células neoplásicas apresentaram núcleos arredondados a alongados, com hipercromasia, porém com predomínio de cromatina frouxa com nucléolos evidentes e com moderado índice de figuras de mitose. Foram também extensas as áreas de necrose e hemorragias com significativo número de hemácias entremeadas por todo tumor em análise (Figura 12).

5.2.1.6. Osteossarcoma combinado ou misto

Os casos que foram classificados como sendo do tipo combinado ou misto, apresentaram pelo menos duas de uma das características anteriormente mencionadas, cujo predomínio celular não foi possível estabelecer, porém, os tipos celulares combinados mais presentes encontrados foram osteoblásticos, condroblásticos e fibroblásticos, sendo os demais encontrados em menor proporção. A produção de matriz óssea foi encontrada em todos os casos desta subclassificação e as figuras de mitose foram encontradas com intensidade de baixa a moderada (Figura 13).

5.2.1.7. Osteossarcoma pobremente diferenciado

Esta subclassificação do osteossarcoma não foi encontrada nos 78 casos descritos neste trabalho.

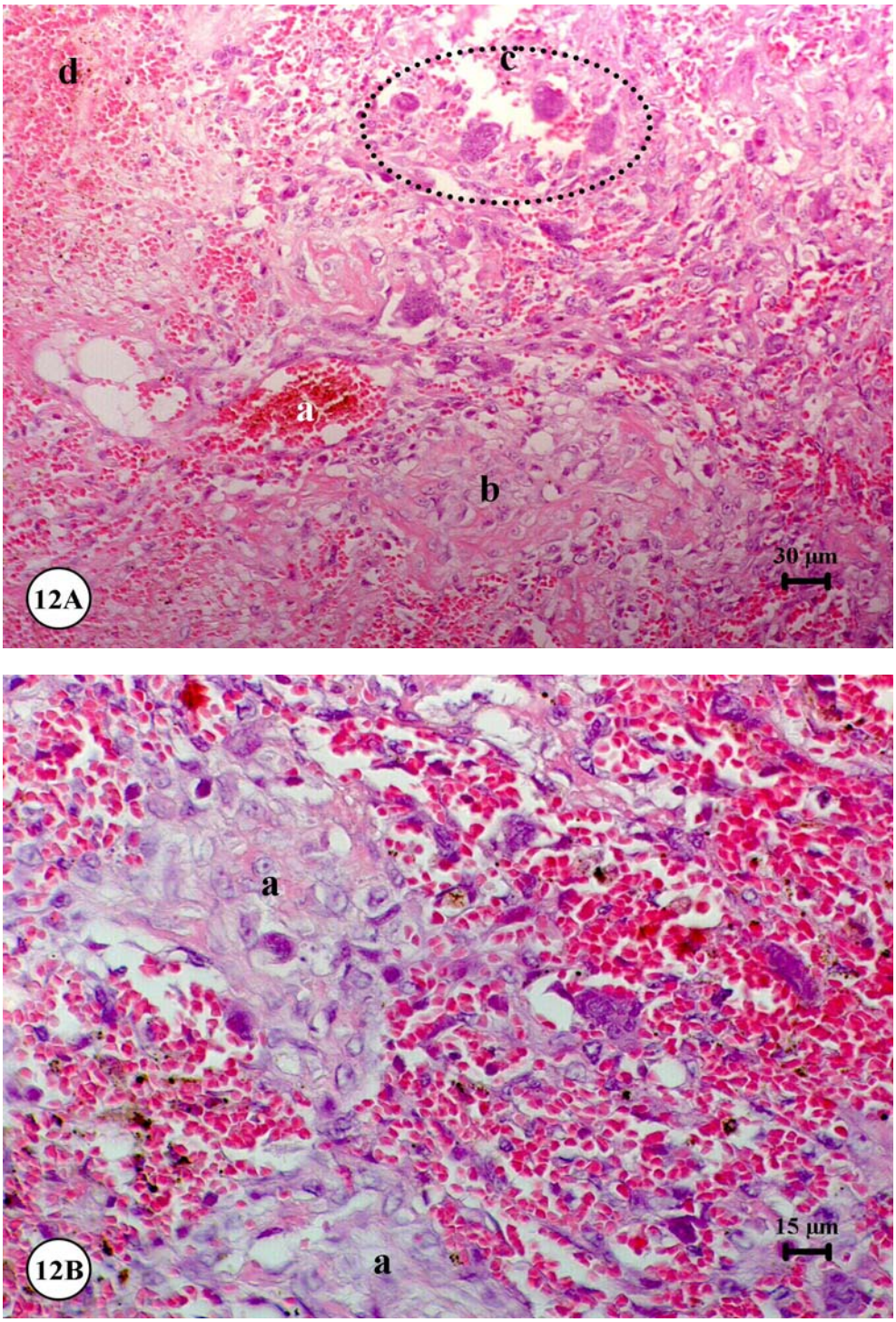


Figura 12 – Osteossarcoma teleangectásico. Extensas áreas hemorrágicas. Presença de ectasias neovasculares, com células gigantes multinucleadas e produção de matriz óssea maligna. Em A, observa-se vaso ingurgitado de sangue (a), produção de matriz óssea (b), células gigantes multinucleadas (c) e área de necrose tumoral (d). – HE. 200X. Em B, há produção de matriz óssea neoplásica (a). – HE. 400X.

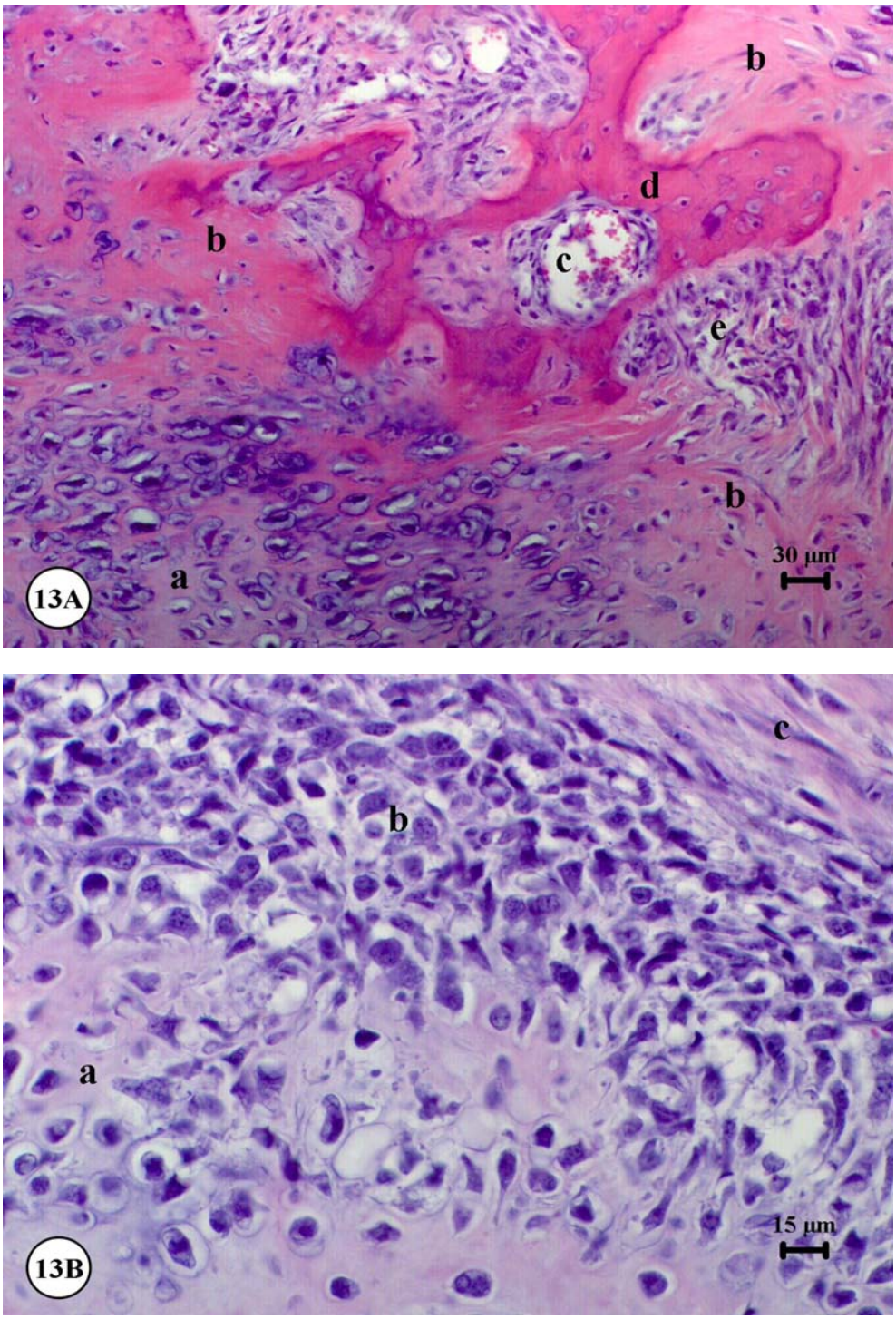


Figura 13 – Osteossarcoma combinado ou misto. Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular. Em A, observa-se tecido cartilaginoso maligno (a), matriz óssea maligna (b), vaso sangüíneo (c), trabécula óssea neoplásica circundando um vaso sangüineo (d) e tecido fibrossarcomatoso maligno (e). – HE. 200X. Em B, nota-se matriz condróide maligna (a), células pleomórficas malignas (b) e células malignas fusiformes (c). – HE. 400X.

5.3. Contagem de figuras de mitoses

De acordo com a Figura 14, verifica-se que as médias das figuras de mitoses nos diversos tipos de osteossarcomas foram de 18,5, 13,1, 10,7 e 11,3 para os tipos Osteoblásticos, Condroblásticos, Fibroblásticos e Combinado respectivamente, sendo a média geral de 13,4.

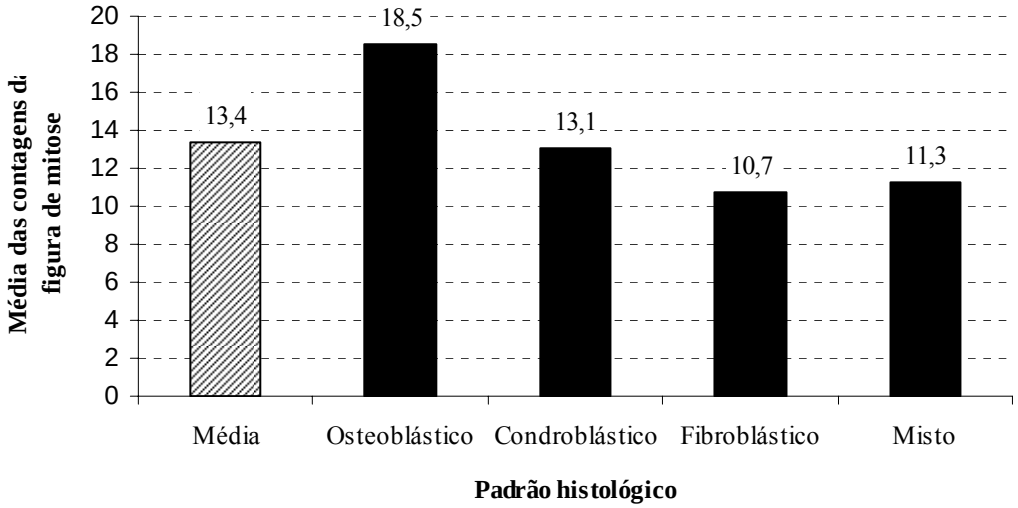


Figura 14 – Valores médios para figuras de mitose osteossarcomas: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e misto.

Não foi efetuado nenhum tipo de comparação entre o índice de mitoses com a sobrevida do animal, uma vez que não houve acompanhamento dos casos clínicos por se tratar de um estudo retrospectivo.

5.4. Coloração de AgNOR

A quantificação das AgNORs se deu pela contagem dos pontos amarronzados ou escuros encontrados dentro do núcleo das células do tumor, que poderiam estar de forma dispersa, formando agregados ou ainda ligadas formando o próprio nucléolo. Foi encontrada diferença ($p<0,05$) na quantificação das NORs nos diferentes tipos de osteossarcomas.

5.4.1. Contagem e análise das AgNORs

Nos cortes corados pela prata, a média geral encontrada de NORs por núcleo para os diferentes tipos de osteossarcoma foi de 32,5 para o osteoblástico, 16,7 para o condroblástico, 23,6 para o fibroblástico e 26,9 para o combinado ou misto.

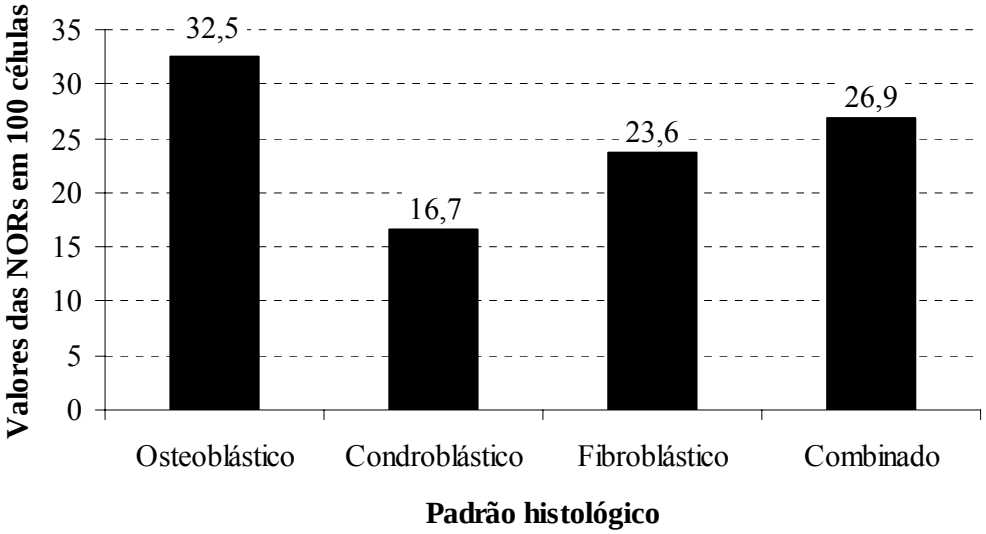


Figura 15 – Valores médios da contagem de pontos de NORs em 100 células nos diferentes padrões histológicos de osteossarcoma canino.

