

ADÔNIS BENVENUTO BALDASSO

**FATORES PROGNÓSTICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO OSTEOSSARCOMA
CANINO E CORRELAÇÃO COM A SOBREVIVÊNCIA**

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2019

ADÔNIS BENVENUTO BALDASSO

**FATORES PROGNÓSTICOS E HISTOPATOLÓGICOS DO OSTEOSSARCOMA
CANINO E CORRELAÇÃO COM A SOBREVIVÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Roberto Baracat de Araujo

Coorientadores: Dr^a. Gleidice Eunice Lavalle

Prof. Dr. Felipe Pierezan

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2019

B175f

Baldasso, Adônis Benvenuto 1989-

Fatores prognósticos e histopatológicos do osteossarcoma canino e correlação com a sobrevivência
[manuscrito] / Adônis Benvenuto Baldasso. – 2019.

37 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Roberto Baracat de Araujo.

Coorientadores: Gleidice Eunice Lavalle, Felipe Pierezan.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

1. Cão - Teses. 2. Osso e ossos - DeCS. 3. Osteossarcoma. 4. Quimioterapia - Teses. 5. Tumores - Teses. I. Araujo, Roberto Baracat de. II. Lavalle, Gleidice Eunice. III. Pierezan, Felipe. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD: 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADÔNIS BENVENUTO BALDASSO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

Aprovada em 11 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Roberto Baracat de Araújo

Prof. Roberto Baracat de Araújo
Presidente - Orientador

Cleuze Maria de Faria Rezende

Prof. Cleuze Maria de Faria Rezende
Escola de Veterinária - UFMG

Rodrigo dos Santos Horta

Prof. Rodrigo dos Santos Horta
Universidade Vila Velha - UVV

Gleide Eunice Lavalle

Prof. Gleide Eunice Lavalle
Escola de Veterinária - UFMG



AGRADECIMENTOS

Sou grato a minha vida e mente saudável.

Agradeço meus pais Odair e Irani, e minha irmã Clara por serem presentes na minha vida e apoiarem sempre meus planos e investirem na minha formação pessoal e profissional, minha mãe e professora me estimulou sempre a estudar e assim entendi que esse é o melhor caminho pra dignidade e prosperidade.

Agradeço ao apoio técnico, profissional e pessoal que recebi do meu orientador Professor Roberto Baracat de Araujo.

Agradeço a minha tutora, mentora, conselheira e orientadora Gleidice Eunice Lavalle, graças a ela pude me aperfeiçoar como médico veterinário e escolher minha área de atuação/estudo e conforto dentro da clínica de pequenos animais. Espelho-me nela pra sempre conseguir melhorar o que tenho a oferecer aos meus pacientes.

Ao apoio recebido dos colegas e funcionários do Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias e do Hospital Veterinário, tenho muito a agradecer. Em especial: Bia Terenzi, Carla Tertuliano, Fernanda Camargo e Rúbia Cunha.

Agradeço a todos os membros laboratório LPC- ICB, pela colaboração fundamental na realização e interpretação dos exames de IHC, em especial ao Professor Geovanni Dantas Cassali e suas orientandas.

Finalmente e não menos importante agradeço a minha namorada Bruna, parceira e entusiasta dos meus planos, você é muito especial pra mim e vamos seguir juntos nas nossas empreitas. Que o amor continue a nos mover em frente.

SUMÁRIO

	RESUMO	8
	ABSTRACT	8
1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	9
3.	REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1	ETIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO OSTEOSSARCOMA CANINO	9
3.2	DIAGNÓSTICO	10
3.3	GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA	12
3.4	FATORES PROGNÓSTICOS	13
3.5	TRATAMENTO	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	AMOSTRAS (CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA)	17
4.2	DADOS CLÍNICOS	17
4.3	CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	17
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA	18
4.5	AVALIAÇÃO DE IMUNORREATIVIDADE	19
4.6	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA	20
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1	DADOS AMOSTRAIS	20
5.2	EXAME CITOLÓGICO	25
5.3	CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA	26
5.4	OPÇÃO TERAPEUTICA	27
5.5	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	29
6.	CONCLUSÕES	30
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8.	ANEXOS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Histograma apresentando a distribuição de cães com OSA de acordo com a idade (n=41).	22
Figura 2	Frequência e distribuição de 41 cães com osteossarcoma de acordo com o porte.	22
Figura 3	Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA classificados de acordo com o peso corporal	22
Figura 4	Frequência e distribuição das raças de 43 cães com osteossarcoma	23
Figura 5	Frequência e distribuição da localização topográfica das lesões de 35 cães com osteossarcoma.	24
Figura 6	A - Correlação de FA elevada e normal com a sobrevida global, em cães com OSA, pelo teste de Mann – Whitney B- Correlação do nível sérico de FA com a sobrevida de 34 cães com OS, pelo teste de Sperman.	24
Figura 7	Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA, tratados somente com cirurgia, classificados de acordo com o nível sérico e fosfatase alcalina.	25
Figura 8	Citologia aspirativa por agulha fina de osteossarcoma canino, coloração rápida, (1000x), presença de vários osteoblastos apresentando padrão de cromatina grosseiro, nucléolos múltiplos e proeminentes, núcleo arredondado e periférico, nota-se também a presença de material amorfo róseo compatível com osteóide (seta).	26
Figura 9	Osteossarcoma canino, tipo osteoblástico produtivo. H.E (400 x) – Células neoplásicas osteoblásticas atípicas, entremeadas por abundante quantidade de matriz osteóide (seta)	26
Figura 10	Correlação entre índice de ki67 e graduação histológica de 27 casos de OSA canino, teste de Spearman	27
Figura 11	Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA, distribuídos conforme a opção terapêutica, a mediana correspondeu a 60 dias para os animais tratados apenas cirurgia, e de 333 dias os para aqueles que receberam quimioterapia adjuvante (P=0,0003) n=36 cães.	28
Figura 12	Comparação da mediana de sobrevida conforme tratamento, em cães com OSA, demonstrando correlação significativa e positiva, pelo teste de Mann – Whitney (P <0,01) n= 36 cães.	28
Figura 13	Micrografia evidenciando imunomarcção para Ki-67 em inúmeras células neoplásicas com marcação nuclear, caracterizando o elevado índice de proliferação celular (65%) em osteossarcoma osteoblástico produtivo (400x).	29
Figura 14	Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA, distribuídos conforme o índice de Ki67.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação para determinação do grau tumoral utilizando escores histológicos pré-determinados para osteossarcoma canino.	19
Tabela 2	Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica, com respectivas fontes, clones, diluições e tipos de marcação.	20

RESUMO

Osteossarcoma é o tumor ósseo primário mais observado em cães. É uma doença localmente agressiva, de rápida evolução e apresenta características metastáticas. Essa dissertação teve como objetivo a caracterização do osteossarcoma diagnosticados em cães no Hospital veterinário da UFMG no período de 2013 a 2018, por meio de um levantamento de dados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos com caracterização dos fatores prognósticos e seu impacto na sobrevida de animais tratados e não tratados. Foram estudados 43 casos de osteossarcoma, com diagnóstico histopatológico realizados no setor de Patologia do HV- UFMG. No presente estudo a idade dos cães variou entre 1 e 15 anos, média de $7,94 \pm 3,43$ anos, e a localização mais frequente no esqueleto apendicular em cães de raça e de grande porte. Correlação positiva foi observada entre o porte físico e a sobrevida, assim como houve correlação entre o nível sérico elevado de fosfatase alcalina com uma menor sobrevida global. Na avaliação histopatológica o subtipo mais comum foi o osteoblástico, a graduação tumoral apresentou correlação positiva e marginalmente significativa com o índice de proliferação celular (Ki67). Houve diferença estatística significativa na avaliação de sobrevida global de animais tratados somente com cirurgia sendo esses um total de 21 casos com mediana de 60 dias, em relação aos 15 casos onde houve complementação com quimioterapia adjuvante, os quais apresentaram mediana de 333 dias.

Palavras-chave: cão, tumor ósseo, osso, quimioterapia, tratamento.

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common primary bone tumor in dogs. It is a locally aggressive, rapidly evolving disease with metastatic features. This dissertation aimed to characterize the canine population diagnosed with osteosarcoma at the UFMG Veterinary Hospital from 2013 to 2018, through a survey of clinical, epidemiological, histopathological and immunohistochemical data in order to characterize prognostic factors and their impact on survival treated and untreated animals. 43 cases of OSA were studied and histopathologically diagnosed by the pathology sector of HV-UFMG. In the present study, the age of the dogs ranged from 1 to 15 years, being the average 7.94 ± 3.43 years, and the most frequent location was in the appendicular skeleton of pure breed and large dogs. There was a correlation between physical size and overall survival, as well as between the elevated level of serum alkaline phosphatase and a lower overall survival. In the histopathological evaluation, the most common subtype was osteoblastic, and the tumor grade showed a positive and marginally significant correlation with the cell proliferation index (ki67). There was a statistically significant difference in the evaluation of the overall survival of animals treated with only surgery, with a total of 21 cases with average 60 days, in contrast with 15 cases where there was complementation with adjuvant chemotherapy, which presented na average of 455 days.

Key words: dog, osteosarcoma, bone, chemotherapy, treatment.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de neoplasias em cães tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, o que pode estar associado com a maior expectativa de vida dos animais de companhia. Fatores como melhores cuidados médico-veterinários, nutrição balanceada, vacinações, protocolos terapêuticos específicos e eficazes, contribuem para maior longevidade dos cães (Filho et al., 2010).

A utilização de modelos animais em estudos comparativos de câncer humano auxilia a elucidar a complexidade de diversas doenças. Os roedores se destacam como o grupo de animais mais utilizados experimentalmente, porém o crescente emprego de cães para tais estudos tem apresentado êxito em pesquisas de determinados tipos de câncer humano, tais como o osteossarcoma (OSA) e o câncer de próstata (Rowell et al., 2011; Langdon, 2012).

O OSA espontâneo em cães e nos humanos é muito semelhante quanto à histopatologia, genética tumoral, alvos moleculares, comportamento e resposta terapêutica (Fenger et al., 2014). Estudar cães com neoplasias espontâneas oferece uma perspectiva valiosa e diferente das geradas em estudos humanos ou experimentais. A oncologia investigativa e comparativa busca a identificação de genes associados, estudo de fatores de risco ambientais, compreensão da biologia tumoral e, possivelmente o mais importante, a avaliação e desenvolvimento de novas terapêuticas contra a doença neoplásica (Paoloni e Khanna, 2008).

O OSA é definido como a neoplasia óssea primária mais frequente em cães. Geralmente acomete os ossos de membros de cães de porte grande a gigante com idade média de sete anos (Morello et al., 2011). Apesar do sucesso do tratamento com tumor primário antes de lesões metastáticas serem clinicamente detectáveis, o desenvolvimento de metástases pulmonares continua a ser a causa mais comum de mortalidade em pacientes com OSA (Mayer e Grier, 2006).

Dessa forma, o planejamento clínico deve ser rápido e contar com o uso correto das ferramentas diagnósticas, buscando critérios prognósticos e preditivos com real impacto na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes, aumentando assim as chances de sucesso no controle da doença.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi estudar a população canina diagnosticada com osteossarcoma no período de 2013 a 2018, atendida no Hospital Veterinário da UFMG, por meio de um estudo retrospectivo, com o levantamento de informações clínico epidemiológicas, caracterizando os fatores prognósticos correlacionando-os com a sobrevida global de animais tratados e não tratados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ETIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO OSTEOSSARCOMA CANINO

O OSA é a neoplasia óssea primária mais comum em cães, localmente invasiva e metastática, com metástases pulmonares microscópicas em mais de 90% dos casos, caracterizando-se como uma doença agressiva e de rápida progressão (O'Brien et al., 1993). Histologicamente, o OSA é composto por células mesenquimais malignas de linhagem de células-tronco ou osteoblastos que produzem matriz osteóide (Thompson e Dittner, 2017).