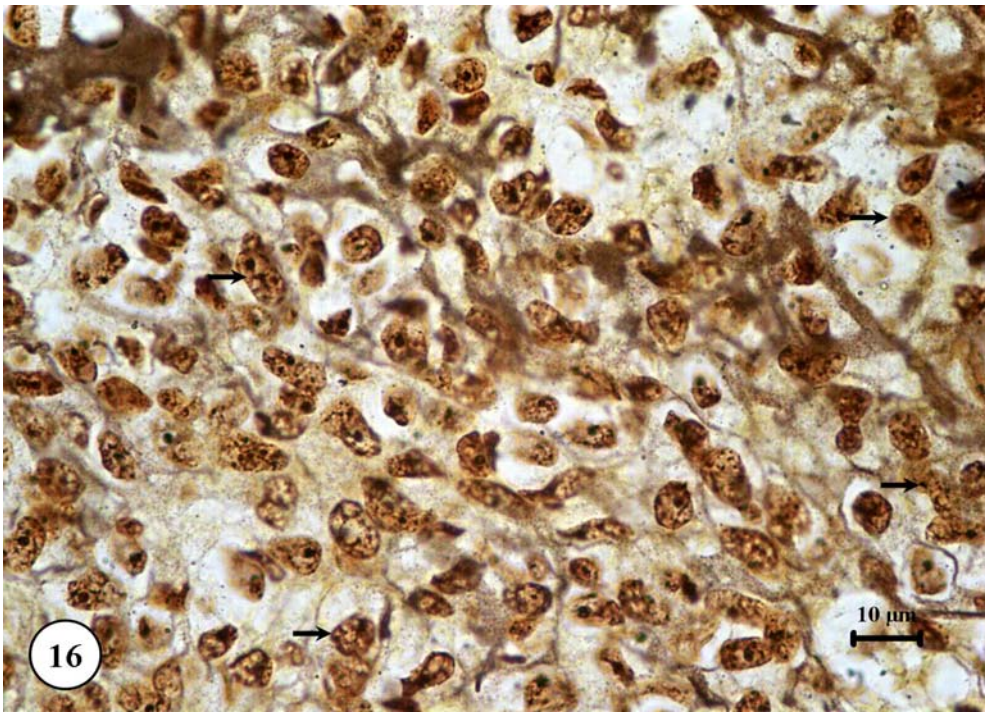


Figura 16 – Osteossarcoma osteoblástico corado pela técnica de AgNOR, apresentando pleomorfismo celular moderado a acentuado com núcleos celulares marcados pela prata com múltiplas NORs intra-nucleares (setas). 1.000X.

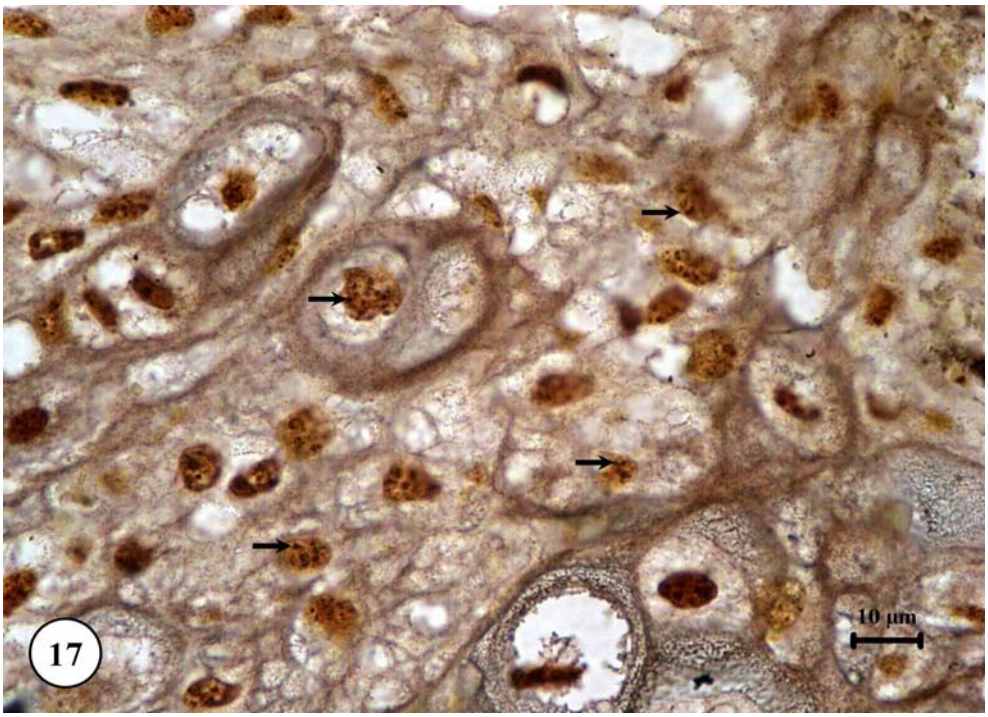


Figura 17 – Osteossarcoma condroblástico corado pela técnica de AgNOR, apresentando núcleos celulares envoltos por matriz condróide com menor quantidade de NORs intra-nucleares (setas). 1.000X.

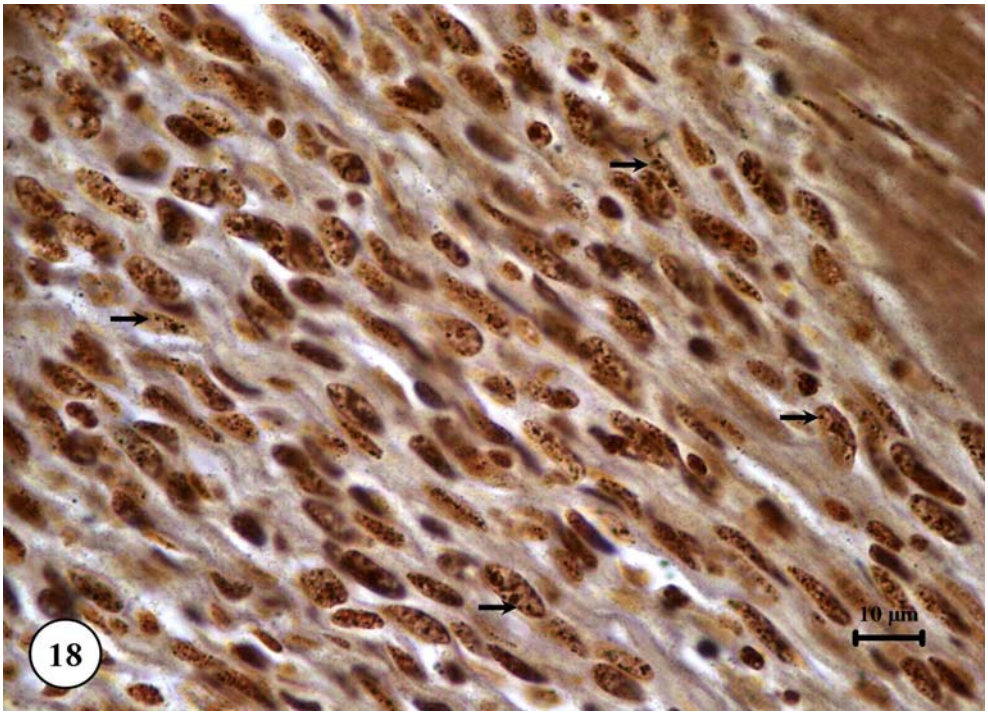


Figura 18 – Osteossarcoma fibroblástico corado pela técnica de AgNOR, observa-se os núcleos fusiformes a ovalados com núcleos celulares impregnados pela prata com múltiplas NORs intranucleares. 1.000X.

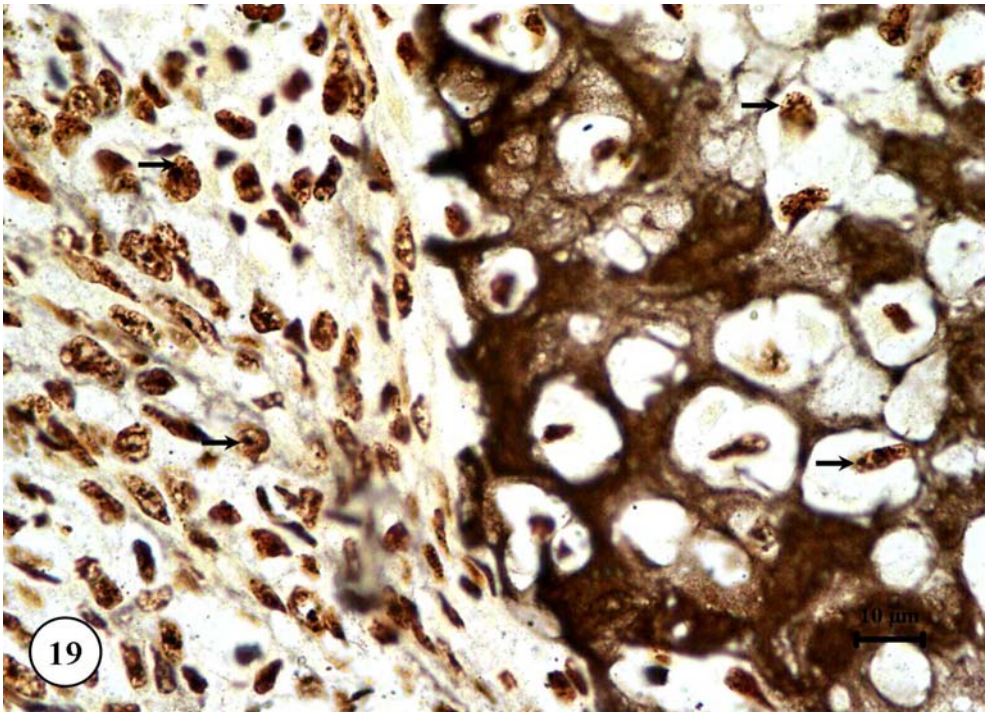


Figura 19 – Osteossarcoma combinado (misto) corado pela técnica de AgNOR, observa-se a esquerda padrão histológico osteoblástico e a direita condroblástico, em ambos os núcleos celulares apresentaram impregnação pela prata com múltiplas NORs intranucleares. 1.000X.

5.5. Expressão imunoistoquímica da Cox2

A imunomarcação positiva apresentou diferentes intensidades de reação nos diversos tipos de osteossarcoma e também em casos distintos do mesmo tipo celular, ou seja, a reação se deu de forma fortemente marcada a fracamente marcada independente do caso e do padrão celular analisado. Desta forma, foram consideradas como células positivas pela imunoistoquímica, todas aquelas que possuíam imunomarcação independente da variação da intensidade desta marcação.

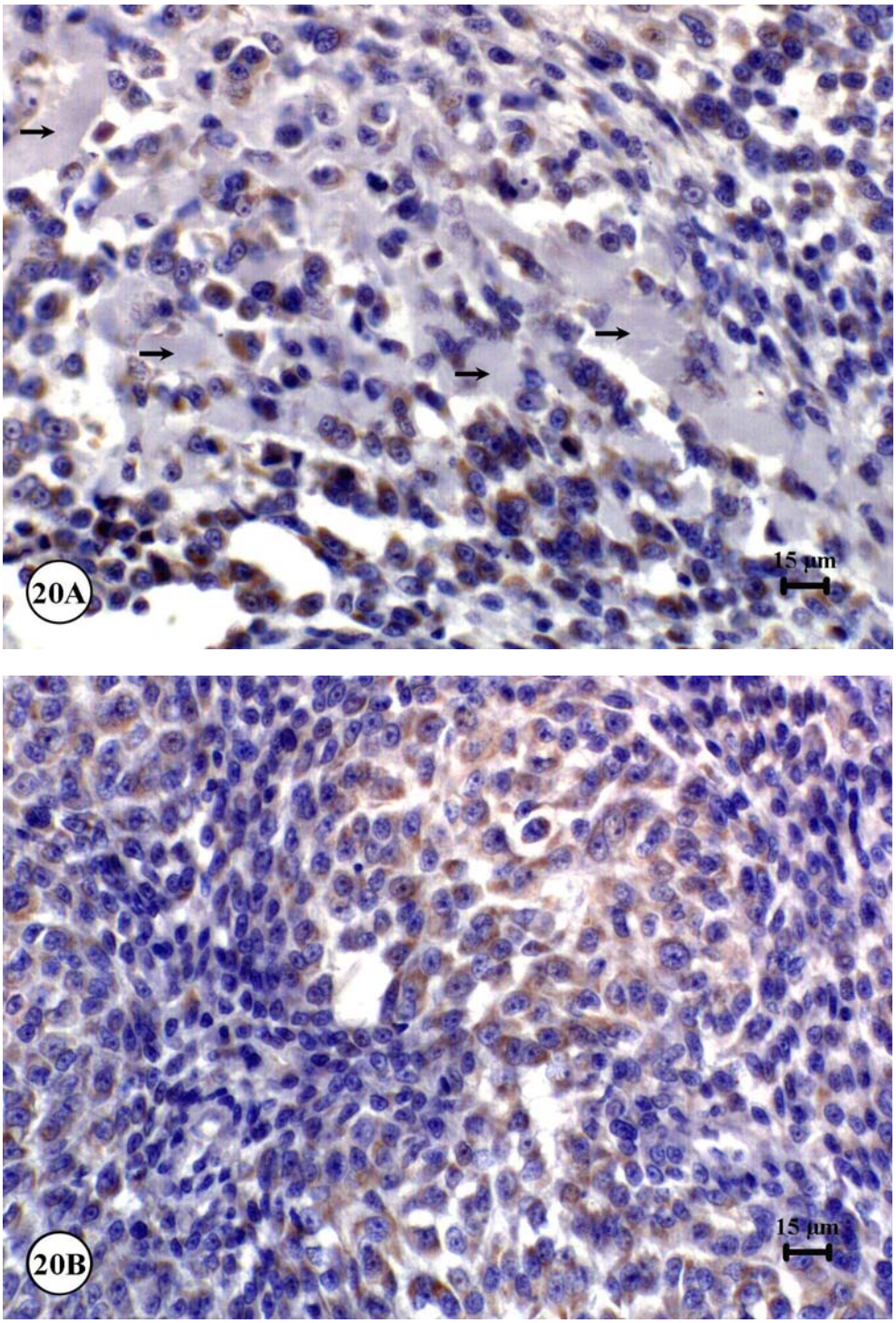
Os resultados da análise estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Casos positivos (+) e negativos (-) da imunoistoquímica segundo o padrão histológico do osteossarcoma canino.

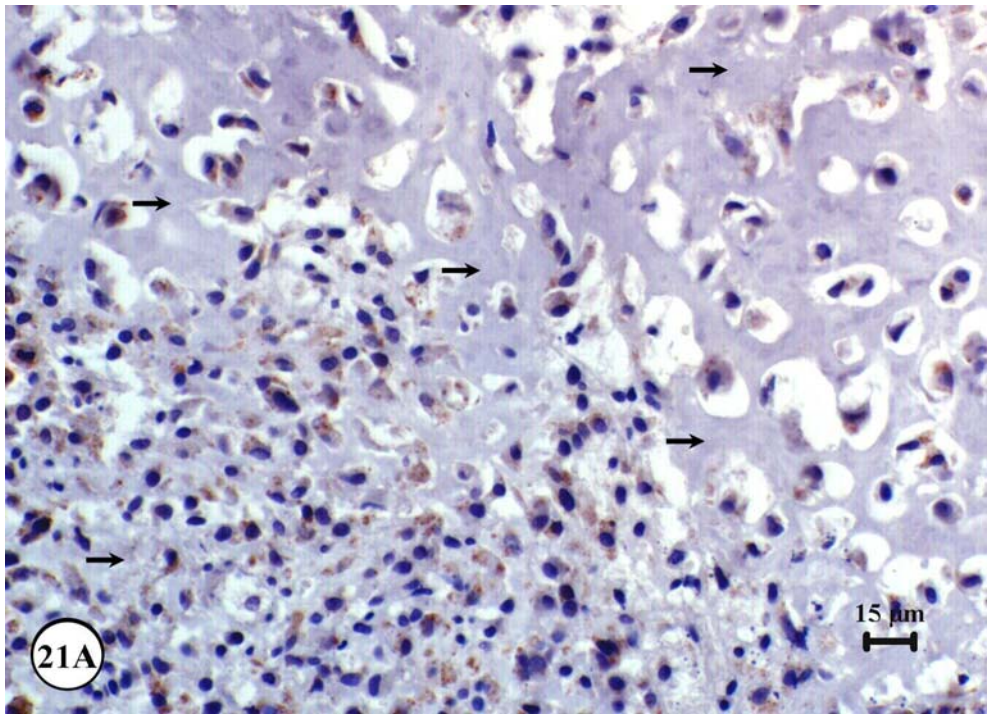
Casos	Classificação histopatológica					
	Osteoblástico	Condroblástico	Fibroblástico	Misto	Célula Gigante	Teleangectásico
+	5	4	2	3	2	1
-	1	2	4	3	0	0
Total	6	6	6	6	2	1

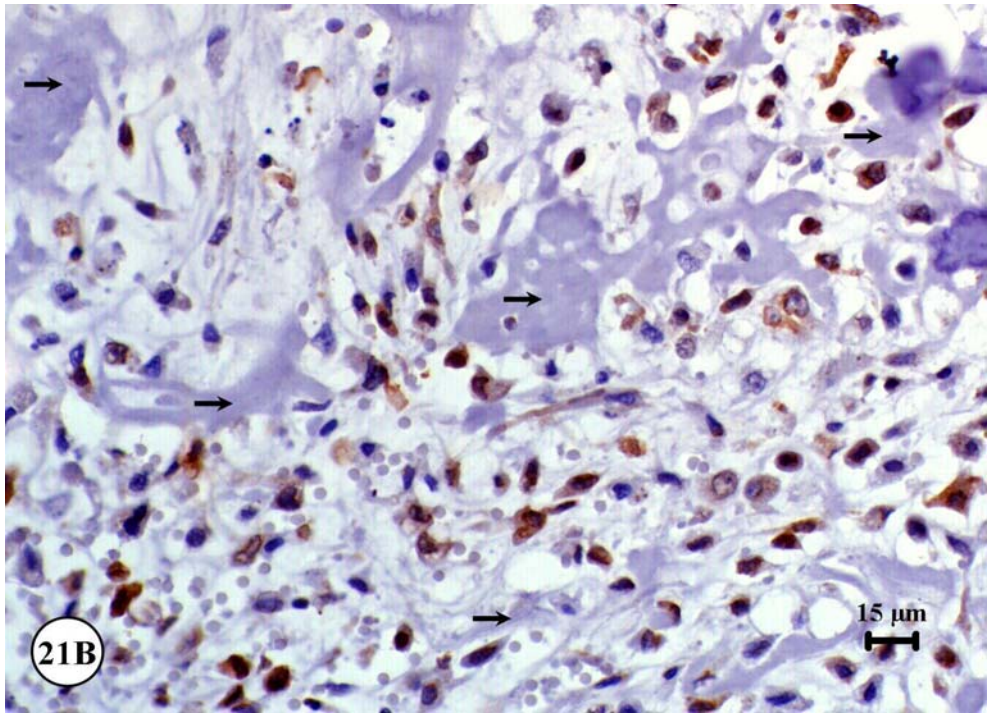
Para os 6 casos analisados de cada tipo de osteossarcoma como mostra a Tabela 1, tivemos os seguintes resultados com reação positiva: osteoblásticos (5 casos), condroblásticos (4 casos), fibroblásticos (2 casos) e mistos (3 casos). Para os 2 casos de células gigantes e para o único teleangectásico analisados, a reação positiva também se mostrou presente.

Todas as classificações dos osteossarcomas apresentaram algumas particularidades e muitas similaridades nas reações. A expressão da Cox2 nos casos de osteossarcoma osteoblásticos foram facilmente identificadas nos 5 dos 6 casos analisados, mesmo nas fracamente marcadas. Esta classificação foi a que apresentou maior variação de intensidade entre os padrões histológicos analisados e também onde se observou mais facilmente diferentes intensidades num mesmo corte, ou seja, dependendo da área em que se estava analisando, a intensidade poderia ser fracamente marcada a fortemente marcada, ou até mesmo em alguns casos verificou-se regiões sem nenhuma marcação e em outro campo próximo, reação positiva.



Figuras 20 – (A e B) Osteossarcoma osteoblástico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Este padrão histológico foi o que apresentou maior celularidade e maior número de imunomarcações. Observa-se presença de matriz óssea entre as células neoplásicas (setas).





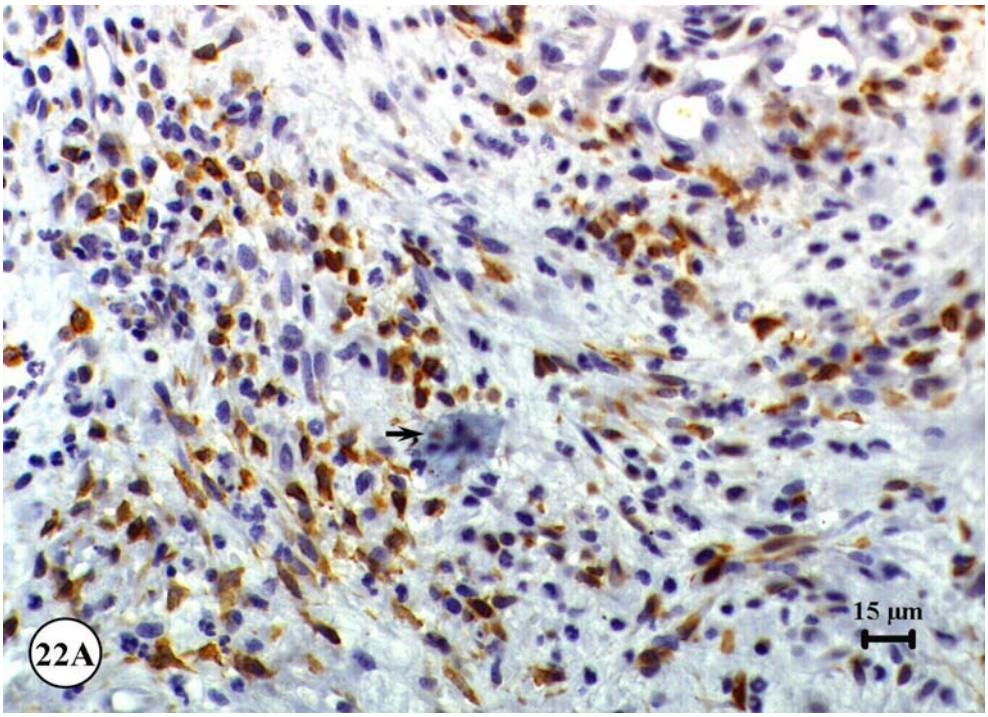
Figuras 21 – (A e B) Osteossarcoma condroblástico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Observa-se presença de matriz condróide (setas) com citoplasma imunomarcado em muitas células tumorais.

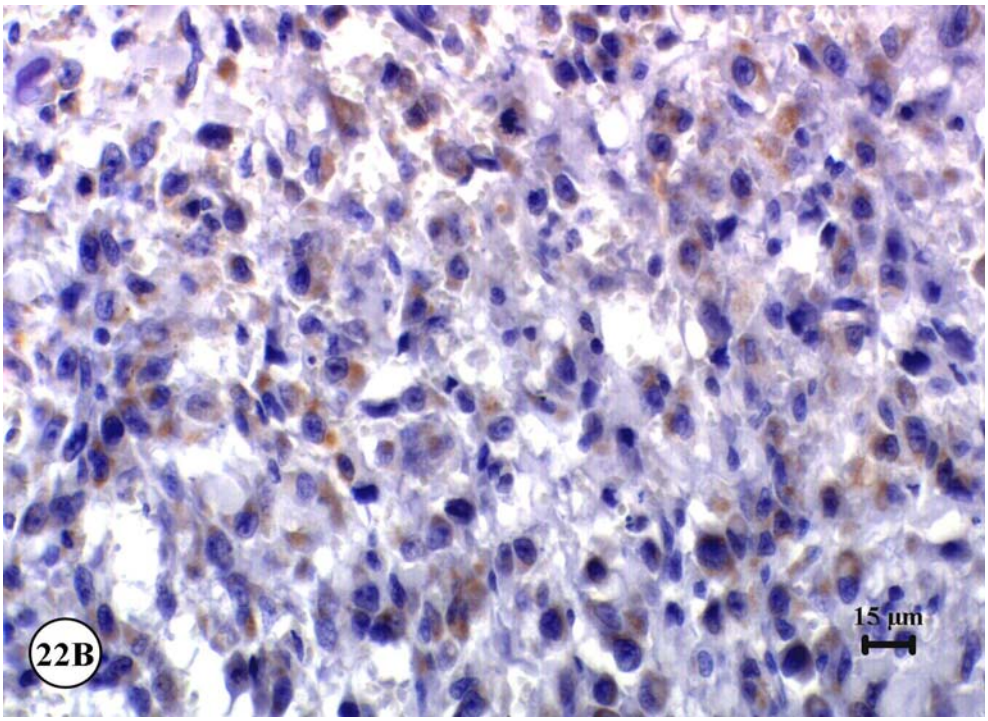
Dos 4 casos positivos dos 6 analisados para o tipo condroblásticos, apresentaram dois casos fortemente marcados, um com marcação moderada e outro pobremente marcado. Foi interessante notar que em algumas ocorrências o tecido cartilaginoso maligno ora se apresentava bem marcado, ora sem nenhuma marcação, obedecendo o que fora descrito anteriormente em relação as diferentes intensidades numa mesma lâmina analisada, este achado também foi observado entre diferentes casos condroblásticos. Porém, as células que ainda não possuiam um padrão condróide definido, apresentaram imunomarcação quase que uniforme por toda a lâmina, porém, em alguns casos estas células marcadas mostram-se com intensidade diferentes entre um caso e outro.

Nos osteossarcomas fibroblásticos, para os 2 casos positivos dos 6 analisados, encontrou-se uma maior proporção de áreas ausentes de reação positivas em relação às outras classificações histológicas, mostrando uma menor intensidade da expressão de Cox2 nesta neoplasia, fato que corrobora com o descrito por THOMPSON & POOL (2002) relatando uma menor agressividade desta neoplasia. Porém, num deste casos, numa área aparentemente limítrofe do tumor, foi encontrado um feixe fortemente marcado que se estendia por quase toda extensão do corte, sugerindo uma área de crescimento ou expansão do tumor naquela região, mostrando que a reação pode se apresentar fortemente positiva nestes casos.

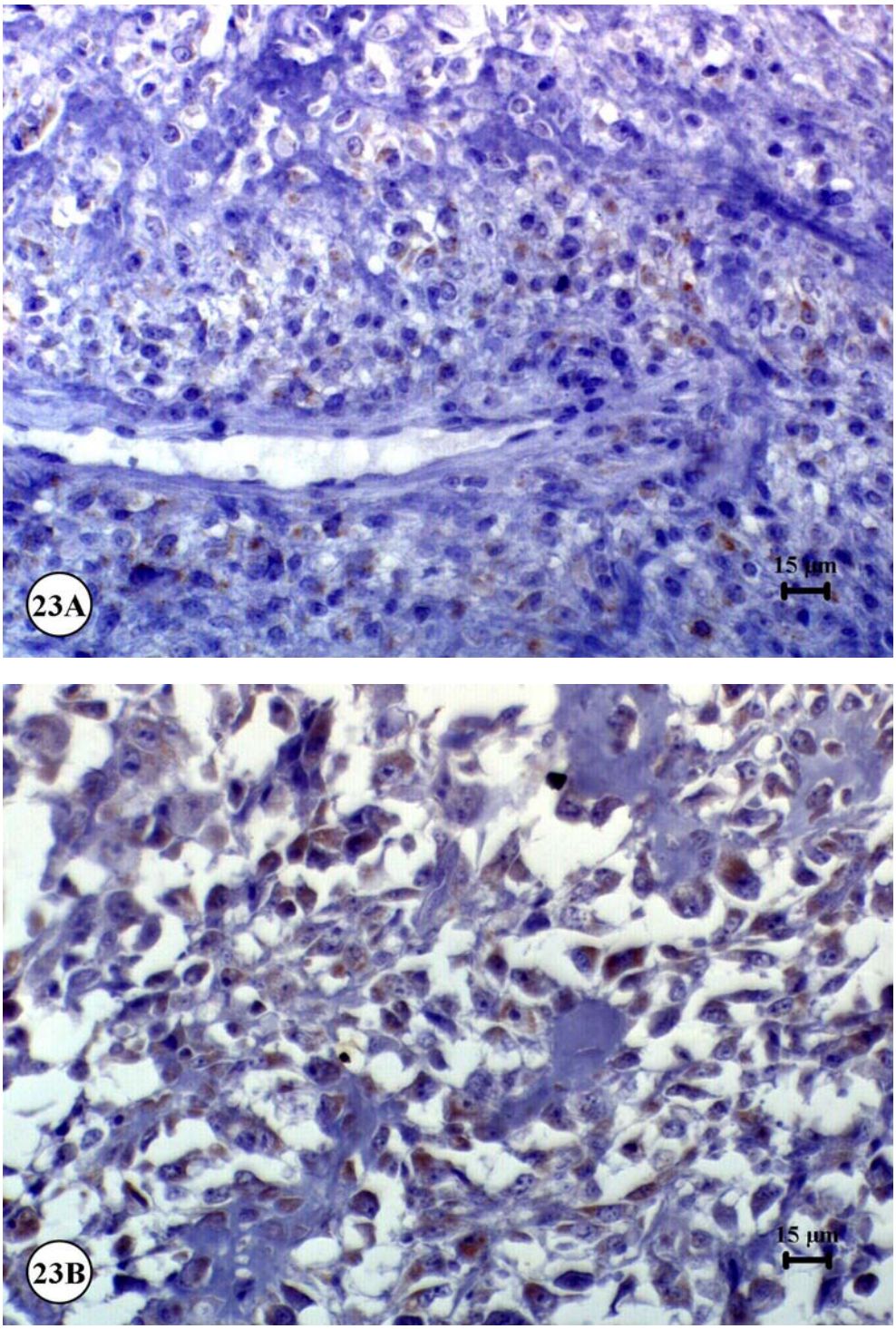
As reações dos 3 casos positivos para os também 6 casos analisados de osteossarcama do tipo combinado, mostraram-se individualmente fortemente, moderado e fracamente positivos respectivamente, desta forma, o que foi observado nos outros 3 padrões histológicos anteriores, também foi encontrado neste tipo celular, porém, as áreas de necrose nestas lâminas foi encontrada com mais intensidade quando comparado com os outros padrões que foram analisados estatisticamente.