O mecanismo patofisiológico de desenvolvimento do OSA ainda não está bem definido, porém diversas causas são identificadas como fatores que contribuem para o seu aparecimento, tais como radiações ionizantes, produtos químicos, corpos estranhos (implantes metálicos e ósseos) e viroses (Hammer et al., 1995; Arthur et al., 2016).

Existem evidências de envolvimento genético e fatores hereditários no desenvolvimento do OSA em cães. É proposto que os genes Rb e p53 agem como genes de supressão tumoral e podem estar superexpressos em alguns casos (Loukopoulos e Robinson, 2007; Ehrhart et al., 2013).

O OSA representa 80 a 95% das neoplasias ósseas diagnosticadas em cães (Spodnick et al., 1992; Stockhaus et al., 2003). Anatomicamente pode ocorrer em qualquer osso, porém é mais comum na metáfise de ossos longos de cães de porte grande a gigante com idade média de sete anos (Ru et al., 1998; Boerman et al., 2012). Com maior frequência as lesões se localizam nos membros torácicos do que nos pélvicos, na proporção de 2:1 (O'Brien et al., 1993). O terço distal do rádio é o mais acometido, seguida pelo terço proximal do úmero. Outros locais comuns são os terços distal do fêmur e da tíbia e proximal da tíbia (Mauldin et al., 1988; Chun; Straw et al., 1996; De Lorimier, 2003; Selmic et al., 2014).

A ocorrência de OSA extraesquelético é rara, porém já foi relatada em baço, fígado, glândula adrenal, intestino, glândula mamária, ligamento gástrico, meninges, olhos, rins, tecido subcutâneo, testículo, vagina e cápsula sinovial (Bech-Nielsen et al., 1978; Thamm et al., 2000).

Cães com OSA em ossos apendiculares geralmente apresentam claudicação e aumento de volume localizado. Sinais sistêmicos como febre, anorexia ou perda de peso, são incomuns no estágio agudo da doença (Boulay et al., 1987). A dor provavelmente está relacionada com a ocorrência de microfraturas induzidas por osteólise do osso cortical com a extensão do tumor a partir do canal medular. A claudicação tende agravar, assim como o aumento de volume local e presença de sensibilidade dolorosa no sítio primário (Ehrhart et al., 2013). Além disso, os cães podem apresentar claudicação grave associada a fraturas patológicas que podem ocorrer durante progressão da doença devido a fragilidade óssea (Kim et al., 2009; Bhandal e Boston, 2011; Rubin et al., 2015). Os animais acometidos raramente possuem alterações no padrão respiratório como a primeira evidência de metástase pulmonar, geralmente esses sinais são inespecíficos. Mesmo os animais diagnosticados com alterações metastáticas nos pulmões podem permanecer assintomáticos por longo período de tempo (O'Brien et al., 1993).

3.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce e estadiamento clínico da doença é de extrema importância e deve ser baseado na história clínica, exame físico, interpretação de exames citológicos, de imagens e histopatológicos. A radiologia isoladamente não deve ser empregada para fazer o diagnóstico definitivo de uma patologia óssea (Ehrhart et al., 2013).

O conhecimento dos sinais clínicos, raças predispostas e idade, contribuem para a orientação do diagnóstico. O diagnóstico definitivo só é possível agregando-se os dados dos exames histopatológicos, onde há a classificação e o reconhecimento do tipo tumoral (Stockhaus et al., 2003).

Quando há suspeita de uma lesão óssea neoplásica primária, deve-se realizar um diagnóstico diferencial entre: osteomielite bacteriana ou fúngica, infarto ósseo, osteopatia hipertrófica, hipervitaminose A, reações periosteais traumáticas e cistos ósseos aneurismais (Morello et al., 2011).

Radiograficamente, a diminuição da densidade óssea traduz o processo osteolítico e o aumento da densidade traduz o processo osteoblástico. A perda dos padrões trabeculares do osso é um dos primeiros sinais radiológicos visíveis nos casos de neoplasia óssea maligna (Priolo e Cerase, 1998). Há um rompimento periosteal e elevação no local da lesão por neoformação óssea subperiosteal, caracterizando o triângulo de Codman (composto por córtex destruído na área acometida e proliferação do periósteo). Essa neoformação significa o progresso da neoplasia pelo interior do osso (Rana et al., 2009; Boston et al., 2010).

A destruição óssea é acompanhada por neoformação óssea desorganizada que pode se expandir para o interior do osso como também invadir os tecidos moles adjacentes, a lise cortical pode ser grave a ponto de gerar descontinuidade cortical e fratura patológica (Bhandal e Boston, 2011). Embora o OSA ocorra com maior frequência na região metafisária dos ossos longos, este pode se apresentar em qualquer região ou em qualquer osso (Ehrhart et al., 2013).

São necessárias pelo menos duas projeções radiográficas (médio lateral e crânio – caudal) para uma interpretação adequada da imagem do OSA. Devido ao crescimento ósseo em razão do processo tumoral, os tecidos moles adjacentes estarão deslocados, o que pode ser percebido nas radiografias por linhas radiolucidas que são determinadas pelas fâscias musculares. Em alguns tipos de tumores malignos há mineralização destes tecidos (Davis et al., 2002).

Raramente os tumores malignos primários se infiltram pelo espaço articular, porém tumores altamente destrutivos podem, em algumas ocasiões, se infiltrar, mas dificilmente haverá envolvimento do osso oposto. Um sinal radiográfico característico das neoplasias malignas de alta agressividade, que não se enquadra perfeitamente nos sinais radiológicos descritos, é o chamado sunburst, caracterizado pela perda estrutural óssea completa no local da lesão e a percepção de uma “explosão” óssea. Os padrões de destruição óssea estão presentes nas neoplasias ósseas malignas e fornecem dados da agressividade tumoral (Shimose et al., 2008).

Os pulmões são os principais sítios metastáticos com o avanço da doença (O'BRIEN et al., 1993). Podem ser observadas na radiografia como nódulos que possuem opacidade variável. Comumente os focos de metástases que são menores do que cinco mm de diâmetro não são visíveis radiograficamente. A detecção radiográfica das metástases pulmonares pode ser maximizada pela obtenção das incidências laterais esquerda e direita, e incidência dorsoventral do tórax. As incidências latero laterais direita e esquerda são obtidas porque as massas no lobo pulmonar dependente podem ser mascaradas pela atelectasia por compressão no pulmão circunjacente (Leibman et al., 2001)

Embora o exame radiográfico seja o método mais utilizado para o diagnóstico de OSA canino, também é de extrema valia o uso de outros recursos como a cintilografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética, que mais detalhadamente avaliam a neoplasia quanto a sua característica e extensão (Davis et al., 2002; Nemanic; London e Wisner, 2006; Eberle et al., 2011).

O exame citopatológico de amostras ósseas baseia-se em achados microscópicos provenientes de amostra normalmente aspirada por agulha fina ou de *imprint* de biópsia. Esta técnica é considerada pouco invasiva e apresenta outras vantagens como rapidez e acurácia diagnósticas relativamente elevadas e baixo custo financeiro. Além disso, a coleta pode ser realizada em ambulatório, prevenindo a exposição do paciente a riscos inerentes a procedimentos anestésicos (Kumar et al., 1993).

As células do OSA geralmente são circulares ou ovais, possuem bordas citoplasmáticas distintas, citoplasma azul brilhante granular e exibem núcleos excêntricos com ou sem nucléolos

(Reinhardt et al., 2005). Em geral, a citologia exibe menor acurácia para o diagnóstico de neoplasias estromais em relação à histopatologia. Entretanto, alguns estudos observaram índices diagnósticos satisfatórios por meio da citologia. A citologia por Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) deve ser a primeira opção para confirmar o OSA em lesões onde os sinais clínicos, localização e radiologia forem sugestivas de neoplasia óssea (Berzina et al., 2008; Thompson e Pool, 2008).

A biópsia incisional ou excisional é essencial para a confirmação da presença da neoplasia, identificação do tipo histológico e planejamento do tratamento. As amostras de biópsia para diagnóstico em tumores ósseos devem ser obtidas do centro da lesão, da periferia e tecido adjacente. Múltiplos fragmentos de biópsia aumentam as chances de diagnóstico (Berzina et al., 2008). A biópsia fechada que utiliza a agulha de Jamshidi é utilizada para obter um mínimo de dois ou preferencialmente três núcleos de tecido, tanto do centro da lesão como da área entre lesões acometidas e não acometida do osso (Powers et al., 1988; Shimose et al., 2008).

A biópsia pré-operatória não é essencial se a amputação do membro for a única opção para lesões que tenham sofrido fratura ou invadido extensamente os tecidos circundantes, mas uma amostra da lesão deve ser avaliada histologicamente após a amputação para se confirmar o diagnóstico (Straw e Withrow, 1996).

Histologicamente, o OSA caracteriza-se por ser uma neoplasia de origem mesenquimal de células ósseas que produzem matriz osteóide extracelular, sendo a presença do tumor osteóide a base para o diagnóstico histológico. O padrão histológico pode variar entre os tumores ou até mesmo dentro do mesmo tumor. Existem subclassificações histológicas e essas são baseadas no tipo e quantidade de matriz osteóide e nas características inerentes às células. (Thompson e Pool, 2008).

Os osteossarcomas podem ser classificados em subtipos histológicos baseados na qualidade e quantidade da matriz extracelular (MEC) produzida pelas células tumorais, sendo eles osteoblástico produtivo, osteoblástico minimamente produtivo, condroblásticos, fibroblásticos; no grau de diferenciação (subtipo pouco diferenciado); na presença abundante de células gigantes (gigante subtipo celular); e na presença dominante de vasos sanguíneos e lesões císticas (subtipo telangiectásico). Não há correlação bem estabelecida no comportamento biológico das diferentes subclassificações histológicas (Thompson e Pool, 2008; Ehrhart et al., 2013).

3.3 Graduação Histológica

Diversos estudos propõem graduação histológica para o OSA em graus I, II e III, baseados em características microscópicas como o pleomorfismo celular, índice mitótico, necrose tumoral, número de células multinucleadas, invasão vascular, característica e quantidade de matriz óssea e densidade de células tumorais. Esta graduação pode ser fator prognóstico para o comportamento sistêmico da doença em algumas situações (Kirpensteijn et al., 2002; Loukopoulos e Robinson, 2007).

O resultado da graduação pode ser subjetivo e varia em relação ao valor prognóstico de acordo com características histológicas individuais, não devendo ser utilizado de maneira isolada (Schott et al., 2018).

3.4 FATORES PROGNÓSTICOS

Alguns indicadores de prognóstico são comprovadamente associados a um menor tempo de sobrevida em cães com OSA apendicular como a idade jovem (Spodnick et al., 1992; Loukopoulos; Robinson, 2007), localização no úmero proximal (Kuntz et al., 1998; Schmidt et al., 2013), grandes tumores (Rosenberger; Pablo e Crawford, 2007), maior peso corporal (Ru et al., 1998; Hammer et al., 1995) elevada concentração sérica da enzima fosfatase alcalina, (Garzotto et al., 2000; Hillers et al., 2005; Barger et al., 2005), imunorreatividade elevada para a enzima cicloxigenase 2 (COX-2) (Mullins et al., 2004), alto grau histológico (III) (Kirpensteijn et al., 2002; Loukopoulos; Robinson, 2007) e presença de metástases no momento do diagnóstico (Boston et al., 2010).

A dosagem sérica da enzima fosfatase alcalina quando se apresenta elevada no momento do diagnóstico do tumor ou após exérese do tumor, pode indicar evidência clínica de metástases (Ehrhart et al., 1998; Hillers et al., 2005; Barger et al., 2005). Em seres humanos com OSA, a atividade sérica da fosfatase alcalina é reconhecida como fator prognóstico há mais de 30 anos e indica a atividade osteoblástica nessas situações (Garzotto et al., 2000).

O antígeno nuclear de proliferação celular (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), expresso principalmente na fase S do ciclo celular e a proteína Ki-67 (reconhecida principalmente pelo anticorpo monoclonal MIB-1), expressa em todas as fases, exceto G0, representam os principais marcadores imuno-histoquímicos utilizados para definição da taxa de proliferação celular (Cassali et al., 2011). Geralmente tumores com maiores índices proliferativos apresentam curso mais agressivo com aumento do risco de metástases, mas melhor resposta à quimioterapia (Scholzen e Gerdes, 2000). Scotlandi et al. (1995), defendem que no osteossarcoma humano o alto índice de expressão de Ki-67 parece estar correlacionado com a agressividade destes tumores ósseos, podendo ser utilizado, em associação com a avaliação histopatológica, para estabelecimento do prognóstico ou para determinar a terapia mais adequada.

A cicloxigenase-2 (Cox-2) é uma das enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. É relacionada ao crescimento celular e possui um papel importante na tumorigênese do osteossarcoma e de diferentes neoplasias caninas, humanas e de roedores (Millanta et al., 2012). Em um estudo realizado por Mullin (2004), a imunorreatividade para a COX-2 foi identificada em 88% dos tumores ósseos primários, porém a marcação intratumoral de COX-2 se mostrou uma variável heterogênea. A pontuação de imunorreatividade para COX-2 é um produto de intensidade da marcação e a percentagem de células positivas para tal, e foi potencialmente correlacionada com a evolução da doença. Cães com tumores primários demonstrando forte intensidade da expressão tinham sobrevida significativamente menor em comparação com os cães com tumores expressão negativa, pobre ou moderada para a COX-2. No entanto, os autores avaliaram um baixo número amostral de cães com forte intensidade de coloração para COX-2. O valor prognóstico da COX-2 expressa em OSA merece uma avaliação mais completa

3.5 TRATAMENTO

O tratamento preconizado para o OSA apendicular é a exérese do tumor primário e posterior complementação terapêutica com quimioterapia adjuvante, sendo a amputação realizada de maneira isolada considerada como paliativa (Mauldin et al., 1988; Sorenmo, 2003; Endicott, 2003; Fenger et al., 2014).

A amputação do membro é o tratamento preconizado para cães com OSA apendicular apresentando vantagens imediatas, incluindo alívio de dor, melhor mobilidade e consequentemente melhor qualidade de vida (Chun e De Lorimier, 2003). A cirurgia deve ser considerada tratamento paliativo, quando realizada isoladamente. Apesar do alívio do desconforto local, esta modalidade terapêutica não resulta em cura (Endicott, 2003).

Apesar de a amputação do membro ainda ser o tratamento de escolha para cães com OSA, um grande número de proprietários se recusa a autorizar a amputação do membro, impossibilitando, dessa maneira, que o profissional realize uma terapia mais adequada, o que, consequentemente, reduz as chances de proporcionar ao animal melhor qualidade de vida (Ehrhart et al., 2013).

A técnica de cirurgia com preservação de membro foi desenvolvida para os casos em que o proprietário não permite a amputação do membro, ou para animais que além da neoplasia óssea, apresentam alterações neurológicas ou outras afecções ortopédicas que impossibilitem a realização da amputação. Em estudos sobre sua viabilidade prática, foi concluído que ela promove de boa a excelente a função do membro (Larue et al., 1989).

Os cães com tumores confinados a uma única localização, com menos de 50% do osso radiograficamente afetado, são candidatos potenciais. Um envolvimento maior que 50% torna a fixação do implante ao osso hospedeiro remanescente mais difícil, aumentando a chance de falha ortopédica (Kuntz et al., 1998).

Os melhores resultados após a cirurgia tradicional de preservação de membro foram limitados às lesões metafisárias de rádio e ulna. A cirurgia de preservação de membro para o úmero proximal resulta em função ruim principalmente devido à necessidade de artrodese em uma articulação de amplos movimentos e na tíbia distal devido à alta taxa de infecção por causa da pequena cobertura de tecidos moles (BERG et al., 1995; Kuntz et al., 1998; Ehrhart et al., 2013). Tumores ósseos primários normalmente ocorrem em região metafisária e a articulação vizinha deverá ser submetida à artrodese após a ressecção do tumor, que quando localizados na tíbia proximal ou fêmur distal representam problemas pela infuncionalidade da articulação do joelho (Straw e Withrow, 1996).

Diferentes técnicas de cirurgia conservadora foram desenvolvidas, como aloenxerto, implante metálico, auto-enxerto dos tecidos tumorais pasteurizados, osteogênese e transporte de osso longitudinal, transposição de ulna e representam alternativas à amputação (Straw e Withrow, 1996; Endicott, 2003; Liptak et al., 2006).

A infecção representa o maior risco após a cirurgia com preservação do membro, por razões como campo cirúrgico extenso, tempo cirúrgico prolongado, emprego de enxertos grandes e mínimo revestimento por tecidos moles, principalmente nos tumores distais dos membros (Lascelles et al., 2005).

Complicações que podem ocorrer no pós-operatório incluem: infecção, fraturas, falha de fixação e recidiva local (Straw e Withrow, 1996;) Berg e Straw (2004) afirmam que o prognóstico para a sobrevivência dos cães tratados pela cirurgia com preservação do membro e quimioterapia é

similar ao de cães tratados com amputação e quimioterapia, a menos que ocorra recidiva local. A excisão do tecido acometido com margem de segurança assegura o principal controle local do OSA, mas o ganho de sobrevida permanece baixo.

A presença de metástase, detectada no momento do diagnóstico do OSA, é reconhecida como um fator de prognóstico desfavorável, sendo o tratamento menos efetivo em aumentar o tempo de sobrevida nestes casos (Schmidt et al., 2013; Selmic et al., 2014).

A quimioterapia consiste em administrar moléculas citotóxicas que bloqueiam o ciclo celular ou causam danos irreversíveis ao DNA. As células mais sensíveis aos agentes quimioterápicos são as células em divisão, como células neoplásicas e células com alta taxa de renovação.

Os agentes quimioterápicos apresentam uma toxicidade hematológica durante 5 a 7 dias seguidos à sua administração, além de toxicidade digestiva. Estas toxicidades não são específicas, ou seja, cada família de agentes apresenta uma forma de ação e toxicidade próprias. Por isso, um acompanhamento hematológico, bioquímico e clínico do animal é necessário durante a quimioterapia, realizado antes de cada administração e uma semana após, momento em que sua toxicidade é máxima (Morello., 2011) São utilizadas as doses mais altas possíveis sem causar níveis de toxicidade potencialmente fatais, referido como “Dose Máxima Tolerada” (DMT) (Kerbel e Kamen, 2004).

Um aumento no tempo médio de sobrevida é consistentemente observado nos animais que foram submetidos a quimioterapia adjuvante se comparada à amputação isolada como forma de abordagem terapêutica (variação: 262–413 vs 134–175 dias, respectivamente) (Ehrhart et al., 2013).

Apesar de numerosos estudos publicados descrevendo a quimioterapia adjuvante para osteossarcoma apendicular canino com o uso de cisplatina, doxorubicina e carboplatina sozinhos ou em associação, não há consenso quanto ao protocolo de quimioterapia ideal. A escolha do protocolo de quimioterapia deve basear-se no benefício percebido versus risco dos protocolos disponíveis com consideração da eficácia relatada, toxicidade, intensidade do protocolo para o cão e proprietário e custo financeiro (Schmidt et al., 2016).

A cisplatina é um derivado da platina e é empregada no tratamento de OSA apendicular em cães, reduzindo a incidência de doenças pulmonares metastáticas (Straw et al., 1991) A cisplatina exerce nefro toxicidade, sendo recomendado o controle da função renal, utilizando protocolos diuréticos após sua administração. Existem vários protocolos de diurese salina, sendo o esquema de quatro horas de hidratação ainda o mais seguro. Nesse protocolo, solução salina é administrada, ao cão, por via intravenosa a 25 ml/kg/h por quatro horas. A cisplatina é administrada na dosagem máxima de 70 mg/m² IV por aproximadamente 20 minutos, usando esquema de infusão intravenosa lenta, seguido por administração de salina por mais uma hora (Shapiro et al., 1988; Thompson e Fugent, 1992; Chun e De Lorimier, 2003).

A carboplatina é um derivado da platina, porém é menos nefrotóxica que a cisplatina, com efeitos anti tumorais aparentemente semelhantes. (Frimberger et al., 2016), podendo ser administrada por via intravenosa, não sendo necessária induzir diurese salina. A dose utilizada é de 300 mg/m² (IV), repetida em intervalos de 21 dias por quatro a seis sessões desde que não ocorra nenhum sinal grave de supressão de medula óssea (Skorupski et al., 2016).

Um dos quimioterápicos mais empregados em terapias antineoplásicas na população humana e animal é a doxorrubicina, um antibiótico da família das antraciclina que possui reconhecida eficácia no tratamento de tumores sólidos e hematopoiéticos (Butany et al., 2009). A cardiotoxicidade das antraciclina parece ser distinta de seus efeitos terapêuticos e tem sido atribuída a alguns efeitos, incluindo apoptose, alterações do metabolismo do ferro, desregulação no metabolismo do cálcio e disfunção mitocondrial (Sawyer et al., 2010). O gatilho comum desses eventos parece estar ligado ao estresse oxidativo causado pela produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em inflamação, fibrose e necrose miocárdica (Geiger et al., 2010).

Os efeitos adversos da doxorrubicina no sistema cardiovascular incluem agressão miocárdica levando a disfunção ventricular sistólica e consequente insuficiência cardíaca. Essa complicação pode culminar em interrupção do tratamento quimioterápico e comprometer a cura ou o controle do câncer (Sawyer et al., 2010).

A doxorrubicina é um agente eficaz de quimioterapia adjuvante para cães portadores de OSA. A posologia recomendada é de 30 mg/m² a cada três semanas para cães com mais de 10 kg e de 1mg/kg para cães com menos de 10 kg, com uma dose acumulada máxima de 180 a 240 mg/m² (Mauldin et al., 1993; Berg et al., 1995 ;Chun e De Lorimier, 2003; Skorupski et al., 2016).

Um estudo de coorte retrospectivo foi realizado com 470 cães tratados com diferentes protocolos quimioterápicos, com carboplatina e doxorrubicina, em uso isolado e combinado, embora a escolha do protocolo não tenha resultado em diferenças significativas em ganho de sobrevida, o protocolo com o uso isolado da carboplatina resultou em uma menor proporção de cães apresentando efeitos colaterais, o que poderia ser vantajoso na manutenção de qualidade de vida durante o tratamento (Selmic et al., 2014).

A quimioterapia com dose máxima tolerada exige intervalos prolongados entre os ciclos sucessivos de administração, para que o paciente possa se recuperar dos efeitos colaterais, com destaque para a recuperação da medula óssea, quase todos os quimioterápicos demonstram potencial antiangiogênico, devido ao fato de que o endotélio associado ao tumor também está se dividindo rapidamente. Porém quando os quimioterápicos são administrados em DMT, durante o intervalo entre as doses, há uma recuperação da microvasculatura do tumor, de forma a superar o benefício antiangiogênico conferido pelos quimioterápicos (Kerbel e Kamen, 2004).