As reações se mostraram moderadamente marcadas para os dois casos de osteossarcoma de células gigantes, que apresentaram uma riqueza de variedades celulares e de intensidades da reação, cujas células bi ou multinucleadas mostraram intensa marcação a ausência da mesma, o que sugere que as células estão em fases do ciclo celular deferentes ou apresentando funções distintas, estando umas ativas e outras não ativas. Já no único caso de osteossarcoma teleangectásico que foi analisado, encontrou-se muita necrose e muitas marcações inespecíficas, apresentando muito fundo (background). Foi verificada a presença de muitas células gigantes nesta lâmina, além de um êmbolo metastático bem caracterizado com células neoplasicas reativas a Cox2 em sua luz.





Figuras 22 – (A e B) Osteossarcoma fibroblástico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Nota-se presença de célula gigante multinucleada (seta) entremeada em muitas células fusiformes imunomarcadas.



Figuras 23 – (A e B) Osteossarcoma combinado (misto). Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Este padrão histológico apresentou imunomarcação discreta como é mostrado em A, moderada, e moderada a intensa como se observa em B.

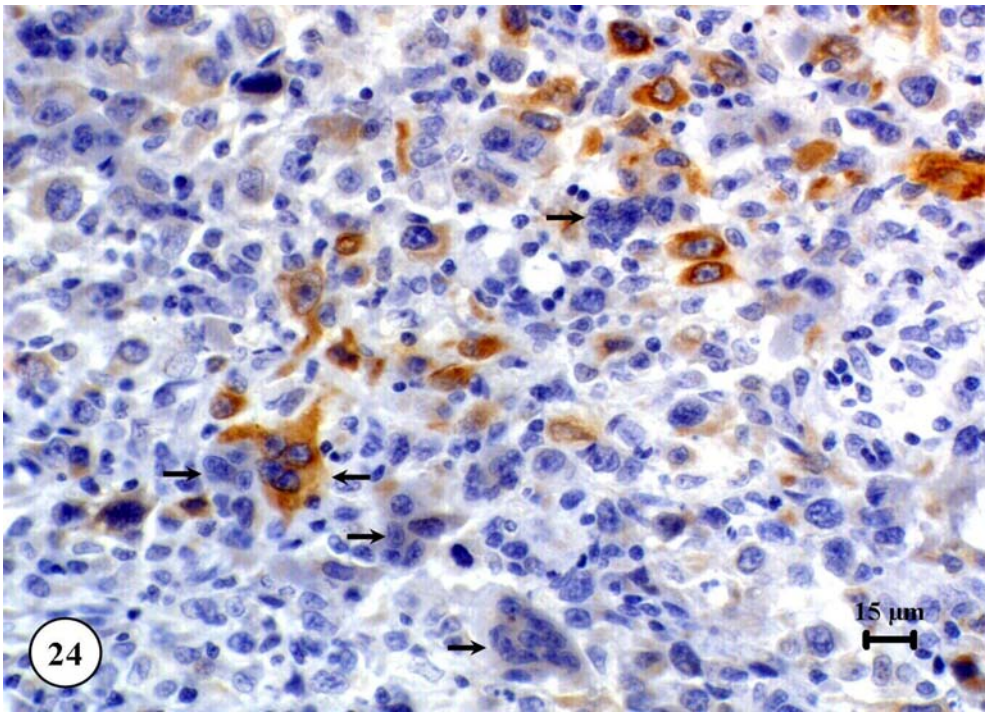


Figura 24 – Osteossarcoma de células gigantes. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 400X. Junto dos osteoblastos neoplásicos, observam-se células gigantes multinucleadas em diferentes intensidades de reação (setas)

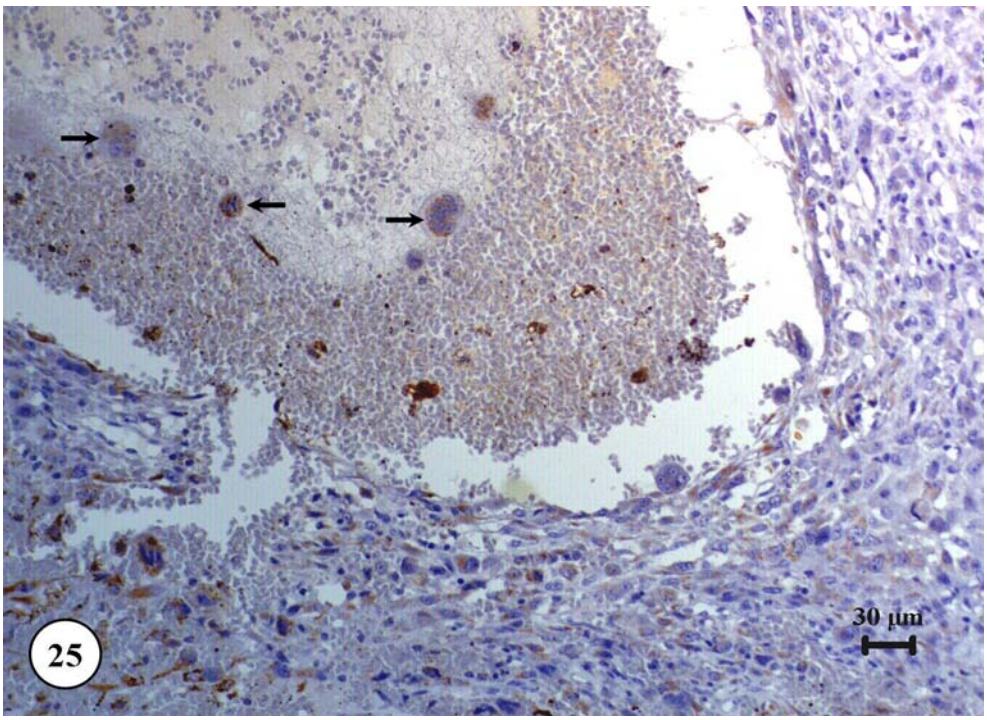


Figura 25 – Osteossarcoma teleangectásico. Imunoistoquímica mostra marcação positiva com a utilização do anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração com hematoxilina. 200X. Observa-se imunomarcação no tecido neoplásico do tumor e no embulo metastático (setas).

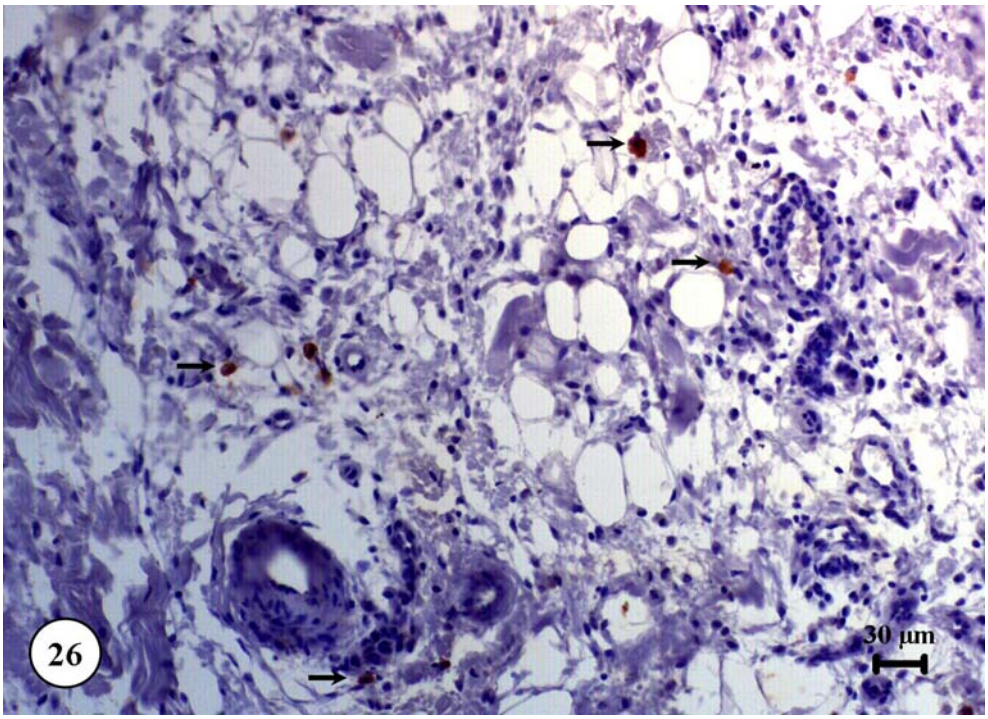


Figura 26 – Controle Positivo; utilizando-se osteossarcoma combinado (misto). Imunomarcação positiva das células inflamatórias pelo anticorpo primário anti-Cox2, DAB. Contra-coloração hematoxilina. 200X.

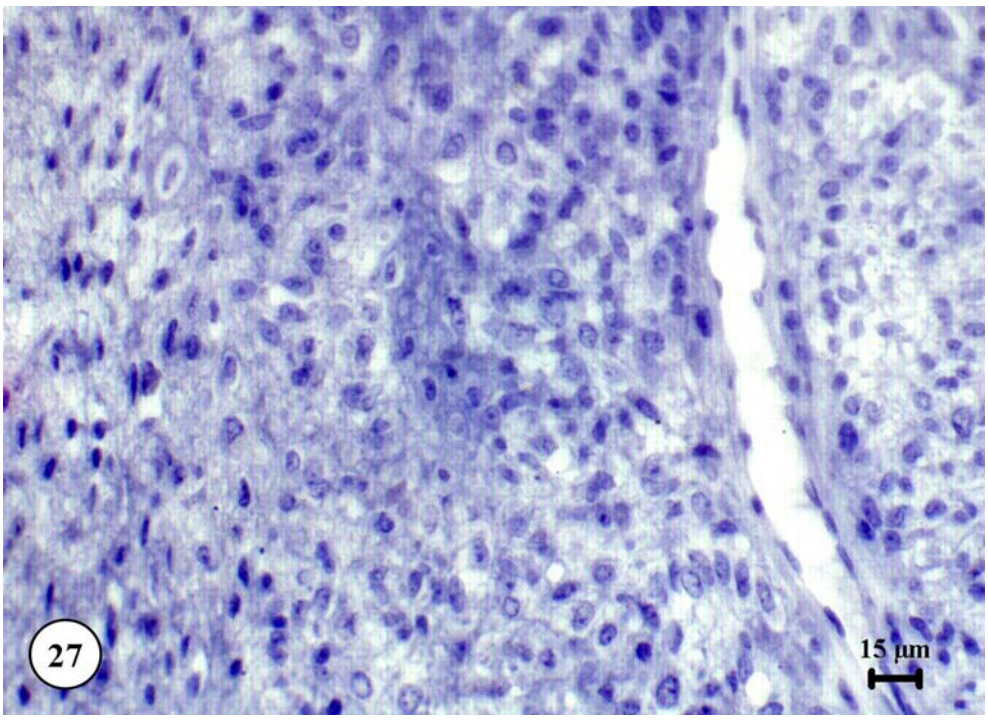


Figura 27 – Controle Negativo; utilizando-se osteossarcoma combinado (misto). Ausência de imunomarcação. Solução tampão TRIS, DAB. Contra-coloração hematoxilina. 400X.

5.6. Análise estatística

Observou-se correlação positiva (p<0,01) apenas na correlação entre as variáveis Cox2 e mitose, com as demais correlações não houve diferença cujo p>0,05 como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Correlações de Pearson entre as variáveis mitose, AgNOR e Cox2

Correlações de pearson					
Variáveis		Correspondências	T	Significância Encontrada	Significância Estatística
Cox2	mitose	0,5749	3,2956	0,0016	p < 0,01
Cox2	AgNOR	-0,0593	-02787	0,3915	p > 0,05
mitose	AgNOR	-0,1361	-0,6442	0,2630	p > 0,05
Correlação positiva (p<0,01) para as variáveis Cox2 e Mitose.					

5.6.1. Mitose

O número de figuras de mitose encontrado nos osteossarcomas analisados, não apresentaram diferença (p>0,05) entre os padrões histológicos analisados pelo teste do Qui-Quadrado .

5.6.2. AgNOR

Para os valores analisados com a técnica argirófila, foi encontrada diferença (p<0,05) entre os padrões histológicos para o osteossarcoma canino analisados.

5.6.3. Cox2

Houve diferença (p<0,05) entre os distintos padrões histológicos encontrados no osteossarcoma e suas respectivas intensidades de reação para a Cox2, usando-se para isto o teste Qui-Quadrado como mostra a Tabela 3.

Foi observada diferença (p<0,05) em 4 das 6 correlações executadas, encontrando (p<0,01) entre os OSA osteoblástico com condroblástico, osteoblástico com fibroblástico e fibroblástico com misto, e a outra com (p<0,05) para condroblástico com misto. Não houve diferença (p>0,05), para osteoblástico com misto e condroblástico com fibroblástico (Tabela 3).