A quimioterapia metronômica consiste na administração frequente, até mesmo diária, de quimioterápicos em doses significativamente abaixo da DMT, sem intervalos prolongados entre as doses (Kerbel e Kamen, 2004; Thompson e Dittner, 2017).

O advento da quimioterapia metronômica possibilitou novas formas de administração de agentes citotóxicos. Essa alteração na forma de administração apresenta uma importante estabilização do crescimento tumoral, estando relacionadas com a inibição da angiogênese e pela redução das células progenitoras endoteliais, responsáveis pela regeneração vascular, essa modalidade não substitui o tratamento convencional, mas pode ser utilizada como alternativa no tratamento paliativo de pacientes com neoplasias metastáticas, tumores inoperáveis ou em casos de resistência ao quimioterápico (Leach et al., 2012; Albertsson; Lennernäs; Norrby, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e aprovação da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), protocolo 149/2018 (Anexo 1).

4.1 AMOSTRAS (CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA)

Foi feito um estudo retrospectivo no qual os arquivos do Hospital Veterinário da UFMG foi consultado para levantamento dos prontuários de cães com diagnóstico histopatológico de OSA no período de 2013 a 2018, totalizando 43 amostras.

Todos os animais foram atendidos no hospital veterinário da UFMG e tratados pelo setor de cirurgia e de oncologia.

Para a condução do experimento não se utilizaram animais vivos. Foram utilizados apenas os blocos de parafina disponíveis nos arquivos do setor de Patologia do Hospital Veterinário da UFMG, contendo fragmentos de osteossarcoma, obtidos através de procedimento de biopsia ou necropsia.

Para esse estudo foram admitidos os casos registrados e confirmados de osteossarcoma pelos laudos histopatológicos.

4.2 DADOS CLÍNICOS

Os prontuários dos animais foram analisados através de uma busca eletrônica para obtenção de dados clínicos. As variáveis clínicas e patológicas avaliadas foram: raça, sexo, idade, massa corporal, membros e ossos acometidos, método diagnóstico definitivo, graduação e classificação histológica, opção terapêutica, atividade sérica de fosfatase alcalina em momento pré-cirúrgico.

As informações do tratamento foram obtidas do prontuário, incluindo a data da amputação, presença de metástases no momento do diagnóstico, protocolo de quimioterapia prescrito, a dose e o(s) agente(s) antineoplásicos administrado(s) e a massa corporal em cada tratamento. A data da administração da última dose de quimioterapia, o número total de doses recebidas e se o protocolo foi ou não completado ou terminado prematuramente. Os animais considerados como tratados receberam pelo menos quatro doses de quimioterápico em dose máxima tolerada. Os pacientes foram categorizados de acordo com o porte em: pequeno (menor que 10 kg), médio (11- 20 kg), grande (21 -40 kg) e gigante (maior que 40 kg).

4.3 CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras de tecido disponíveis já haviam sido fixadas em formol, descalcificadas em ácido fórmico, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente foram seccionadas em fragmentos de 4 µm de espessura visando confecção de novas lâminas para análise histopatológica e avaliação imuno-histoquímica.

As lâminas previamente selecionadas foram coradas pela hematoxilina-eosina. Os tumores foram classificados como OSA quando a matriz osteóide foi produzida pelas células tumorais e classificados histologicamente por um patologista colaborador segundo o método modificado de Dahlin e Unni (1977), proposta pela Organização Mundial de saúde e sugerido por Thompson e Pool (2008), em: osteoblásticos produtivos ou pouco produtivos, condroblásticos, fibroblásticos, telangiectásicos, tipo células gigantes e indiferenciados. Quando havia mais de um subtipo histológico no mesmo material o tumor foi classificado de acordo com o padrão histológico predominante.

A graduação histológica seguiu o padrão proposto por Kirpensteijn et al. (2002). As variáveis histológicas incluíram o pleomorfismo das células tumorais, quantidade de matriz tumoral, densidade de células tumorais, necrose tumoral, número estimado de células gigantes

multinucleadas, estimativa de formação de turbilhões, número de mitoses e crescimento tumoral em vasos sanguíneos e linfáticos.

Todas as variáveis foram pontuadas subjetivamente usando um sistema de classificação predeterminado, adaptado de sistemas humanos e veterinários. A diferença percentual no pleomorfismo de células tumorais (PCT) foi avaliada em uma escala de 0 a 4 (0 = todos os núcleos idênticos; 1 = menos de 25% PCT; 2 = 25-50% PCT; 3 = 50-75% PCT; 4 = mais de 75% de PCT). A quantidade de matriz tumoral foi avaliada em uma escala de 1 a 3 (1 = mais de 50% de matriz tumoral; 2 = 25 a 50% de matriz tumoral; 3 = menos de 25% de matriz tumoral). A densidade de células tumorais foi avaliada numa escala de 1 a 4 (1 = menos de 25% de células tumorais; 2 = 25-50% de células tumorais; 3 = 50-75% de células tumorais; 4 = mais de 75% de células tumorais). A necrose tumoral foi avaliada em uma escala de 0 a 3 (0 = sem necrose presente; 1 = menos que 25% de necrose; 2 = 25-50% de necrose; 3 = 50-75% de necrose; 4 = mais de 75% de necrose) .

Os osteossarcomas foram classificados como grau III quando ocorreu o crescimento do tumor para os vasos ou células tumorais dentro dos vasos. O grau de tumor foi determinado de acordo com um cronograma de classificação descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação para determinação do grau tumoral utilizando escores histológicos pré-determinados para osteossarcoma canino, adaptado de Kirpensteijn et al. (2002).

Graduação tumoral	Pleomorfismo	Mitoses	Matriz tumoral	Celularidade	Necrose
I	0-1 (<25%)	<10	1 (>50%)	1 (<25%)	0-1 (<25%)
II	2 (25-50%)	10-20	2 (25-50%)	2 (25 -50%)	2 (25-50%)
III	3-4 (>50%)	>21	3 (<25%)	3-4 (>50%)	3-4 (>50%)

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Secções histológicas consecutivas de 4µm foram preparadas em lâminas com carga positiva¹ e as reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Comparada (LPC-ICB) pelo método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase de acordo com as instruções do fabricante do sistema comercial de detecção de anti-rato/anti-coelho². A recuperação antigênica foi realizada em calor-úmido pressurizado³ com citrato pH 6,0⁴. Os detalhes relativos aos anticorpos, diluições, procedimentos de recuperação de antígeno e tempos de incubação dos anticorpos utilizados no processo estão demonstrados na Tab. 2. Todas as secções foram incubadas com os respectivos anticorpos primários específicos durante 16h em

¹ (ImmunoSlide®)

² (Novolink Polymer Detection Sistem; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, Reino Unido)

³ (Pascal®)

⁴ (DakoCytomation Target Retrieval Solution)

câmara úmida a 4°C. A imunorreatividade foi visualizada com o cromógeno diaminobenzidina⁵ e contra-corado com hematoxilina de Mayers.

Secções de um carcinoma mamário canino positivo para ki 67 e COX 2, foram utilizadas como controles positivos.

Tabela 2- Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica, com respectivas fontes, clones, diluições e tipos de marcação.

Anticorpo	Fonte	Clone	Diluição	Marcação
Ki67	Dako	MIB-1	1:50	Nuclear
COX2	Labvision	SP21	1:80	Membranar

4.5 AVALIAÇÃO DE IMUNORREATIVIDADE

Para avaliação da expressão de COX-2 foram utilizadas duas avaliações distintas. Conforme preconizado por Lavalle et al., (2009), com o score de distribuição definido pela estimativa de porcentagem de células imunorreativas com marcação citoplasmática em cinco campos de maior aumento, sendo: 0 a ausência de células coradas, 1 = menos de 10% de células coradas, 2=entre 10 e 30%, 3=entre 31 e 60% e 4= mais de 61% de células coradas. Para a intensidade de marcação foram atribuídos valores de 0 a 3, onde 0 é ausência de marcação (-), 1 equivale à marcação fraca (+), 2 a marcação moderada (++) e 3, a marcação forte (+++). Os escores de distribuição e intensidade foram multiplicados para obtenção do escore total de 0 a 12, onde escores acima de 5 foram considerados como alto.

Uma segunda avaliação para expressão de COX-2 foi realizada, utilizando – se um método de pontuação baseado na estimativa da porcentagem de células imunorreativas com marcação citoplasmática em combinação com uma estimativa da intensidade de marcação, sendo 0, sem marcação; +1, com marcação citoplasmática difusa fraca (marcação em <10% das células cancerígenas); +2, moderada a forte com marcação citoplasmática granular de 10 a 90% das células cancerígenas; +3,> 90% das células tumorais marcadas com intensidade forte. As amostras com pontuação de +1 a +3 foram consideradas positivas para expressão dos receptores COX-2, enquanto amostras com pontuação de +2 a +3 foram consideradas como superexpressão da enzima (Millanta et al., 2012).

O índice de proliferação celular (Ki67) foi determinado através da contagem manual do número de núcleos positivos em um total de 500 células neoplásicas em áreas de “hot spot”, por meio de análise manual de imagens no software Image J⁶.

4.6 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

A sobrevida dos animais foi avaliada por meio dos prontuários e retornos periódicos dos animais, realizados no Hospital Veterinário da UFMG, registrados em sistema informatizado, e por contato telefônico com os tutores. Foi considerado o tempo em dias, compreendido entre o diagnóstico e o óbito do animal em decorrência da doença. Pacientes que apresentaram

⁵ (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, EUA)

⁶ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

metástases no momento do diagnóstico ou vieram a óbito por outras causas ou que deixaram de ser acompanhados foram censurados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados quantitativos obtidos que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, seguido de teste de médias.

Para relacionar as variáveis localização, idade, sexo, massa corporal, nível sérico de fosfatase alcalina, membro acometido, osso acometido, raça, graduação histopatológica, subtipos histopatológicos, e os escores de Cox 2 e Ki67 foram analisados individualmente com relação à mortalidade em consequência da doença pelos Testes Qui-quadrado ou método exato de Fisher.

Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson, sendo consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste for $p < 0,05$.

As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Stata, versão 14.0

O tempo de sobrevida foi estimado pela curva de Kaplan-Meier. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste log-rank de Cox Mantel. assumiu-se um nível de significância de 5%. Para os pares entre variáveis numéricas e ordinais calculou-se a correlação não paramétrica de Spearman. Para os pares entre variáveis categóricas, aplicou-se o teste qui quadrado de independência. Para os pares entre variáveis numéricas e categóricas será realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para dois grupos, quando houver mais de dois grupos. A aplicação destes testes buscou verificar se existem diferenças significativas nos valores das variáveis numéricas entre os distintos grupos das variáveis categóricas. Gráficos ilustrativos foram construídos. Em todos os testes assumiu-se um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir deste levantamento foi possível obter informações sobre as raças, idade, massa corporal, sexo, ossos acometidos, padrão histológico, nível sérico de fosfatase alcalina, opção terapêutica, realização de citologia e sobrevida global.

5.1 DADOS AMOSTRAIS

Foram estudados 43 casos de OSA, com diagnóstico histopatológico pelo setor de Patologia do HV- UFMG. Desses, 27 amostras estavam emblocados em parafina, disponíveis com material viável para o estudo das variáveis histológicas e avaliação de imuno-histoquímica. Desse total oito eram blocos provenientes de animais submetidos à necropsia, não sendo efetuado tratamento cirúrgico e/ou medicamentoso previamente.

A idade foi obtida em 95% (41/43) dos casos e variou entre 1 e 15 anos, sendo a média de $7,9 \pm 3,43$ anos. Observou-se maior frequência entre 7 e 11 anos (Figura 1). Resultado semelhante foi referido em outros estudos, os quais demonstram maior frequência de OSA para animais nesta faixa etária (Dahlin; Unni, 1977; Cavalcanti, 2007; Teixeira et al., 2010; Boerman et al., 2012). A idade avançada, observada no presente estudo, pode ter sido um fator de risco associado a ocorrência de OSA, uma vez que na senilidade há um decréscimo nas taxas

metabólicas e falhas no sistema de imunovigilância. De acordo com a literatura, esses fatores tornam os animais mais predispostos ao surgimento de neoplasias (Weinberg, 1996; Gasparini et al., 2003).

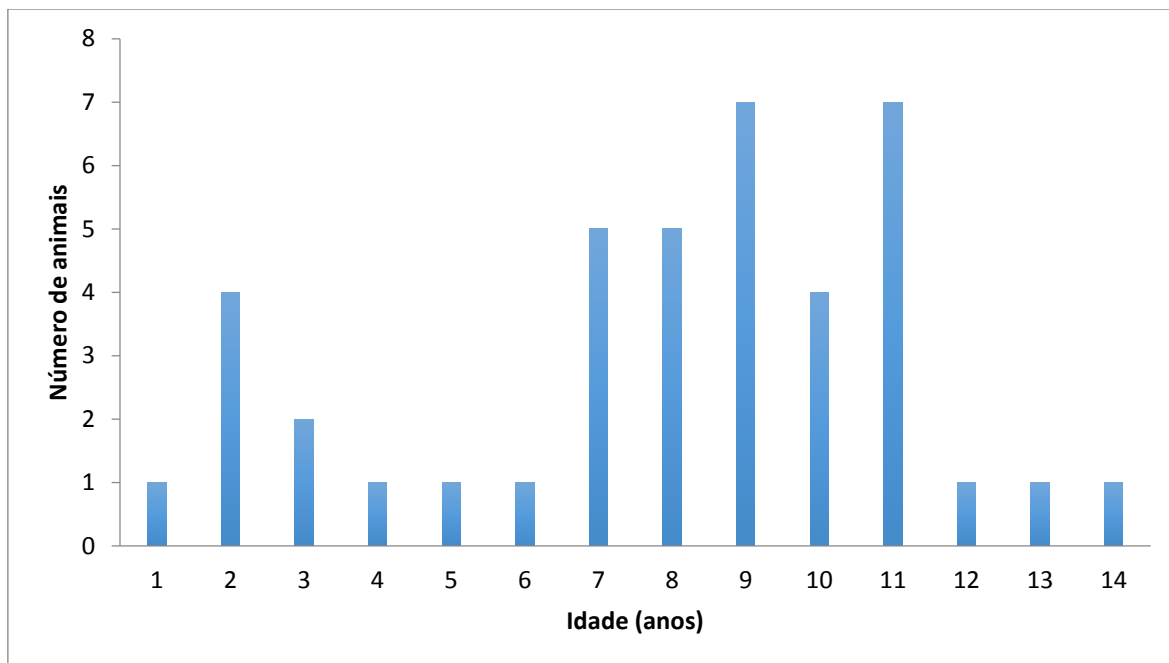


Figura 1- Histograma apresentando a distribuição de cães com OSA de acordo com a idade (n=41).

De acordo com a massa corporal, os animais foram categorizados segundo com o porte em: 14% (6/41) pequeno (<10kg), 61% (25/41) grande (21-40kg) e 24,4% (10/41) gigante (>41kg), não sendo observados, neste estudo, animais de médio porte (11-20kg). A distribuição de frequência de acordo com o porte é apresentada na figura 2. Tjalma (1966), Ru et al (1998), reforçam a teoria de que cães de portes grande e gigante são mais acometidos e apresentam maior risco de desenvolvimento de OSA. Porém, os autores verificaram haver uma forte e consistente associação de osteossarcoma com a alta estatura do que com o peso, sugerindo que o crescimento rápido pode constituir um fator de risco para surgimento desta neoplasia. Na análise de sobrevida de acordo com o porte dos animais, foi observada diferença significativa ($P=0.0016$) entre os grupos, sendo observada maior tempo de sobrevida em animais de menor peso. O grupo de animais de pequeno porte atingiu a mediana aos 150 dias, médio porte, mediana aos 100 dias. Menor tempo de sobrevida estava associado a cães de grande porte com mediana aos 27 dias (Figura 3).

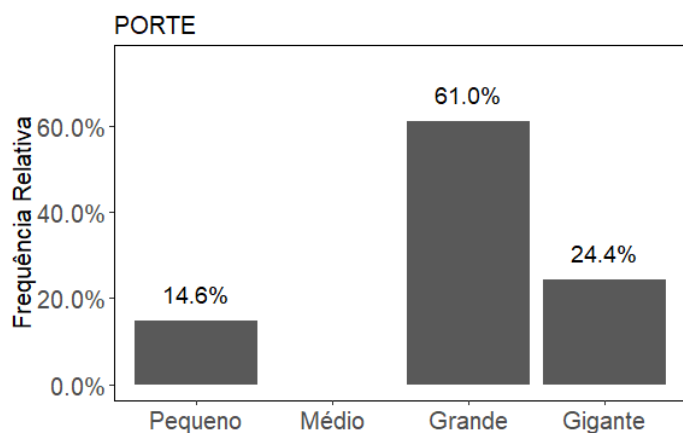


Figura-2: Frequência e distribuição de 41 cães com osteossarcoma de acordo com o porte.

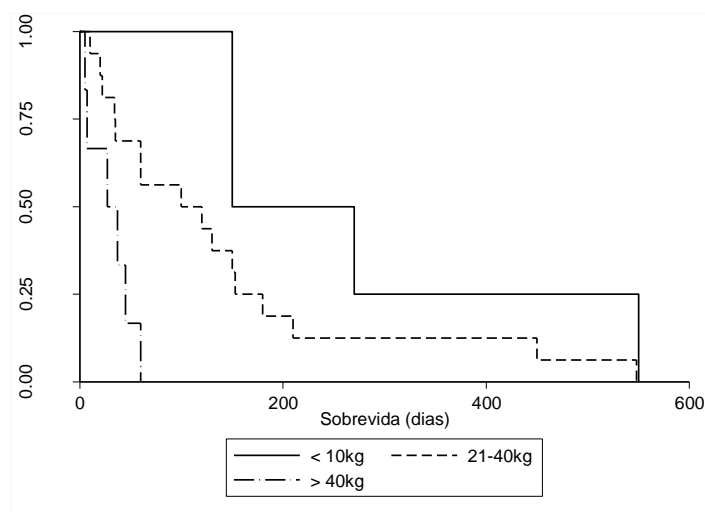


Figura 3 – Curva de sobrevivência global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA classificados de acordo com o peso corporal em: pequeno (<10Kg), mediana aos 150 dias; médio (21-40Kg), mediana aos 100 dias e grande (>40Kg) porte, mediana aos 27 dias (P= 0.0016).

De acordo com a distribuição racial, 80,95% (34/42) dos pacientes eram de raça e 19 % (8/42) eram sem raça definida (SRD). Maior frequência foi observada em cães da raça Rottweiler (26%; 11/42), seguido de SRD (19%; 8/42) e Golden retriever (14%; 6/42) (Figura 4). Apenas em um caso não havia a informação referente a raça nos prontuários.

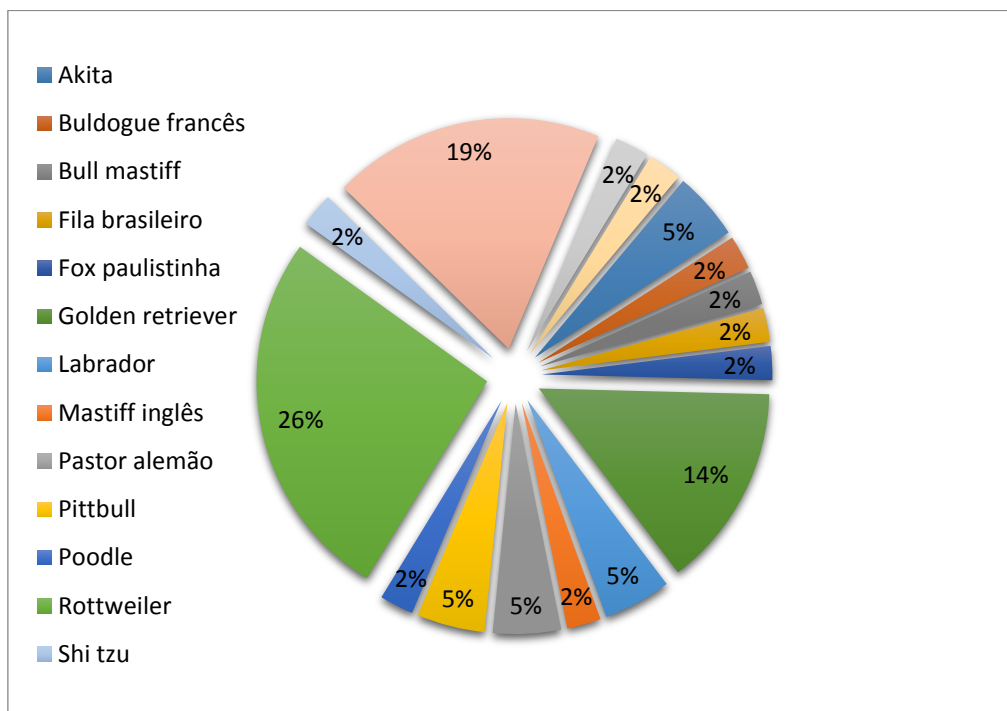


Figura 4 – Frequência e distribuição das raças de 43 cães com osteossarcoma

Segundo Spodnick et al., (1992) a raça também se constitui um importante fator de risco para OSA, sendo os animais das raças de grande porte ou gigantes, os mais acometidos, corroborando com os resultados deste estudo onde se observou maior frequência de casos de OSA em cães Rottweiler e Golden retriever.

Informação quanto ao sexo dos animais estava presente em 98% (42/43) dos prontuários. Foi verificada uma proporção de 1:1 quanto à distribuição do sexo dos animais, portanto não houve diferença significativa na frequência de osteossarcoma entre os cães machos e fêmeas. De acordo com a literatura, geralmente os machos são mais pesados, de maior porte e crescimento mais rápido, quando comparados às fêmeas, apresentando maior risco de desenvolver osteossarcoma (Ling et al., 1974; Spodnick et al., 1992; Ru et al., 1998; Kirpensteijn et al., 2002). O fato de não haver diferença de distribuição quanto ao sexo, no presente estudo, pode estar associado ao fato de que na população de estudo a maioria das fêmeas eram de raças grandes a gigantes e apresentavam peso corpóreo elevado, assim como os machos.

A localização anatômica das lesões foi analisada em 81% (35/43) dos casos. Em 97,15% (34/35) dos animais as lesões ocorreram no esqueleto apendicular e em apenas 2,85% (1/35) no esqueleto axial. A distribuição e frequência da localização topográfica das lesões estão demonstradas na figura 5.