Tabela 3 – Expressão da Cox2 segundo o padrão histológico

Padrão histológico	Casos		Total geral
	n	%	
Osteoblástico	1143	46,4 [a]	2461
Condroblástico	693	53,5 [b]	1296
Fibroblástico	556	56,7 [b]	981
Misto	528	48,3 [a, c]	1094

Houve diferença (p<0,05) entre os tratamentos pelo teste do Qui-Quadrado. [a, b, c] Letras sobrescritas diferentes indica diferença (p<0,05) pelo teste do Qui-Quadrado.

O teste do Qui-Quadrado foi executado em todos os casos positivos para a imunomarcação num mesmo padrão histológico e todos apresentaram diferenças (p<0,05) como mostram as tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4 – Expressão da Cox2 nos osteossarcomas osteoblásticos

Padrão histológico	Casos		Total geral
	Positivo(s)		
	n	%	
Osteoblástico 1	226	47,9 [a]	472
Osteoblástico 2	185	29,7 [b]	622
Osteoblástico 3	423	80,6 [c]	525
Osteoblástico 4	92	29,8 [d]	309
Osteoblástico 5	217	40,7 [b]	533

Houve diferença (p<0,05) entre os tratamentos pelo teste do Qui-Quadrado. [a, b, c, d] Letras sobrescritas diferentes indica diferença (p<0,05) pelo teste do Qui-Quadrado.

Tabela 5 - Expressão da Cox2 nos osteossarcomas condroblásticos

Padrão histológico	Casos		Total geral
	Positivo(s)		
	n	%	
Condroblástico 1	276	79,5 [a]	347
Condroblástico 2	184	69,4 [b]	265
Condroblástico 3	67	22,6 [c]	296
Condroblástico 4	166	42,8 [d]	388

Houve diferença (p<0,01) entre os tratamentos pelo teste do Qui-Quadrado. [a, b, c, d] Letras sobrescritas diferentes indica diferença (p<0,01) pelo teste do Qui-Quadrado.

Tabela 6 - Expressão da Cox2 nos osteossarcomas fibroblásticos

Padrão histológico	Casos		Total geral
	Positivo(s)		
	n	%	
Fibroblástico 1	105	23,9 a	439
Fibroblástico 2	451	83,2 b	542

Houve diferença ($p<0,01$) entre os tratamentos pelo teste do Qui-Quadrado. [a, b,] Letras sobrescritas diferentes indica diferença ($p<0,01$) pelo teste do Qui-Quadrado.

Tabela 7 - Expressão da Cox2 nos osteossarcomas mistos

Padrão histológico	Casos		Total geral
	Positivo(s)		
	n	%	
Misto 1	205	47,5 **a**	432
Misto 2	206	72,8 **b**	283
Misto 3	117	30,9 **c**	379

Houve diferença ($p<0,01$) entre os tratamentos pelo teste do Qui-Quadrado. [a, b,] Letras sobrescritas diferentes indica diferença ($p<0,01$) pelo teste do Qui-Quadrado.

Com os osteossarcomas de mesmo padrão histológico, apenas a interação entre os casos osteoblásticos (2) e (5) não apresentou diferença ($p>0,05$), já as demais interações apresentaram diferenças, sendo os casos osteoblásticos (1) e (5) com $p<0,05$ e as restantes com ($p<0,01$) Tabelas 4.

6. DISCUSSÃO

6.1. Estudo retrospectivo

6.1.2. Freqüências encontradas segundo as raças, peso, sexo, idades e localização anatômica

Os dados observados neste trabalho corroboram o que foi descrito por Liu (1996), Straw et al. (2001), Thompson & Pool (2002), em que cães de raças grande e gigantes são os mais afetados e estão sob maior risco de desenvolverem o tumor. A média de peso encontrada nos 78 animais analisados está um pouco acima do que foi descrito por Jongeward (1985), cuja média encontrada foi de 36,5kg e neste trabalho foi de 37,1kg. Isto demonstra, mais uma vez, que tumores esqueléticos estão mais em função do tamanho do que da raça do animal, sendo que cães acima desta média tiveram maior probabilidade de desenvolver o tumor ósseo quando comparados a cães de pequeno porte (Figura 3).

Esta maior incidência em cães de raças grandes e gigantes pode ser em virtude de pequenas microfraturas, as quais podem surgir durante a fase de crescimento rápido do esqueleto do animal, principalmente naqueles membros que suportam o maior peso corpóreo, razão pela qual o osteossarcoma com origem no esqueleto ocorre com maior incidência em relação ao OSA extra-esquelético (GOLDSCHIMIDT & THRALL, 1985; PALMER, 1992; STRAW et al., 2001; WITHROW, 2001; THOMPSON & POOL, 2002), fato também confirmado neste trabalho em que se encontraram 61 casos (78%) de OSA esquelético e 6 casos (8%) de origem extra-esquelética (Figura 6a).

Os membros apendiculares são os mais afetados, o que também foi verificado neste trabalho, já que tumores de origem no esqueleto apendicular foram 53 casos

(74%), e apenas 11 casos (15%) ocorreram no esqueleto axial. Diferente do relatado por Jongeward (1985), de que o esqueleto apendicular é acometido 2,3 vezes mais que o esqueleto axial, neste estudo foi encontrado um acometimento maior, 6,6 vezes mais incidente no esqueleto apendicular que no axial (Figura 6b). Cães jovens de porte grande ou gigantes, em geral por serem muito ativos, mais pesados, apresentar fechamento das placas epifisárias mais tardiamente em relação aos cães de pequeno porte e eventual ocorrência de micro-lesões nesses locais decorrentes de processos irritativos e/ou agressivos na fase juvenil, podem levar ao surgimento, na fase adulta, de uma neoformação óssea, e a partir deste fato desencadear todo o processo de desenvolvimento tumoral por motivos de predisposição genética ou baixa imunovigilância ou outro fator de indução de sinais mitogênicos que porventura venham superar os mecanismos normais de defesa do animal, linha de raciocínio também compartilhada por Goldschimidt & Thrall (1985), Jongeward (1985), Ru (1998) e Straw et al. (2001).

Os cães machos, em geral, são maiores, mais pesados e apresentam crescimento mais rápido, quando comparados às fêmeas. Este fato pode tentar justificar a maior incidência de machos acometidos pela neoplasia, além do provável envolvimento dos hormônios sexuais. A observação feita neste trabalho em relação a maior incidência de machos acometidos numa proporção de 1,8:1 está de acordo ao encontrado por Straw et al. (2001), quem encontrou uma proporção de 1,5:1. Esta maior incidência de cães machos foi também observada por Ling et al. (1974); Patnaik et al. (1984), Goldschmitdt & Thrall (1985), Spodnick et al. (1992), Kelsey et al. (1998), Ru et al. (1998), Kirpensteijn et al. (2002b), Thompson & Pool (2002) e Kleiner & Silva (2003). Além disto, também se constatou que os machos foram os mais afetados no esqueleto apendicular, confirmando o que foi descrito em relação aos locais de maior freqüência da neoplasia, achado semelhante foi encontrado por Spodnick et al (1992) e Kleiner & Silva (2003).

A média das idades dos animais acometidos pela neoplasia foi de 7,9 anos, muito próxima ao observado por Straw et al. (2001), cujo valor encontrado foi de 7,7 anos o que demonstra maior risco para animais nesta faixa etária. Este achado pode estar provavelmente relacionado à aproximação da senilidade, o que pode levar a queda das taxas metabólicas assim como a falha da imunovigilância, tornando-os mais predispostos ao surgimento de doenças e cânceres, como descrevem Weingberg (1996), Abbas et al. (2003), Gasparini et al. (2003) e Brasileiro Filho (2006). Foi encontrado

apenas um caso com idade muito jovem entre 0|-2 anos, relato também observado por Ling et al. (1974); Spodnick et al. (1992); Ru et al. (1998).

6.2. Observações microscópicas (HE)

6.2.1. Principais características histológicas encontradas

Dentre as características histológicas do osteossarcoma canino se constatou a presença de áreas de necrose em todos os tumores analisados, isto demonstra que o rápido crescimento proliferativo do OSA não foi acompanhado pelo aporte sanguíneo necessário para sua nutrição, mostrando sua agressividade e alta capacidade de crescimento. Invasão vascular e infiltração em tecidos adjacentes também foram encontradas nos casos analisados, reforçando mais uma vez a agressividade desta neoplasia. Achados semelhantes também foram descritos por Palmer (1992) e Thompson & Pool (2002).

A maior freqüência de OSA osteoblástico (53%) encontrado neste trabalho assemelha-se com os resultados achados por Patnaik (1990); Kirpensteijn et al. (2002b) e Thompson & Pool (2002), porém foi diferente do observado por Patnaik et al. (1984) que encontraram maior freqüência de OSA fibroblástico (41%) em cães (Figura 7).

6.3. Contagem de figuras de mitoses

Verificam-se nos diversos tipos de osteossarcomas os valores em ordem decrescente para os tipos osteoblásticos, condroblásticos, combinado e fibroblásticos, respectivamente (Figura 14). Sakai et al. (2002) consideram que os tumores mais agressivos são aqueles que mostram freqüência elevada de mitoses, entretanto, apesar dos valores observados para os diversos osteossarcomas analisados, não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$), corroborando apenas as observações de Thompson & Pool (2002) de que as figuras de mitose no osteossarcoma canino são muito freqüentes.

Segundo Abadie et al. (1999) a contagem de mitoses parece ser o método mais objetivo de se avaliar a proliferação celular, todavia, é importante ressaltar que a contagem de figuras mitóticas exclui as células em interfase, já que este período é o

mais longo do ciclo. Desta forma, pelo fato da mitose representar um ciclo de curta duração, este método não deve ser utilizado como o único parâmetro na avaliação da proliferação celular, sendo sempre contextualizado a outros achados clínicos e patológicos (RABENHORST et al., 1994).

Como o tempo de duplicação celular não está necessariamente correlacionado com a fração de crescimento e considerando que a duração da mitose nas células cancerosas é frequentemente prolongada, o número de figuras mitóticas em um corte histológico pode ser enganoso como indicador do crescimento global (RUBIN & FARBER, 2002).

Ainda, segundo Mitchell (2006) as mitoses em grande número refletem atividade proliferativa tumoral e são características de muitos tumores malignos, mas não constituem um critério necessário de malignidade (RUBIN & FARBER, 2002). O crescimento progressivo dos tumores e a taxa com que crescem são determinados pelo excesso de produção celular em relação à perda celular (MITCHELL, 2006).

6.4. Contagem e análise das AgNORs

Os valores de AgNOR apresentaram diferença ($p<0,05$) nas quatro classificações de OSA analisadas. Baseando-se nesta comparação histológica com os resultados da contagem de AgNOR foi possível a diferenciação das neoplasias mais agressivas das menos agressivas, ou seja, para esta análise o OSA osteoblástico é o mais agressivo das quatro classificações histológicas analisadas, sendo os mistos, fibroblásticos e condroblásticos os menos agressivos, respectivamente. Este resultado reforça o que já foi descrito sobre esta técnica, que tem sido usada com sucesso para diferenciar as neoplasias benignas das malignas (CROCKER et al., 1989; RÜSCHOFF et al., 1989; AUBELE et al., 1994). Valores de AgNOR com diferenças significativas também foram relatadas no osteossarcoma humano, sendo encontradas diferenças em diversos padrões histológicos, mostrando e diferenciando os tipos mais agressivos dos menos agressivos (SCHWINT et al., 1996; OKADA et al., 2000; KENSHI et al., 2003).

As NORs foram encontradas de diversas formas nos diferentes tipos de osteossarcoma, apresentando-se de tamanho pequeno e dispersas por todo o núcleo (Figura 16), caracterizando células altamente malignas de acordo com Crocker et al. (1989). Outras vezes formavam aglomerados (Figura 17) ou ainda agrupados formando o nucléolo (Figuras 18 e 19). Estas NORs proeminentes parecem indicar atividade de

transcrição aumentada, o que segundo Underwood & Giri, (1998) é devido a aumento da ploidia celular resultando numa maior quantidade de cromossomos que contêm NORs, pois de outro modo, elas não seriam facilmente identificadas.

Vários estudos têm utilizado a técnica de AgNORs em medicina veterinária para diversos tipos de tumores (DESTEXHE et al., 1995), porém, juntamente com ela são normalmente avaliados também outros marcadores de proliferação celular, como o PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas), o Ki-67 (ABADIE et al., 1999), e até mesmo o uso da citometria de fluxo (MOURAD et al., 1992). Neste trabalho, foi avaliado apenas a técnica de AgNOR e a contagem de mitose como indicadores de proliferação celular.

6.5. Imunoistoquímica

Este estudo se diferencia dos demais que contextualizam a expressão da Cox2 no osteossarcoma canino pelo fato de fazer uma análise de vários tipos de osteossarcomas, ou seja, compara as diferentes intensidades da reação nos tipos osteoblástico, condroblásticos, fibroblásticos e combinados. Todavia, neste trabalho se procura apresentar resultados que se somam ao que já vem sendo descrito na literatura por Mohammed et al. (2003); Mullins et al. (2004) e Wolfesberger et al. (2006) em relação à interação da Cox2 no osteossarcoma e sua associação com os mecanismos de promoção tumoral, proliferação e capacidade de invasão e metástase. Com isso, foram também avaliados em paralelo dois casos de osteossarcoma de células gigantes e um teleangectásico, porém, estas ocorrências não fizeram parte das análises estatísticas em virtude do pequeno número de casos encontrados no estudo (Figuras 20, 21, 22, 23, 24 e 25).

A expressão da Cox2 mostrou-se fortemente marcada independente do padrão celular tumoral, tanto em neoplasias bem diferenciadas como nas indiferenciadas. Este achado assemelha-se ao observado por Dore et al. (2003).

Sabe-se que o método imunistoquímico localiza antígenos nos tecidos, porém, correlacionar a intensidade das reações com a presença do antígeno pode não representar o melhor modelo em estudo, principalmente pelo fato de que as amostras provinham de diferentes laboratórios e foram coletadas em diferentes tempos, meses e até anos, antes de serem processadas para a análise imunoistoquímica. Ainda, deve-se considerar que as amostras podem ter recebido tratamentos diferentes, o que certamente

pode interferir na interação antígeno-anticorpo, mesmo que para isto haja recuperação antigênica. No caso do osteossarcoma, os fragmentos precisaram receber um tratamento ácido para que ocorresse descalcificação, com isso, alguns sítios antigênicos podem ter sofrido desnaturação maior ou menor em decorrência dos diferentes tempos deste procedimento. Assim, neste estudo, a contagem de células positivas foi mais indicada para análise da expressão da Cox2 do que a verificação da intensidade da reação (Tabela 1).