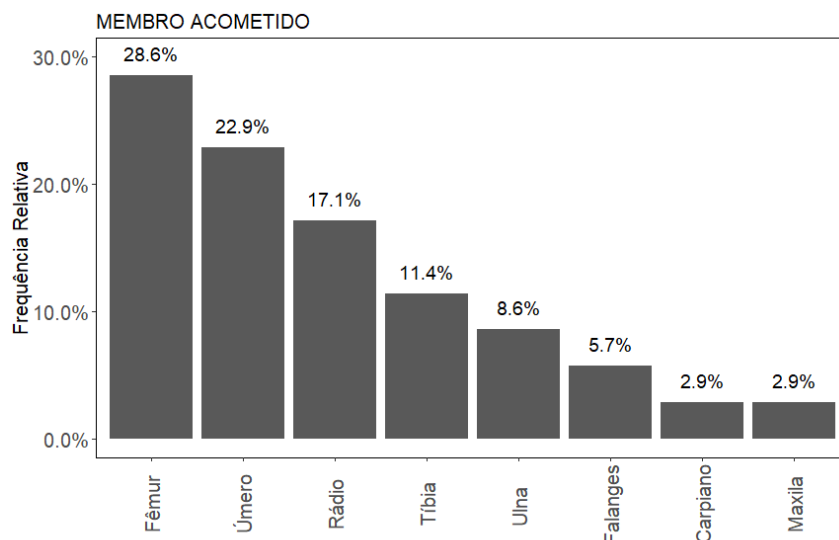


Figura 5- Frequência e distribuição da localização topográfica das lesões de 35 cães com osteossarcoma.

Em relação à distribuição anatômica das lesões, verificou-se expressiva frequência de osteossarcoma no esqueleto apendicular. Este achado está em concordância com Brodey e Riser, (1969), os quais observaram que o esqueleto apendicular é três a quatro vezes mais acometido que o axial.

A mensuração pré-cirúrgica do nível sérico de fosfatase alcalina foi avaliada em 79,1% (34/43) dos casos. Destes 76,5% (26/34) deles estavam dentro dos limites de referência (20-156UI/l) e 23.5% (8/34) apresentaram níveis acima do limite de referência.

Na avaliação da sobrevida global, de cães com OSA tratados somente com cirurgia, uma correlação significativa e negativa foi encontrada entre FA e sobrevida (figura 6), sendo observado menor sobrevida em pacientes com OSA com FA aumentado, mediana aos 27 dias em relação aos casos com níveis normais de FA, cuja mediana foi aos 130 dias (figura 7), dados semelhantes foram apontados pela literatura como os apontados por Garzotto et al. (2000), que afirmam que a FA elevada no pré cirúrgico é uma fator prognostico ruim.

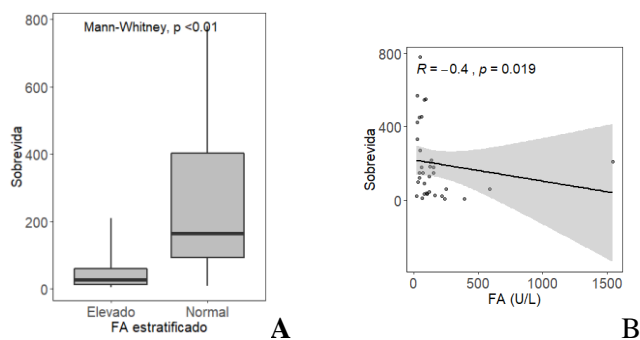


Figura 6 – A - Correlação de FA elevada e normal com a sobrevida global, em cães com OSA, demonstrando correlação significativa e negativa, pelo teste de Mann – Whitney ($P < 0,01$) $n = 34$ cães. **B-** Correlação do nível sérico de FA com a sobrevida de 34 cães com OSA, demonstrando correlação significativa e negativa, pelo teste de Spearman ($P = 0,019$) $n = 34$ cães.

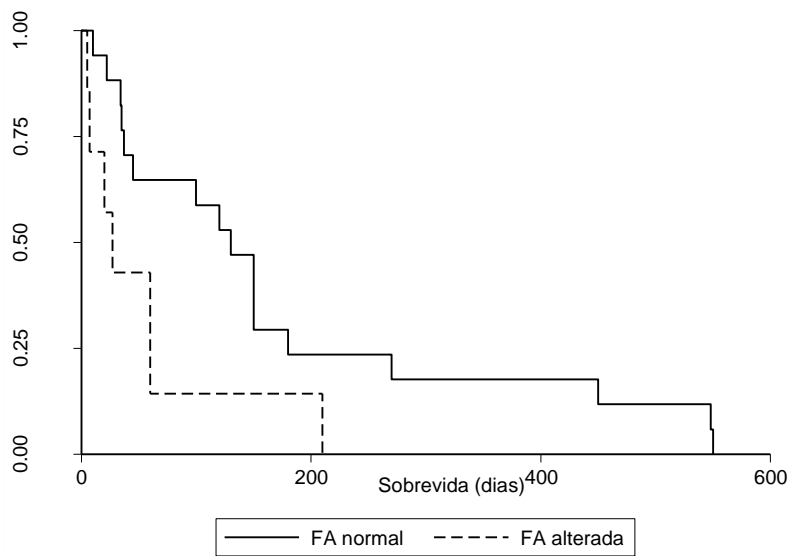


Figura 7 – Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA, tratados somente com cirurgia, classificados de acordo com o nível sérico e fosfatase alcalina: FA normal mediana aos 130 dias e FA aumentada mediana aos 27 dias ($P=0.0385$), $n=24$ cães.

5.2 EXAME CITOLÓGICO

Em 37,2% (16/43) dos casos foram realizadas punções aspirativas por agulha fina (PAAF) no osso acometido, o qual apresentava aumento de volume e/ou alteração radiográfica. Em 81,3% (13/16) dos casos o diagnóstico citológico foi compatível com neoplasia mesenquimal maligna e/ou sugestivo de osteossarcoma e em 18,75% (3/16) dos casos o exame citológico foi inconclusivo. Os achados demonstram haver uma grande concordância entre o resultado citológico e o diagnóstico histopatológico, corroborando com os achados de Kumar et al., (1993) e Teixeira et al.,(2010) que citam a PAAF como meio auxiliar de diagnóstico. Dessa forma, enfatiza-se a importância da punção aspirativa como um auxílio valioso para o diagnóstico clínico em casos com suspeita de OSA.

Nos esfregaços foram encontradas células mesenquimais neoplásicas com várias alterações citopatológicas indicativas de osteossarcoma, como: anisocitose, citoplasma basofílico e pouco vacuolizado, presença de matriz osteoide, cromatina nuclear grosseira e nucléolos evidentes. Os osteóides (Figura 7) são caracterizados pelo material fibrilar de coloração rósea claro, essas estruturas nem sempre são evidentes em aspirados de casos suspeitos de OSA, mas sua presença é um forte indicativo de OSA.

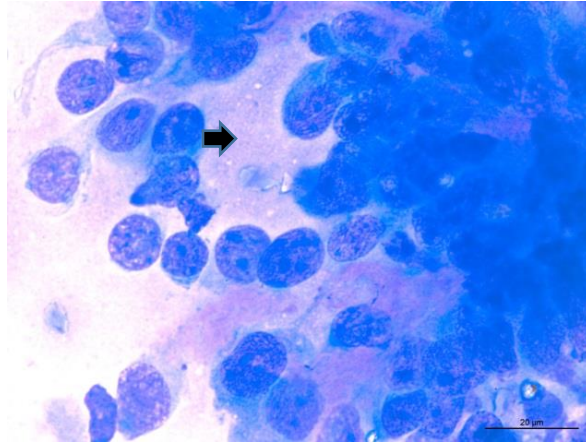


Figura 8- Citologia aspirativa por agulha fina de osteossarcoma canino, coloração rápida, (1000x), presença de vários osteoblastos apresentando padrão de cromatina grosseira, nucléolos múltiplos e proeminentes, núcleo arredondado e periférico, nota-se também a presença de material amorfo róseo compatível com osteóide (seta).

5.3 CLASSIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

Os exames histopatológicos revelaram proliferação de células neoplásicas mesenquimatosas formando massas densas infiltrativas, com produção variável de osteóide por estas células. As células apresentaram índice mitótico, pleomorfismo e anaplasia elevados, caracterizadas por hiperchromatismo e aumento de volume. Em relação à quantidade e composição da matriz tumoral houve variação entre os tipos tumorais ou em um mesmo tumor, desde a composição típica osteóide, a fibrosa ou condróide.(figura 8). Na totalidade dos casos foram observadas áreas de hemorragia e necrose. De acordo com as características acima e baseados na classificação histológica de Thompson e Pool, (2008), os resultados da análise de 43 casos foram os seguintes, em ordem decrescente de frequência: osteoblásticos (31/43 casos – 72,097%); condroblásticos (4/43casos – 9,3 %); telangiectásico (3/43 casos – 6,9 %) ; osteossarcoma tipo células gigantes (3/43 casos – 6,9%); fibroblásticos (2/43 casos – 4,6 %). A maior frequência de OSA osteoblástico (79%) encontrado neste trabalho assemelha-se aos achados por Kirpensteijn et al.,(2002) e Thompson e Pool (2008), (Figura 9).

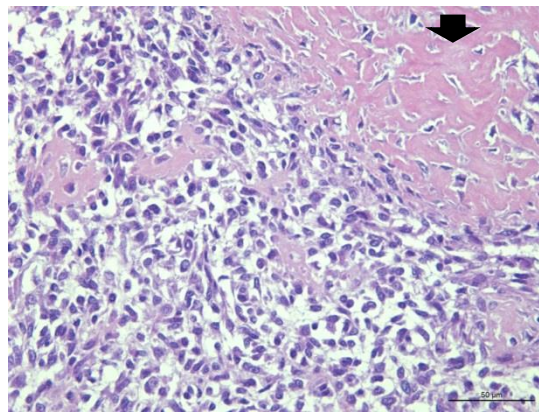


Figura 9- Osteossarcoma canino, tipo osteoblástico produtivo. H.E (400 x) – Células neoplásicas osteoblásticas atípicas, entremeadas por abundante quantidade de matriz osteóide (seta).

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 Thompson e Dittner (2017).

Na análise de sobrevida global de pacientes tratados somente com cirurgia em relação aos subtipos histológicos, não foi observado diferença significativa no tempo de sobrevida entre os grupos ($p=0,257$), sendo observado uma mediana: de 45, 34, 60 dias em pacientes com OSA osteoblástico produtivo, telangectásico, osteoblástico não produtivo, respectivamente.

A graduação histológica foi possível em 27 casos, sendo observadas as seguintes frequências: grau I (5 casos- 18,5%); grau II (13 casos – 48,1%) e grau III (9 casos – 33,4%).

Em relação ao grau histológico de 16 casos tratados somente com cirurgia (Grau I=3 casos, II= 8 casos e III=5 casos), não houve diferença estatística na avaliação de sobrevida global ($P=0.1241$). Medianas: grau I=100 dias, II=35 dias e III= 60 dias. A avaliação do grau histológico é de difícil concordância entre patologistas, o que pode justificar o fato de no presente estudo não ter-se encontrado valor prognóstico do grau histológico em OSA canino, através de análise de sobrevida. Outros estudos como o de Schott et al. (2018) avaliaram o grau histológico em OSA e também não encontraram correlação com a sobrevida. Foi encontrada uma correlação positiva marginalmente significativa entre graduação histológica e o índice proliferativo mesurado pelo ki 67 (figura 10), corroborando assim com Kirpensteijn et al. (2002) que afirmam relação direta entre a graduação e agressividade tumoral.

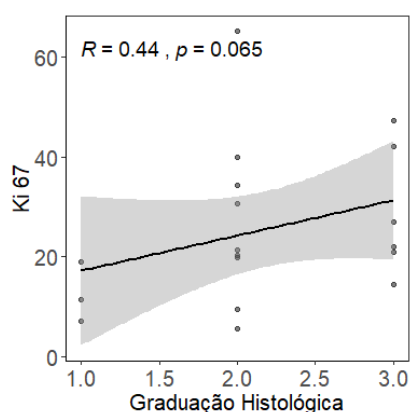


Figura 10- Correlação entre índice de ki67 e graduação histológica de 27 casos de OSA canino, havendo uma correlação positiva e marginalmente significativa. Teste de Spermán ($P=0,065$).

5.4 OPÇÃO TERAPEUTICA

Tanto a carboplatina quanto a doxorubicina são quimioterápicos aceitos para o tratamento do osteossarcoma apendicular; o agente quimioterápico específico e o número de doses para o padrão de cuidado não são definidos universalmente. Os cães considerados como tratados neste estudo receberam um mínimo de quatro doses de carboplatina ($300\text{mg}/\text{m}^2$) ou doxorubicina ($30\text{mg}/\text{m}^2$) de agente único após a amputação com intervalo de 21 dias, no entanto, alguns cães receberam tratamentos alternados com ambas as drogas. Embora o regime de quimioterapia tenha variado na população estudada, os protocolos estavam em conformidade com o padrão de atendimento do setor de oncologia do HV-UFGM.

Houve diferença estatística significativa na avaliação de sobrevida global de animais tratados somente com cirurgia perfazendo um total de 21 casos com mediana de 60 dias, em relação aos

15 casos onde houve complementação com quimioterapia adjuvante, os quais apresentaram mediana de 333 dias ($P=0,0003$) (figura 11). O incremento no tempo de sobrevida foi notado no presente estudo havendo diferença estatística significativa nos pacientes que receberam quimioterapia adjuvante (figura 12), concordando com dados da literatura apresentados por Ehrhart et al. (2013). Assim, no presente estudo, o tratamento adjuvante com carboplatina e/ou carboplatina e doxorrubicina foi importante para intervir na evolução da doença resultado em maior sobrevida e manutenção da qualidade de vida dos pacientes com OSA. Reforça-se portanto, o impacto e a importância da complementação adjuvante ao tratamento cirúrgico nos casos, sendo a cirurgia um tratamento paliativo sem impacto significativo na sobrevida destes pacientes.

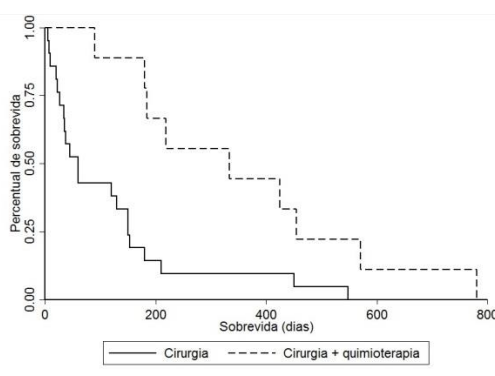


Figura 11 – Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA, distribuídos conforme a opção terapêutica, a mediana correspondeu a 60 dias para os animais tratados apenas cirurgia, e de 333 dias os para aqueles que receberam quimioterapia adjuvante ($P=0,0003$) $n=36$ cães.

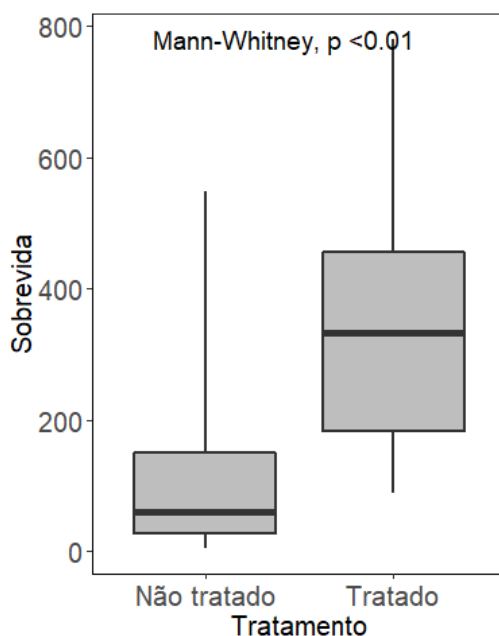


Figura 12- Comparação da mediana de sobrevida conforme tratamento, em cães com OSA, demonstrando correlação significativa e positiva, pelo teste de Mann – Whitney ($P < 0,01$) $n= 36$ cães.

5.5 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

O método imuno-histoquímico 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 mesmo as amostras serem provenientes de um único laboratório, foram coletadas em diferentes tempos, meses e até anos, antes de serem processadas para a análise imuno-histoquímica. No caso do OSA, os fragmentos receberam 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, o que justifica alguns casos não apresentarem marcação e outros apresentarem marcações inespecíficas.

A maioria dos casos apresentou baixo escore de marcação para Cox 2 em ambos os critérios de avaliação realizado nesse estudo, conforme relatado por Mullins et al., (2004), a maioria dos tumores em cães tem pouca ou moderada marcação, similar ao encontrado em tumores primários em humanos, sendo assim a análise de correlação da variável Cox 2 com as demais, assim como a correlação com a sobrevida foram excluídas do presente trabalho. As áreas de necrose apresentaram marcações, possivelmente em virtude da degradação das membranas celulares e de outras estruturas que catalisam o ácido araquidônico em prostaglandinas tornando a imunomarcação possível. Áreas próximas de necrose foram também encontradas imunomarcações positivas por Mullins et al., (2004) em casos de OSA em humanos.

Em 70% (19/27) dos blocos disponíveis para avaliação imuno-histoquímica utilizando-se o Ki67, ocorreu imunomarcação satisfatória com média de $24,95 \pm 15,22\%$ (Figura 13) Atribui-se provavelmente a motivos pré analíticos como a descalcificação, a ausência de marcação em alguns casos. O menor valor para índice de proliferação celular foi de 5,6% e o maior de 65,10%. Utilizando-se a referência do ponto de corte do Ki67 em 20%, uma correlação positiva foi encontrada com a sobrevida global onde ($P= 0.0292$), no grupo de $Ki67 < 20\%$ a mediana foi de 150 dias e com $Ki67 > 20\%$ mediana foi aos 37 dias (Figura-14).

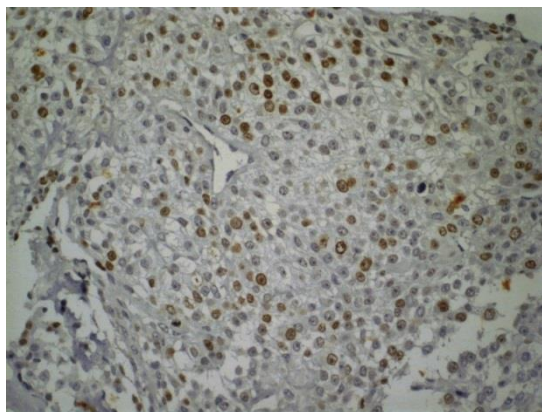


Figura 13- Micrografia evidenciando imunomarcação para Ki-67 em inúmeras células neoplásicas com marcação nuclear, caracterizando o elevado índice de proliferação celular (65%) em osteossarcoma osteoblástico produtivo (400x).

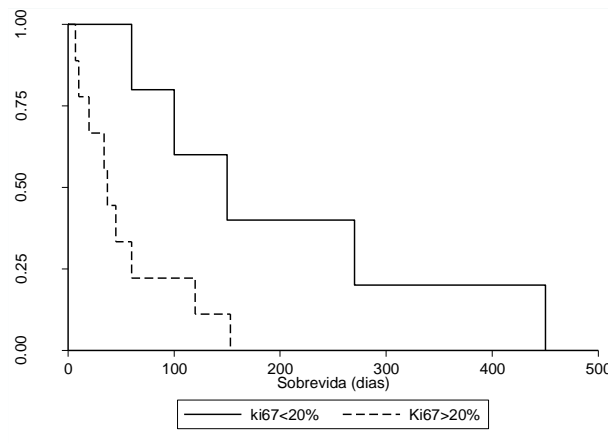


Figura 14- Curva de sobrevida global derivada de Kaplan-Meier para cães com OSA, distribuídos conforme a índice de Ki67, a mediana correspondeu a 150 dias para os animais com $ki\ 67 < 20\%$, e de 37 dias para aqueles com $ki\ 67 > 20\%$ ($P=0,0292$) $n=19$ cães.

O OSA possuiu um caráter heterogêneo dificultando assim a determinação de um ponto de corte para o índice de proliferação celular pelo Ki-67 com boa correlação com o comportamento biológico, uma vez que foram verificadas diferenças na proporção de células tumorais imuno marcadas, em áreas de células fenotipicamente distintas. Esta particularidade pode ter importância relevante no comportamento biológico do osteossarcoma, influenciando no grau de agressividade ou no resultado da terapia. Estas observações estão em concordância com as de Cavalcanti (2007), que sugere que, uma precisa determinação do índice de proliferação celular pode ser realizada através da combinação da análise das características proliferativas das células tumorais com métodos de avaliação do fenótipo celular. OHTA et al. (2004), sugerem que sejam colhidas diversas amostras do tumor para garantir bons resultados na análise com Ki-67.

6. CONCLUSÕES

A avaliação de fatores prognósticos clínicos, anátomos-patológicos e imuno-histoquímicos, são relevantes para o clínico veterinário no diagnóstico e programação terapêutica do OSA.

A massa corporal mostrou ser um fator prognóstico, onde cães mais leves tendem a ter maior sobrevida.

A fosfatase alcalina alta é um fator prognóstico desfavorável para cães com osteossarcoma.

O índice de proliferação celular expresso pelo ki67 é um fator prognóstico desfavorável a partir de um ponto de corte (20%), podendo ser utilizado como uma ferramenta auxiliar no planejamento terapêutico.

A complementação terapêutica com quimioterapia adjuvante aumenta a sobrevida dos pacientes com OSA em mais de cinco vezes e traz melhores condições para a manutenção de uma boa qualidade de vida.

Essas valiosas informações facilitam as propostas e decisões em relação ao tratamento e conduta clínica, evitando eutanásias precipitadas e garantindo a melhoria qualidade da vida e perspectiva de vida para esses cães.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.; LENNERNÄS, B.; NORRBY, K. Low-dosage metronomic chemotherapy and angiogenesis: topoisomerase inhibitors irinotecan and mitoxantrone stimulate VEGF-A-mediated angiogenesis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 120, n. 2, p. 147–56, fev. 2012.

ARTHUR, E. G. et al. Risk of Osteosarcoma in Dogs After Open Fracture Fixation. **Veterinary Surgery**, v. 45, n. 1, p. 30–35, jan. 2016.

BARGER, A. et al. Use of Alkaline Phosphatase Staining to Differentiate Canine Osteosarcoma from Other Vimentin-positive Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 161–165, 26 mar. 2005.

BECH-NIELSEN, S. et al. Frequency of Osteosarcoma Among First-Degree Relatives of St. Bernard Dogs. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 60, n. 2, p. 349–353, 1 fev. 1978.

BERG, J. et al. Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 10, p. 1555–60, 15 maio 1995.

BERZINA, I. et al. Correlation between cytologic and histopathologic diagnoses of bone lesions in dogs: a study of the diagnostic accuracy of bone cytology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 332–338, 1 set. 2008.

BHANDAL, J.; BOSTON, S. E. Pathologic Fracture in Dogs with Suspected or Confirmed Osteosarcoma. **Veterinary Surgery**, v. 40, n. 4, p. 423–430, jun. 2011.