6.6. Osteossarcoma osteoblástico

Este padrão celular foi caracterizado por apresentar intensa produção de matriz óssea com células similares a osteoblastos pouco indiferenciados, apresentando certo grau de pleomorfismo e grande atividade celular. Em alguns destes tumores, as células encontravam-se de tamanho reduzido em relação aos demais casos observados, mostrando diferentes graus de diferenciação, com núcleos arredondados ou ovalados, com cromatina frouxa com um ou mais nucléolos proeminentes, podendo apresentar algumas células com dois a mais núcleos (Figura 8). Células gigantes multinucleadas foram observadas principalmente em áreas onde havia presença de osso neoformado ou trabéculas ósseas, de acordo ao descrito por Goldschimidt & Thrall (1985) e Thompson & Pool (2002). Também foram observados focos de necrose de tamanhos variáveis, mas não se constatou encapsulamento tumoral, apresentou um padrão infiltrativo com desorganização celular foi identificado, corroborando com Thompson & Pool (2002).

Segundo Mitchell (2006) a grande quantidade de mitoses encontradas num tumor reflete o seu índice proliferativo e são características de muitos tumores malignos, mas não constituem um critério necessário de malignidade (RUBIN & FARBER, 2002). O crescimento progressivo dos tumores e a taxa com que crescem são determinados pelo excesso de produção celular em relação à perda celular. Nos OSA osteoblásticos o índice mitótico encontrado foi variável, contudo, foi neste padrão histológico onde o número de figuras de mitose apresentou o maior valor (18,5), acima da média geral encontrada de 13,4 (Figura 14). Por estar acima da média geral e consequentemente apresenta maior taxa de crescimento celular em relação aos demais padrões histológicos analisados, existe concordância com observações de Sakai et al. (2002), Mitchel (2006). Segundo esses autores, esta característica parece estar

relacionada com a malignidade e crescimento infiltrativo do tumor, sendo que aqueles mais agressivos apresentam maior freqüência de mitose.

As características microscópicas apresentadas pelas NORs (Figura 16), nesta classificação histológica, associadas ao maior índice mitótico que foi constatado confirma mais uma vez que este tumor foi o mais agressivo, concordando com Crocker et al. (1989).

A expressão da Cox2 nos casos de osteossarcoma osteoblástico foi facilmente identificada em cinco dos seis casos analisados (Tabela 1), mesmo nas fracamente marcadas. Esta classificação foi a que apresentou maior variação de intensidade de reação entre os padrões histológicos analisados e também onde se constatou diferentes intensidades de expressão num mesmo corte, ou seja, dependendo da área analisada, a intensidade poderia ser fraca ou forte. Em alguns casos verificaram-se regiões sem nenhuma marcação, e em outro campo próximo a reação era positiva. Resultados semelhantes foram encontrados por McEntee et al. (2002) no câncer colorretal em cães, o que segundo esses autores seria decorrente da ação parácrina da Cox2 sobre as células vizinhas.

Com relação ao observado, parece que há correlação entre a maior expressão da Cox2 e a progressão da agressividade sugerida por Thompson & Pool (2002) no OSA canino. Desta forma, o OSA osteoblástico foi o mais agressivo e o que apresentou maior número de casos imunorreativos, assim como maior número de células positivas para a Cox2 o que confirma as observações de Mullins et al. (2004) quando afirma que nas formas mais agressivas desta doença é onde se constata maior imunomarcação.

Esses resultados estão de acordo com o que foi encontrado na literatura consultada. A que a Cox2 é uma enzima responsável pelo desenvolvimento e progressão dos tumores, pela ativação e indução de diversos mecanismos como: liberação de fatores de crescimento EGF, VEGF, FGF, ativação de MMP2 e MMP9. Todas estas citocinas induziriam aumento da expressão de TGFα que associado com o aumento na expressão dos receptores de EGF desencadearia sinalizadores mitogênicos (CROFFORD, 1997; VADLAMUDI et al., 1999; BAKHLE, 2001; MCENTEE et al., 2002; MOHAMMED et al., 2002; ARAKI et al., 2003; DORÉ et al., 2003; GASPARINI et al., 2003; MOHAMMED et al., 2004; WANG & DUBOIS, 2004).

Com isso, alguns estudos retrospectivos em diversos tipos de cânceres mostram que existe uma relação significativa entre a alta expressão da Cox2 e a sobrevida de pacientes humanos com câncer de mama, colorretal, gástrico e de pulmão (KOKI et al., 2001).

6.7. Osteossarcoma condroblástico

As características histológicas desta neoplasia estão de acordo com as descritas por Goldschimidt & Thrall (1985), Palmer (1992) e Thompson & Pool (2002), em cujo padrão histológico há produção moderada de matriz óssea a partir de um predomínio de tecido cartilaginoso maligno, infiltrativo, minimamente delimitado e não encapsulado (Figura 9). Células gigantes foram pouco encontradas, e a média do número de mitoses foi de 13,1 sendo pouco menor que a média geral (13,4) e menor quando comparado ao OSA osteoblástico.

Nesta classificação as NORs foram encontradas formando aglomerados (Figura 17) e apresentaram os menores valores 16,7% (Figura 15) em relação aos demais padrões histológicos analisados. De acordo com o descrito por Crocker et al. (1989) e Rüschoff et al. (1989) a respeito do número de AgNOR encontrado, o OSA condroblástico foi o que apresentou menor capacidade proliferativa em relação às demais classificações e consequentemente um menor potencial malígno, confirmando o que foi sugerido por Underwood & Giri (1998), de que a quantidade e o padrão de AgNORs são bons indicadores da atividade proliferativa das células neoplásicas.

Na análise imunoistoquímica, dos quatro casos positivos dos seis analisados para o tipo condroblásticos (Tabela 1), dois casos apresentaram-se fortemente marcados, um com marcação moderada e outro fracamente marcado. Foi constatado que em algumas ocorrências o tecido cartilaginoso maligno ora se apresentava bem marcado, ora sem nenhuma marcação, obedecendo ao que fora descrito por McEveen et al. (2002) em relação as diferentes intensidades de Cox2 encontradas numa mesma lâmina analisada no câncer colorretal em cães.

Este padrão histológico foi o que apresentou o segundo maior valor de casos imunomarcados e o segundo maior número de células positivas para a Cox2 (Tabela 1), Para a contagem de figuras mitóticas também foi o onde se observou o segundo maior valor (Figura 14), porém, foi o que apresentou a menor contagem de NORs, mostrando que apesar da malignidade sugerida pela literatura consultada a partir da expressão de Cox2 (TSUJII & DUBOIS, 1995; CROFFORD, 1997; DEMPKE, 2001; CAO & PRESCOTT, 2002; MOHAMMED et al, 2002; GASPARINI et al., 2003; MOHAMMED et al, 2004; WANG & DUBOIS, 2004; WOLFESBERGER et al., 2006) e o número de mitose (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002; RUBIN & FARBER, 2002; MITCHELL, 2006), o número de NORs encontrado neste padrão histológico indica menor índice de proliferação celular (CROCKER & NAR, 1987; CROCKER et

al., 1989; SHIRO et al., 1992; DESTEXHE et al., 1995; UNDERWOOD & GIRI, 1998) em relação aos demais padrões analisados. Este fato pode indicar que apesar da malignidade sugerida pelos valores encontrados na imunoistoquímica e na contagem de figuras mitóticas, o menor valor de AgNOR indica que o seu índice proliferativo é menor que os demais padrões histológicos analisados, não se podendo negar o seu potencial de agressividade. Por outro lado, em decorrência da falta de dados sobre aspectos clínicos relacionados ao surgimento e desenvolvimento do tumor, fica impossível saber como foi o seu comportamento clínico.

6.8. Osteossarcoma fibroblástico

Este tumor apresentou células com pleomorfismo acentuado, pouca produção de matriz óssea, possuindo um padrão sólido não encapsulado e pouco delimitado, embora infiltrativo. Poucas áreas de necrose foram encontradas (Figura 10), concordando com o que descreveu Thompson & Pool (2002).

O índice mitótico foi de 10,7 sendo o menor de todos os padrões analisados. Já as NORs tiveram uma contagem de 23,6 (Figura 18), sendo a terceira maior contagem.

Nos OSA fibroblásticos, para os dois casos positivos dos seis analisados (Tabela 1), a imunomarcação foi diferente, sendo que naquele que mostrava uma maior diferenciação, isto é, células semelhantes a fibroblastos a intensidade da reação foi maior, enquanto que no outro caso analisado cujas células eram menos diferenciadas a reação foi mais fraca (Figura 22), concordando com Gasparini et al. (2003) enquanto que tumores moderadamente diferenciados a expressão da Cox2 é alta. Ainda, no primeiro caso, em uma área limítrofe do tumor foi encontrado um feixe fortemente marcado que se estendia por quase toda a extensão do corte, sugerindo que a maior intensidade de expressão da Cox2 ocorreria em área de crescimento ou expansão tumoral.

Ao se relacionar os parâmetros que foram avaliados é possível inferir que este padrão histológico é o menos agressivo dos que foram analisados neste trabalho, uma vez que mostrou menor índice de figuras mitóticas e apenas dois casos foram positivos para Cox2, confirmando-se com a contagem de NORs que ele é um tumor menos proliferativo que o osteoblástico e condroblástico. Ainda, segundo Thompson & Pool (2002) e Palmer (1992), a agressividade desta neoplasia é a menor em relação aos demais padrões histológicos de osteossarcoma.

6.9. Osteossarcoma combinado ou misto

A característica mais importante observada neste tumor foi a ausência de predomínio de um determinado padrão celular, sendo que os tipos celulares mais encontrados foram osteoblástico, condroblásticos e fibroblásticos (Figura 13), os quais são também descritos por Thompson & Pool (2002).

As figuras de mitose tiveram o valor de 11,3 abaixo da média que foi de 13,4. Para este tumor os AgNOR foram encontrados formando aglomerados ou ainda agrupados formando o nucléolo (Figura 19) a semelhança do que foi observado no tipo fibroblástico. A contagem de NOR foi o segundo maior valor 26,9% indicando uma grande capacidade proliferativa.

A imunomarcação positiva para Cox2 foi encontrada em três casos (Tabela 1), mostrando-se intensa, moderada e fracamente positiva em cada um deles. Também foram encontradas áreas de necrose, porém, quando comparado aos outros 3 padrões que foram analisados havia maior número de focos. Com esta observação pode-se sugerir que os mecanismos angiogênicos deste tipo tumoral não acompanharam a rápida proliferação celular em algumas áreas de crescimento, levando a necrose pelo menor aporte sanguíneo ou mesmo isquemia e anoxia, estes fenômenos estão de acordo com o que é descrito por Cotran et al. (2000), Cullen (2002), Brasileiro Filho (2006) e Michell (2006).

Perante os dados encontrados, este padrão histológico dentre os demais analisados possui uma agressividade intermediária, com metade dos casos positivos para Cox2, tendo o segundo maior valor de NOR, o que indica sua atividade proliferativa e índice de mitose menos intenso, superior apenas ao padrão fibroblástico, apesar de que índice mitótico não constitui um critério necessário para classificação de agressividade tumoral (Mitchell, 2006).

Para os dois casos de osteossarcoma de células gigantes analisados pelo método imunoistoquímico (Figura 24), as reações se mostraram moderadamente marcadas, com intensidades variáveis. As células bi ou multinucleadas mostraram imunomarcação de forma intensa com áreas apresentando ausência da mesma, o que sugere que as células estariam apresentando funções distintas, estando umas ativas e outras não ativas. Já no único caso de osteossarcoma teleangectásico que foi analisado pelo método imunoistoquímico, encontrou-se muita necrose e muitas marcações inespecíficas. Foi verificada a presença de muitas células gigantes neste tipo tumoral, além da presença de

um êmbolo metastático bem caracterizado com células neoplásicas reativas a Cox2, (Figura 25), resultado semelhante foi observado por Mullins et al. (2004) de que fortes expressões de Cox2 tendem a ocorrer em lesões metastáticas de osteossarcoma humano.

Desta forma, como já verificado por Mullins et al. (2004) a maioria dos tumores em cães tem pouca ou moderada marcação, similar ao encontrado em tumores primários em humanos. Sugere-se em decorrência destes achados que haja certo estímulo parácrino entre as células vizinhas para que a expressão da enzima seja feita a partir de uma excitação externa inicial e depois as células adjacentes passam também a expressar a Cox2 e assim sucessivamente, observação e sugestão semelhante foram feitas por McEntee et al. (2002) no câncer colorretal em cães.

Nos casos em que houve presença de produção de osso maligno no tecido neoplásico, esta estrutura neoformada não foi reativa em nenhum dos casos para a Cox2, embora a produção de PGE_2 a partir da liberação de vários fatores de crescimento pelas células ósseas normais seja um mecanismo fisiológico presente neste tipo de tecido e também pelo fato de que altas concentrações desta protaglandina promova a reabsorção óssea como é descrito por Palmer (1992).

As áreas de necrose foram marcadas muito possivelmente em virtude da degradação da membrana e de outras estruturas que catalisam o ácido araquidônico em diferentes prostaglandinas tornando a imunomarcação possível, áreas próximas de necrose foram também encontradas imunomarcações positivas por Mullins et al. (2004), em gliomas, carcinomas hepatocelular, câncer cervical e osteossarcoma em humanos.

As contagens de figuras de mitoses foram observadas com maior facilidade e em maior número nos casos com imunomarcação positiva, inclusive os campos onde a reação estava mais intensa, as figuras de mitoses foram mais facilmente encontradas, estando de acordo com os mecanismos de indução mitogênica promovidos pela Cox2 descritos por Crofford (1997); Vadlamudi et al. (1999); Mohammed et al. (2002); Gasparini et al. (2003) e Mohammed et al. (2004).

As altas concentrações da enzima Cox2 em diversos tecidos neoplásicos, tem sido questionada em relação à proteção que ela daria as células tumorais numa condição de hipóxia, evitando a apoptose destas células ou ainda indicando uma área de inflamação (MULLINS et al., 2004). Este mecanismo foi observado por Crofford (1997) verificando a alta estabilidade apresentada pelas células neoplásicas de câncer colorretal que indicavam altas concentrações de Cox2 e também elevada expressão dos níveis de Bcl-2 que é um potente anti apoptótico. Somando-se a estes achados, foi ainda observado que estas células mostraram-se níveis aumentados de adesão de sua matriz

extra celular e reduzidos níveis de TGFβ, consequentemente, menor quimiotaxia de polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos nestes locais com alta expressão de Cox2, assim como diminuição da inibição das MMPs (Mitchell, 2006).

Pouco estudo sobre a ação da Cox-2 no osteossarcoma canino tem se encontrado até o presente momento, porém, algumas pesquisas mostram os efeitos inibitórios da proliferação celular com o uso de antiinflamatórios não esteroidais nesta neoplasia (WOLFESBERGER et al., 2006). Em virtude deste fato, existe a expectativa do uso de inibidores seletivos da Cox2 para o tratamento do osteossarcoma canino, podendo ser introduzido na terapêutica de rotina como uma nova abordagem de tratamento.

Neste trabalho, como demonstram as tabelas 3, 4, 5, 6 e 7, a expressão da Cox2 nos diferentes padrões histológicos e até mesmo os casos pertencentes ao mesmo padrão osteossarcomatoso, apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$), confirmando a grande variedade de expressões da Cox2 como é observado em diversos outros tipos de tumores malignos como relata Koki et al. (2001); Gasparini et al. (2003); Mohammed et al. (2003); Mullins et al. (2004) e Wolfesberger et al. (2006).

6.10. Limitações encontradas no trabalho

Primeiramente diz respeito ao número reduzido casos de osteossarcoma das subclassificações de células gigantes (3 casos), teleangectásico (3 casos), e pobremente diferenciado (nenhum caso), por este fato não foram feitas as análises da expressão de Cox2, AgNOR e contagem de figuras mitóticas nestes osteossarcomas. Desta forma, não foram feitas as correlações entre todos os padrões celulares conhecidos destas neoplasias.

Outro fator limitante, por se tratar de 2 Universidades diferentes, refere-se a não padronização dos processos de fixação, descalcificação, inclusão, diafanização, assim como o uso de diferentes tipos de parafinas, descalcificadores, Xilol, dentre outros e ainda temperatura de estufa, banho-maria e diversos outros fatores que poderiam descaracterizar de alguma forma o tecido neoplásico e os epítopos para a Cox2, causando assim uma desuniformidade no material em estudo, porém, pouco se poderia fazer em se tratando de material de arquivo.

Neste mesmo sentido, o processo de descalcificação das amostras dos tecidos poderiam proporcionar certa alteração nesta imunoreatividade e desnaturação dos epítopos para a Cox2 ou ainda, o desmascaramento antigênico poderia ser prejudicado

por este fato e não ocorrer da forma mais adequada, resultando numa reação menos intensa ou mais intensa. O que certamente ocorreu neste trabalho é que, nestas 78 amostras, nem todas sofreram descalcificação e as que passaram por este procedimento não tiveram os mesmos tempos em solução descalcificante.

E sobretudo, o número de animais que poderiam estar sendo tratados com o uso de anti-inflamatórios no momento da coleta do material para o exame histopatológico é desconhecido, o que de certa forma alteraria a expressão da enzima cicloxigenase-2 nestes tecidos neoplásicos, apesar de Mullins et al. (2004) declararem que em seu trabalho a expressão da Cox2 foi positiva em alguns animais tratados com anti-inflamatórios não esteroidais.

6. CONCLUSÕES

Em virtude dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

1. O OSA osteoblástico foi a neoplasia mais frequentemente encontrada, presente em 53% dos casos analisados.

2. Cães machos de grande porte foram os mais afetados pelo OSA canino.

3. Dos quatros padrões histológicos analisados, o OSA osteoblástico foi o que se apresentou mais agressivo por ter apresentado os maiores índices nas contagens de figuras mitóticas, AgNORs e expressão da Cox2.

4. Houve diferença ($p<0,05$) da expressão da Cox2 nos quatro padrões histológicos analisados e também dentro de um mesmo tipo de tumor.

5. Houve diferença ($p<0,05$) entre as contagens de NORs para os quatro padrões histológicos analisados.

6. Não houve diferença ($p>0,05$) na contagem de figuras mitóticas para os quatro padrões histológicos analisados.

7. Houve correlação positiva ($p<0,05$) entre a expressão de Cox2 e a contagem das figuras de mitose nos diferentes tipos de osteossarcomas.

8. Não houve correlação positiva ($p>0,05$) entre Cox2 e AgNORs, e entre AgNORs e contagem de figuras mitóticas nos diferentes padrões histológicos osteossarcomatosos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª ed. Revinter, p.115-121, 2003.

ABADIE, J.J.; AMARDEILH, M.A.; DELVERDIER, M.E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, n.11, p.1629-1634, 1999.

ADAM, J. K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Immune responses in cancer. **Pharmacology & Therapeutics,** v.99, p.113-132, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 4ª ed, Porto Alegre: Artes médicas, 2004. p.1313-1362.

AMSTALDEN, E.M.I. **Metástases ósseas abordagem diagnóstica.** In: Congresso Brasileiro de Patologia. 24, 2003, Cd-Rom. Tumores ósseos.

ARAKI, N.; UCHIDA, A., KIMURA, T.; YOSHIKAWA, H.; AOKI, Y.; UEDA, T.; TAKAI, S-I.; MIKI, T.; ONO, K. Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcoma and other bone and soft tissue tumors. **Clinical Orthopaedics and Related Research,** v.207, p.271-277, 1991.

ARAKI, Y.; OKAMURA, S.; HUSSAIN, S.P.; NAGASHIMA, M.; HE, P.; SHISEKI, M.; MIURA, K.; HARRIS, C.C. Regulation of ciclooxygenase-2 expression by the Wnt and Ras pathways. **Cancer Research,** v.63, p.728-734, 2003

AUBELE, M.; BIESTERFIELD, S.; DERENZINI, M.; HUFNAGL, P.; MARTIN, H.; ÖFNER, D.; PLOTON, D.; RÜSCHOFF, J. Guideline of AgNOR quantitation. **Zentralblat für Pathologie,** v.140, n.1, p.107-108, 1994.

BACCHI, C.E.; GROWN, A.M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v.26, p.677-687, 1993.

BAKHLE, Y.S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. **British Journal of Pharmacology,** v.134, p.1137–1150, 2001.

BALKWILL, F.; MONTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**. v. 357, n. 17, p.539-345, 2001.

BARDET, J.F.; WEISBROD, S. & DE HOFF, W.D. Extraskeletal Osteosarcomas: Literature Review and a Case Presentation. **Journal of the American Animal Hospital Association,** v.19, p.601-604, 1983.

BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. **Life Sciences**, v.74, n.23, p.2827-2837, 2004.

BENNETT, A. CHARLIER, E.M.; MCDONALD, A.M.; SIMPSON, J.S.; STAMFORD, I.F.; ZEBRO, T. Prostaglandins and breast cancer. **Lancet,** v.2, p.624-626, 1977.

BERG, R.J.; STRAW, R.C. Cirurgia Para os Tumores Ósseos Primários, com Preservação do Membro. In: Bojrab, W.J. **Mecanismos das moléstias na cirurgia de pequenos animais.** São Paulo: Manole. 4.ed. 1996. p.1086-1092.

BOGLIOLO, L.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Transtornos do crescimento e da diferenciação celular II. Neoplasias (Tumores). In: LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P; TAFURI, W.L. **Bogliolo Patologia.** 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.180-205.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: **Patologia Geral**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p.148-192.

BRASILEIRO FILHO, G.; Sistema ósteo-articular. In: **Bogliolo Patologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. p.979-1035.

VIDAL, B.C.; PLANDING, W.; MELLO, M.L.S.; SCHENCK, U. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high resolution image cytometry, Anal Cell Pathology, v.7, p.27-41, 1994.

CAO, T.; PRESCOTT, S.M. Many actions of ciclooxigenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cellular Physiology,** v.190, p.279-286, 2002.

CASSALI, G.D. **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. Belo Horizonte, 2000. 73p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.233-293.

COUTO, C.G. Oncologia. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais.** 2ªed. Porto Alegre: ArtMed, 2001. p.857-908.

CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. **Journal of Pathology,** v.158, n.3, p.185-188. 1989.

CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **Journal of Pathology**, v. 151, p.111-118, 1987.

CROFFORD, L.J. Cox-1 and cox-2 tissue expression: Implications and Predictions, **Journal of Rheumatology**, v.24, p.15-19, 1997.

CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. Tumors of bones. In: MELTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals.** 4th ed. EUA: Iowa State Press, 2002. p. 3-44.

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

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H-J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,** v.127, n.7, p.411-417, 2001.

DENG, C-X.; BRODIE, S.G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology,** v.11, n.5, p.387-394, 2001.

DERENZINI, M.; TRERÈ, D. AgNOR proteins as a parameter of rapidity of cell proliferation. **Zentralblatt für Pathologie,** v.140, n.1, p.7-10. 1994.

DESTEXHE, E.; VANMANSHOVEN, P.; COIGNOUL. F. Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analisis in canine mammary tumors. **American Journal Veterinary Reseach,** v.56, n.2, p.185-187, 1995.

DOIGE, C. E.; WEISBRODE, S. E. Doenças dos ossos e das articulações. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p. 448-485.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology.** v.40, p.207-212, 2003.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB Journal**, v.12, p.1063-1073, 1998.

FONSECA, C.S.; DALECK, C.R.; REPETTI, L. Terapias Sistêmicas em Oncologia Vetrinária. **Nosso Clínico,** v.30, p.28-38, 2002.

FOX, L.E.; KING, R.R.; MAYS, M.C.; ACKERMAN, N.; COOLEY, A.J.; MEYERS, D. & BOLON, B. Primary Pulmonary Osteosarcoma in a Dog. **Journal Small Animal Practice,** 35:329-332, 1994.

GARZOTTO, C.K.; BERG, J.; HOFFMANN, W.E.; RAND, W.M. Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Activity in Canine Appendicular Osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v.4, p.587-592, 2000.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. Inhibitors of cyclo-oxigenase 2: a new class of anticancer agents? **The Lancet Oncology**, v.4, p.605-615, 2003.

GINEL, P.J.; NOVALES, M.; MOLLEDA, J.M.; PEREZ, J.; MOZOS, E. Mandibular fibroblastic osteosarcoma in a three-month-old dog. **The Veterinary Record,** v. 139, n. 5, p. 120-121, 1996.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Immunology**. 2000, 4ª ed, W. H. Freeman and Company: New York-USA.

GOLDSCHMIDT, M. H.; THRALL, D. E. **Malignant Bone Tumors in the Dog**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 1985. Disponível em: http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_74/74mast.asp#osteosarcoma. Acesso em: 31 de maio de 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. W. B. Saunders Company, 1997, 9ª ed, p.27-38(a).

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. W. B. Saunders Company, 1997, 9ª ed, p.847-857(b).

HAMMER, A.S.; WEEREN, F.R.; PADGETT, S.L. Prognostic Factors in Dogs with Osteosarcomas of the Flat or Irregular Bones. **Journal of the American Animal Hospital Association,** v.31, n.4, p.321-326, 1995.

HARMELIN, A.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. Correlation of Ag-NOR protein measurements with prognosis in canine transmissibile veneral tumor. **Journal of Comparative Pathology**, v.112, n.4, p.429-433. 1995.

HARNDEN D.G.; MCGEE, J.O'D. Neoplasia. In: MCGEE, J.O'D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. **Oxford Textbook of Pathology**. Oxford University Press, v. 1, p. 571-717, 1992.

HEYMAN, S.J.; DIEFENDERFER, D.L.; GOLDSCHMIDT, M.H.; NEWTON, C.D.Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986-1989). **Veterinary Surgical,** v.21, p.304-310, 1992.

JANIK, P., BERTRAM, J.S., SZANIAWSKA, B. Modulation of lung tumor colony formation by a subcutaneous growing tumor. **Journal of the National Cancer Institute**, v.66, n.6, p.1155-1158, 1981.

JONES, T.C. Neoplasias Induzidas por Parasitos. In: Jones, C.J.; Hunt, R.D.; King, N.W. **Patologia Veterinária**, São Paullo: Manole, 6ª. ed, 2000. p.116.

JONGEWARD, S.J. Primary Bone Tumors. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.15, n.3, p.609-637, 1985.

JOHNSON, K.A.; WATSON, A.D.J.; PAGE, R.L. Afecções esqueléticas. In: Ettinger, J S.; Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** 1ª ed, Philadelphia: WB Saunders, 1997. p.2867-2900.

JORD, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. **Genética Médica**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.197-212.

JUNG, T.T.; BERLINGER, N.T.; JUHN, S.K. Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study. **Laryngoscope.** v.3, p.307-312, 1985.

KANEMATSU, E.; MATSUI, H.; DEGUSHI, T.; YAMAMOTO, O.; KONEMATSU, M.; KOBAYASHI, A.; NEZASA, S.A. YAMAMOTO, N.; TAKEUSHI, T.; TANAKA, T.; KAWADA, Y. Significance of AgNOR counts for distinguishing carcinoma from adenoma and hiperplasia in parathyroid gland, **Human Pathology**, v.28, p.421-427, 1997.

KAPPEL, C.; VELEZ-YANGUAS, M.C.; HIRSCHFELD, S.; HELMAN, L.J. Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor I for in vitro growth. **Cancer Research**, v.54, p. 2803-2807, 1994.

KELSEY, J. L.; MOORE, A. S.; GLICKMAN, L. T. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. **Epidemiologic Reviews,** v. 20, n.2, p.204-217, 1998.

KENSHI, S.; TAKETSUGU,F.; TERUKI, K.; TATSUHIKO, M.; HARUYASU, Y. Proliferative activity of osteosarcoma cells: comparison of osteoblastic and nonosteoblastic regions. **Journal of Orthopaedic Science,** v.8, n.5, p.678-682, 2003.

KIRPENSTEIJN, J.; SPRANG, E.P.M.; VAN GARDERAN, E.; RUTTEMAN, G.R.; LANTINGA,-VAN LEEUWEN, I.S.; MOL, J.A. Growth hormone gene expression in the canine normal bone and osteosarcoma. **Veterinary Surgery,** v.28, p.396, 1999.

KIRPENSTEIJN, J.; TIMMERMANS-SPRANG, E.P.M.; GARDEREN, E.V.; RUTTEMAN, G.R.; LEEUWEN, I.S.L-V.; MOL, J.A. Growth hormone gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. **Molecular and Celular Endocrinology,** v. 197, p. 179-185, 2002(a).

KIRPENSTEIJN, J.; KIK, M.; RUTTEMAN, G.R.; TESKE, E. Prognostic significance of a new histologic granding system for canine osteosarcoma. **Veterinary Pathology,** v. 39, n. 2, p. 240-246, 2002(b).

KLEINER, J.A.; SILVA, E.G. Tumores Ósseos em Pequenos Animais. **MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.1, n.3, p.193-200, 2003.