BOERMAN, I. et al. Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma - a meta-analysis. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 56, 15 maio 2012.

BOSTON, S. et al. Osteosarcoma masked by osteomyelitis and cellulitis in a dog. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 23, n. 5, p. 366–371, 25 ago. 2010.

BOULAY, J. P.; WALLACE, L. J.; LIPOWITZ, A. J. Pathological fracture of long bones in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 23, n. 3, p. 297–303, 16 dez. 1987.

BRODEY, R. S.; RISER, W. H. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 62, p. 54–64, jan 1969.

BUTANY, J.; AHN, E.; LUK, A. Drug-related cardiac pathology. **Journal of Clinical Pathology**, v. 62, n. 12, p. 1074–1084, 1 dez. 2009.

CASSALI, G. D. et al. **Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors** *Braz J Vet Pathol*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.bjvp.org.br>. Acesso em: 1 dez. 2018.

CAVALCANTI, J. N. Osteossarcoma canino: estudo histopatológico, imunoistoquímico e da

atividade proliferativa. 2007.

CHUN, R.; DE LORIMIER, L.-P. Update on the biology and management of canine osteosarcoma. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 491–516, vi, maio 2003.

DAHLIN, D. C.; UNNI, K. K. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. **The American journal of surgical pathology**, v. 1, n. 1, p. 61–72, mar. 1977.

DAVIS, G. J. et al. Comparison of radiography, computed tomography, and magnetic resonance imaging for evaluation of appendicular osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 8, p. 1171–6, 15 abr. 2002.

EBERLE, N. et al. Comparison of examination of thoracic radiographs and thoracic computed tomography in dogs with appendicular osteosarcoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 2, p. 131–140, 1 jun. 2011.

EHRHART, N. et al. Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 7, p. 1002–6, 1 out. 1998.

EHRHART, N. P.; RYAN, S. D.; FAN, T. M. Tumors of the Skeletal System. In: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 463–503.

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

FENGER, J. M.; LONDON, C. A.; KISSEBERTH, W. C. Canine Osteosarcoma: A Naturally Occurring Disease to Inform Pediatric Oncology. **ILAR Journal**, v. 55, n. 1, p. 69–85, 1 jan. 2014.

FRIMBERGER, A. E.; CHAN, C. M.; MOORE, A. S. Canine Osteosarcoma Treated by Post-Amputation Sequential Accelerated Doxorubicin and Carboplatin Chemotherapy: 38 Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 52, n. 3, p. 149–56, maio 2016.

GARZOTTO, C. K. et al. Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Activity in Canine Appendicular Osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 587–592, nov. 2000.

GASPARINI, G. et al. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? **The Lancet. Oncology**, v. 4, n. 10, p. 605–15, out. 2003.

GEIGER, S. et al. Anticancer therapy induced cardiotoxicity: review of the literature. **Anti-Cancer Drugs**, v. 21, n. 6, p. 578–590, jul. 2010.

HAMMER, A. et al. 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, jul. 1995.

HILLERS, K. R. et al. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1364–7, 15 abr. 2005.

KERBEL, R. S.; KAMEN, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 6, p. 423–436, 1 jun. 2004.

- KIM, M. S. et al. Prognostic effect of pathologic fracture in localized osteosarcoma: A cohort/case controlled study at a single institute. **Journal of Surgical Oncology**, v. 100, n. 3, p. 233–239, 1 set. 2009.
- KIRPENSTEIJN, J. et al. Prognostic Significance of a New Histologic Grading System for Canine Osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 2, p. 240–246, 26 mar. 2002.
- KUMAR, R. V et al. Aspiration biopsy cytology of primary bone lesions. **Acta cytologica**, v. 37, n. 1, p. 83–9, 1993.
- KUNTZ, C. et al. Extraskelatal osteosarcomas in dogs: 14 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 1, p. 26–30, jan. 1998.
- LANGDON, S. P. Animal modeling of cancer pathology and studying tumor response to therapy. **Current drug targets**, v. 13, n. 12, p. 1535–47, nov. 2012.
- LARUE, S. M. et al. Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 12, p. 1734–44, 15 dez. 1989.
- LASCELLES, B. D. X. et al. Improved Survival Associated With Postoperative Wound Infection in Dogs Treated With Limb-Salvage Surgery for Osteosarcoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 12, n. 12, p. 1073–1083, 28 dez. 2005.
- LAVALLE, G. E. et al. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275–1280, 15 nov. 2009.
- LEACH, T. N. et al. Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 2, p. 102–112, jun. 2012.
- LEIBMAN, N. F. et al. Accuracy of radiography, nuclear scintigraphy, and histopathology for determining the proximal extent of distal radius osteosarcoma in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 3, p. ajvet0300240, 1 jun. 2001.
- LING, G. V; MORGAN, J. P.; POOL, R. R. Primary bone tumors in the dog: a combined clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 1, p. 55–67, 1 jul. 1974.
- LIPTAK, J. M. et al. Cortical Allograft and Endoprosthesis for Limb-Sparing Surgery in Dogs with Distal Radial Osteosarcoma: A Prospective Clinical Comparison of Two Different Limb-Sparing Techniques. **Veterinary Surgery**, v. 35, n. 6, p. 518–533, 1 ago. 2006.
- LOUKOPOULOS, P.; ROBINSON, W. F. Clinicopathological Relevance of Tumour Grading in Canine Osteosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 1, p. 65–73, 1 jan. 2007.
- MAULDIN, G. N. et al. Canine osteosarcoma. Treatment by amputation versus amputation and adjuvant chemotherapy using doxorubicin and cisplatin. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 2, n. 4, p. 177–80, dez 1988.
- MAYER, M. N.; GRIER, C. K. Palliative radiation therapy for canine osteosarcoma. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, v. 47, n. 7, p. 707–9, jul. 2006.
- MILLANTA, F. et al. Immunohistochemical Expression of COX-2, mPGES and EP2 Receptor

in Normal and Reactive Canine Bone and in Canine Osteosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 2–3, p. 153–160, ago. 2012.

MORELLO, E.; MARTANO, M.; BURACCO, P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 3, p. 268–277, set. 2011.

MULLINS, M. N. et al. Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Appendicular Osteosarcomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 6, p. 859–865, 1 nov. 2004.

NEMANIC, S.; LONDON, C. A.; WISNER, E. R. Comparison of Thoracic Radiographs and Single Breath-Hold Helical CT for Detection of Pulmonary Nodules in Dogs with Metastatic Neoplasia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 508–515, 1 maio 2006.

O'BRIEN, M. G. et al. Resection of pulmonary metastases in canine osteosarcoma: 36 cases (1983-1992). **Veterinary surgery : VS**, v. 22, n. 2, p. 105–9, abril 1993.

OHTA, G. et al. Assessment of Proliferative Potentials of Canine Osteosarcomas and Chondrosarcomas by MIB-1 Immunohistochemistry and Bromodeoxyuridine Incorporation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, n. 1, p. 18–27, jul. 2004.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177–185, fev. 2010.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147–156, 1 fev. 2008.

POWERS, B. E. et al. Jamshidi needle biopsy for diagnosis of bone lesions in small animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 2, p. 205–10, 15 jul. 1988.

PRIOLO, F.; CERASE, A. The current role of radiography in the assessment of skeletal tumors and tumor-like lesions. **European journal of radiology**, v. 27 Suppl 1, p. S77-85, maio 1998.

RANA, R. S.; WU, J. S.; EISENBERG, R. L. Periosteal Reaction. **American Journal of Roentgenology**, v. 193, n. 4, p. W259–W272, out. 2009.

REINHARDT, S. et al. Assessment of cytological criteria for diagnosing osteosarcoma in dogs. **The Journal of small animal practice**, v. 46, n. 2, p. 65–70, fev. 2005.

ROSENBERGER, J. A.; PABLO, N. V.; CRAWFORD, P. C. Prevalence of and intrinsic risk factors for appendicular osteosarcoma in dogs: 179 cases (1996–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 7, p. 1076–1080, 1 out. 2007.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 380–388, jul. 2011.

RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L. T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 156, n. 1, p. 31–39, 1 jul. 1998.

RUBIN, J. A. et al. Factors associated with pathological fractures in dogs with appendicular primary bone neoplasia: 84 cases (2007–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 8, p. 917–923, 15 out. 2015.

SAWYER, D. B. et al. Mechanisms of Anthracycline Cardiac Injury: Can We Identify

Strategies for Cardioprotection? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 53, n. 2, p. 105–113, 1 set. 2010.

SCHMIDT, A. F. et al. Prognostic factors of early metastasis and mortality in dogs with appendicular osteosarcoma after receiving surgery: An individual patient data meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 3–4, p. 414–422, 1 nov. 2013.

SCHMIDT, A. F. et al. Chemotherapy effectiveness and mortality prediction in surgically treated osteosarcoma dogs: A validation study. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 125, p. 126–134, 1 mar. 2016.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311–322, 1 mar. 2000.

SCHOTT, C. R. et al. Histologic Grade Does Not Predict Outcome in Dogs with Appendicular Osteosarcoma Receiving the Standard of Care. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 2, p. 202–211, 2018.

SELMIC, L. E. et al. Comparison of Carboplatin and Doxorubicin-Based Chemotherapy Protocols in 470 Dogs after Amputation for Treatment of Appendicular Osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 554–563, mar. 2014.

SHAPIRO, W. et al. Use of cisplatin for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 4, p. 507–11, 15 fev. 1988.

SHIMOSE, S. et al. Differential diagnosis between osteomyelitis and bone tumors. **Acta Radiologica**, v. 49, n. 8, p. 928–933, out. 2008.

SKORUPSKI, K. A. et al. Carboplatin versus alternating carboplatin and doxorubicin for the adjuvant treatment of canine appendicular osteosarcoma: a randomized, phase III trial. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, n. 1, p. 81–87, mar. 2016.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 3, p. 573–96, maio 2003.

SPODNICK, G. J. et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 995–9, 1 abr. 1992.

STOCKHAUS, C. et al. The value of cytology in the diagnosis of bone tumors in small animals. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere**, 2003.

STRAW, R. C. et al. Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 5, n. 4, p. 205–10, 1991.

STRAW, R. C.; WITHROW, S. J. Limb-sparing surgery versus amputation for dogs with bone tumors. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 26, n. 1, p. 135–43, jan. 1996.

TEIXEIRA, L. V. et al. Estudo clínico de osteossarcoma canino Clinical study of canine osteosarcoma. v. 38, n. 2, p. 185–190, 2010.

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

THOMPSON, J. P.; FUGENT, M. J. Evaluation of survival times after limb amputation, with and without subsequent administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 4, p. 531–3, 15 fev. 1992.

THOMPSON, K. G.; DITTNER, K. E. Tumors of bone. in Meuten DJ (ed): **Tumors in Domestic Animals**, 5th ed, p. 356–424, 2017.

THOMPSON, K. G.; POOL, R. R. Tumors of Bones. In: **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 245–317.

TJALMA, R. A. Canine bone sarcoma: estimation of relative risk as a function of body size. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 36, n. 6, p. 1137–50, jun. 1966.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. **Scientific American**, v. 275, n. 3, p. 62–70, set. 1996.

8. ANEXOS

Anexo 1- Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 149/2018
Título do projeto: Classificação histológica, avaliação dos fatores prognósticos e correlação com sobrevida do osteossarcoma canino
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Roberto Baracat de Araujo
Unidade: Escola de Veterinária
Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 01/10/2018. Validade: 01/10/2018 à 30/09/2023
Belo Horizonte, 01/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@pro.ufmg.br