KOKI, A.T.; MASFERRER, J.L. Celecoxib: a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. **Cancer Control**, v.4, p.28-35, 2002.

LANGEBANBACH, A.; ANDERSON, M.A.; DAMBACH, D.M.; SORENMO, K.U.; SHOFER, F.D. Extraskeletal osteosarcoma in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association,** v.34, p.113-120, 1998.

LARONE, D.; DELPRAT, C. Quimioterapia Anticancerígena. 1ª ed, **Editora Roca**, 2004. p.79-123.

LARUE, S.M.; WITHORW, S.J.; WRIGLEY, R.H. Radiographic bone surveys in the evaluation of primary bone tumors in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association,** v.188, n.5, p.514-516, 1986.

LING, G. V.; MOORGAN, J. P.; POOL, R. R. Primary bone tumors in the dog: A combine clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v.165, n.1, p.55-67, 1974.

LIU, S. Tumores ósseos e cartilaginosos. In: Bojrab, W.J. **Mecanismos das moléstias na cirurgia de pequenos animais.** São Paulo. Manole. 4.ed, 1996. p.1037-1092.

LOUKOPOULOS, P.; O'BRIEN, T.; GHODDUSI, M.; MUNGALL, B.A.; ROBINSON, W.F. Characterisation of novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Research in Veterinary Science,** v.77, p.131-141. 2004.

LOURO, I.D. Oncogenética. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n.11, p.36-42, 2000.

MAHAFFEY, E. A.; GREENE, E. Hemotorax associated with telangiectatic osteosarcoma in dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 187, n. 3, p. 270-272, 1985.

MARCHANT, J. animal model for tumors of the female genital tract. In: KURMAN, R.J. **Blaustein's pathology of female genital tract**, 3ª ed. New York: Springer-Verlag, 1987. p.899-924.

MCENTEE, M.F.; CATES, J.M.; NEILSEN, N. Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. **Veterinary Pathology,** v.39, p.428-436, 2002.

MENDOZA, S.; KONISHI, T.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J.; MILLER, C.W. Status of the p53, Rb and Mdm2 genes in canine osteosarcoma. **Anticancer Research,** v.18, p.4449-4454, 1998.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Neoplasia. In: **Robbins Cotran - Fundamentos de Patologia**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.153-186.

MOHAMMED, S.I.; BENNETT, P.F.; CRAIG, B.A.; GLICKMAN, N.W.; MUTSAERS, A.J.; SNYDER, P.W.; WIDMER, W.R.; DEGORTARI, A.E.; BONNEY, P.L.; KNAPP, D.W. Effects of the Cyclooxygenase Inhibitor, Piroxicam, on Tumor Response, Apoptosis, and Angiogenesis in a Canine Model of Human Invasive Urinary Bladder Cancer. **Cancer Research,** v.62, p.356-358, 2002.

MOHAMMED, S.I.; KHAN, K.N.M.; SELLERS, R.S.; HAYEK, M.G.; DeNICOLA, D.B.; WU, L.; BONNEY, P.L.; KNAPP, D.W. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 naturally-occuring canine cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.70, p.479-483, 2004.

MORGAN, J.P.; LEIGHTON, R.L. **Radiology of Small Animal Fracture Management.** Saunders Company : Philadelphia, cap.1, p.1-5, 1995.

MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M.K.; OTTO, J.C.; HORI, T.; DEWITT, D.L.; SMITH, W.L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and –2. **Journal of Biological Chemistry,** v.270, n.18, p.10902-10908, 1995.

MOURAD, W.A.; ERKMAN-BALIS, B.; LIVINGSTON, S.; SHOUKRI, M.; COX, C.E.; NICOSIA, S.V.; ROWLANDS, D.T.JR. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology, and lymph node status. **Cancer,** v.69, n.7, p.1739-1744, 1992.

MULLINS, M.N.; LANA, S.E.; DERNELL, W.S.; OGILVIE, G.K.; WITHROW, S.J; EHRHANT, E.J. Ciclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.859-865, 2004.

OKADA, K.; NISHIDA, J.; MORITA, T.; KAKIZAKI, H.; ISHIKAWA, A.; HOTTA, T. Low-grade intraosseous osteosarcoma in northern Japan: advantage of AgNOR and MIB-1 staining in differential diagnosis. **Human pathology,** v.31, n.6, p.633-639, 2000.

OLIVEIRA, A.P.A. **Potencial metastático e reconhecimento da E-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich.** Viçosa, 2005. 65p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa.

OSHIMA, C.T.F.; FORONES, N.M. AgNOR em câncer gástrico. **Arquivos de Gastroenterologia,** v.38, p89-93, 2001.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J.E.; KARGMAN, S.L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J.M.; EVANS, J.F.; TAKETO, M.M. Suppression of intestinal polyposis in Apc knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (Cox-2)., **Cell Press**, v.87, p.803-809, 1996.

OWEN, L.N. Transplantação of canine osteosarcoma. **European Journal of Cancer**. v.5, p.615-620, 1969.

PAI, R.; SOREGHAN, B.; SZABO, I. Prostaglandin E2 transactivates EGF-recepto: a novel mechanism for promoting colon câncer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nature Medicine**, v.8, p. 289-293, 2002.

PALMER, N. Diases of bones. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals. 4th ed. New York: **Academic Press Inc.** 1992. v. 1, p. 1-137.

PATNAIK, A.K. Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcomas: a clinicopathologic study of 14 cases. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 1, p. 46-55, 1990.

PATNAIK, A.K.; LIEBERMAN, P.H.; ERLANDSON, R.A.; LIU, S.K. Canine sinonasal skeletal neoplasms: Chondrosarcomas and osteosarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 475-482, 1984.

PLOTON, D. Structure and molecular organization of the nucleolus. **Zentralblat für Pathologie,** v.140, n.1, p.3-6, 1994.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochemistry Journal,** v.18, n.1, p.5-14, 1986.

POWERS, B.E. Tumor of the Skeletal System. In: Withrow, S.J.; Mac Ewen, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2001. p.4-17.

PRITCHARD, D.J.; FINKEL, M.P.; REILLY, C.A. The etiology of osteosarcoma: a rewiew of current considerations. **Clinical Orthopaedic**, v.14, n.3, 1975.

QUINN, C.M.; WRIGHT, N.A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **The Journal of Pathology**. v.160, p.93-102, 1990.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHMITT, F.C.L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.40, p.141-147, 1994.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHMITT, F.C.L. Marcadores da cellular. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.29, p.24-28, 1993.

RINGENBERG, M.A.; NEITZEL, L.E.; ZACHAR, J.F. Meningeal osteosarcoma in a dog. **Veterinary Pathology**, v.37, p.653-655, 2000.

RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L.T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v.156, p.31-39, 1998.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. Neoplasia. In: **Rubin, E.; Farber, J.L.** 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.153-209.

RÜSCHOFF, J.; PLATE, K.H.; BITTINGER, A. Application of the Ag-NOR method to cell imprints. **Journal of Pathology,** v.158, p.333, 1989.

SAGARTZ, J.E.; BODLEY, W.L.; GAMBLIN, R.M.; COUTO, C.G.; TIERNEY, L.A., CAPEN, C.C. p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. **Veterinary Pathology,** v.33, p.213-221, 1996.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N.; IIDAKA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; SHIRAI, N.;IIDAKA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. **Journal of comparative pathology,** v.127, n.4, p.233-238, 2002

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p. SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.

SCHEVEN, B.A.; HAMMILTON, N.J.; FAKKELDIJ, T.M.; DUURSMA, S.A. Effects of recombinant insulin-like growth factor I and II (IGF-I/II) and growth hormone on the growth of normal adult osteoblast-like cell and human osteogenic sarcoma cells. **Growth Reg.** v.1, p.160-167, 1991.

SCHWINT, A.E.; ARAUJO, E.S.; COLE, A.; ITOIZ,, M. E.; CABRINI, R.L. Nucleolar Organizer Regions in Parosteal and Central Osteosarcomas. **Clinical Orthopaedics & Related Research,** v.327, p253-258, 1996.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; SANTOS, R.L.; CASSALI, G.D.; COSTANETO, P.P. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthioracil residues, **Veterinary Pathology**, v.36, p.574-582, 1999.

SHERWOOD-JOHNSON, A.; COUTO, C.G.; WEGHORST, C.M. Mutations in the p53 gene in osteosarcoma of de dog. **Proceedings Veterinary Cancer Society 19th Annual Meeting**, p.26, 1999.

SHIRO, T.; SEKI, T.; NAITON, Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A. A correlation of argyrophilic nuclear organizer with stages of hepatocellular carcinoma. **Cancer,** v.71, n.1, p.44-49, 1992.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogenese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência rural,** v.34, n.2, p.625-633, 2004.

SIMÕES, J.P.C.; SCHONING, P.; BUTINI, M. Prognosis of canine mast cell tumours: a comparison of methods, **Veterinary Pathology**, v.31, n.6, p.637-647, 1994.

SPODNICK, G. J.; BERG, J.; RAND, W. M. SCHELLING, S.H.; COUTO, G.; HARVEY, H.J.; HENDERSON, R.A.; MACEWEN, G.; MAULDIN, N.; MCCAW, D.L.. 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.

STEVENSON, S. Fracture associated sarcomas. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.21, n.4, p.859-873, 1991.

STIMSON, E.L.; COOK, W.T.; SMITH, M.M.; FORRESTER, S.D.; MOON, M.L.; SAUNDERS, G.K. Extraskeletal osteosarcoma in the duodenum of a cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, p.332-336, 2000.

STRAW, R.C.; WITHROW, S.J.; DERNELL, W.S. Tumor of the Skeletal System. In: Withrow, S.J.; Mac Ewen, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3th ed., 2001. p.378-417.

STRAW, R.C.; WITHROW, S.J.; POWERS, B.E.; DOUPLE, E.B. Effects of Cis-Diamminedichloroplatinum II Released from D, L-Polylactic Acid Implanted Adjacent to Cortical Allografts in Dogs. **Journal of Orthopaedic Research,** v.12, p.871-877, 1994.

STRAW, R.C.; WITHROW, S.J. & POWERS, B.E. Management of canine appendicular osteosarcoma. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.1141-1161, 1990.

THAMM, D.H.; MAULDIN, E.A.; EDINGER, D.T.; LUSTGARTEN, C.L. Primary osteosarcoma of the synovium in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, n.4, p.326-331, 2000.

THIERY, J. P. Cell adhesion in cancer. **Comptes Rendus Physique**, v. 4, p. 289-304, 2003.

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

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

TRERÈ, D. AgNOR quantification in tumour pathology: What is actually evaluated? **Journal of Clinical Pathology**, v.46, n.1, p.189. 1993.

TRERÈ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. The silver-staining proteins of interphasis nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Experimental Cell Research**, v.184, n.1, p.131-137.1989.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v.31, p.127-131, 2000.

TSUJII, M.; & DUBOIS, R.N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell,** v. 83, p.493-501, 1995.

UNDERWOOD, J.C.; GIRI, D.D. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. **Journal of Pathology,** v.155, p.95-96, 1988.

VADLAMUDI, R.; MANDAL, M.; ADAM, L.; STEINBACH, G.; MENDELSOHN, J.; KUMAR, R. Regulation of the ciclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. **Oncogene,** v.18, p.305-314, 1999.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Ciclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.38, p.97-120, 1998.

WANG, D.; DUBOIS, R.N.; Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E_2 regulates the angiogenic switch, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.101, n.2, p.415-416, 2004.

WATERS, D.J. Manual de Cirurgia de Paquenos Animais. In Slatter: **Sistema Músculo Esquelético**. Editora Manole Ltda. 1ª ed. v.2, 1998, p.2607-2627.

WEINBERG, R. A. How Cancer Arises. **Scientific American.** September 1996.

WITHROW, S.J. Tumor of the Skeletal System. In: Withrow, S.J.; Mac Ewen, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**, 2001. p.1-3.

WITHROW, S.J.; DOIGE, C.E. En bloc resection of a juxtacortical and three intra-osseous osteosarcama of the zygomatic arch in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association,** 16:867-872, 1980.

WOLFESBERGER, B.; WALTER, I.; HOELZL, C.; THALHAMAMMER, J.G.; EGERBACHER, M. Antioplasttic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells**. Research in Veterinary Science,** v. 80, n. 3, p.308-316, 2006.

WRIGLEY, R.H. Malignant Versus Nonmalignant Bone Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,** v.30, n.2, p.315-347, 2000.

ANEXO

- **COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (HE)**

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	5,00 g
Álcool etílico absoluto	50,00 mL
Sulfato de alumínio e potássio	100,00 g
Óxido de mercúrio	2,50 g
Água destilada	1000,00 mL

EOSINA

Eosina Y	5,00 g
Dicromato de potássio	2,50 g
Ácido pícrico aquoso saturado 1 a 1,5%	50,00 mL
Álcool etílico absoluto	50,00 mL
Água destilada	400,00 mL

- **COLORAÇÃO DE AgNOR (IMPREGNAÇÃO PELA PRATA)**

SOLUÇÃO A

Gelatina incolor microbiológica	1 g
Água deionizada	50,00 mL
Ácido fórmico	0,50 mL

SOLUÇÃO B

Nitrato de prata – MERCK®	50 g
Água deionizada	100,00 mL

Solução de uso: Duas partes da solução B para uma da solução A (mistura feita no momento do uso).

- **IMUNOISTOQUÍMICA**

EDTA

Sal dissódico EDTA – SYNTH®	3,722 g
Água destilada	100,00 mL
Ajustar solução para pH 8,0	

SOLUÇÃO TAMPÃO TRIS

Trizma base SIGMA® – T-1503	6,0 g
Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	100,00 mL

Ajustar solução para pH 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico.

SOLUÇÃO PARA BLOQUEIO ENDÓGENO DA PEROXIDASE

Solução comercial de água oxigenada 10 volumes.

SOLUÇÃO BSA 5%

SOLUÇÃO A

Albumina bovina SIGMA® – A 7906	500 mg
Água deionizada	10,00 mL

SOLUÇÃO B

Ázida sódica (NaN_3) – MERCK® – 1.06688.0100	500 mg
Água deionizada	10,00 mL

SOLUÇÃO PARA USO (BSA 5%)

Solução TRIS pH 7,4	59,00 mL
Solução A	1,25 mL
Solução B	2,50 mL

HEMATOXILINA DE MAYER

Hematoxilina	1,0 g
Iodato de sódio	0,2 g
Sulfato de amónio de alumínio 12 H2O	50 g
Hidrate de cloral	50 g
Ácido cítrico	1 g
Água destilada	1000,00 mL