

JOSEMARA NEVES CAVALCANTI

OSTEOSSARCOMA CANINO:

estudo histopatológico, imunoistoquímico e da
atividade proliferativa

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN

CAMPINAS

2007

JOSEMARA NEVES CAVALCANTI

OSTEOSSARCOMA CANINO:

estudo histopatológico, imunoistoquímico e da
atividade proliferativa


*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médi-
cas, área de Ciências Biomédicas da aluna Jo-
semara Neves Cavalcanti.
Campinas, 15 de fevereiro de 2007.

CAMPINAS

2007


Prof. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden
Orientadora.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C314o Cavalcanti, Josemara Neves
Osteosarcoma canino: estudo histopatológico, imunoistoquímico e da atividade proliferativa / Josemara Neves Cavalcanti. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Eliane Maria Ingrid Amstalden
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tumores. 2. Cães. 3. Proliferação celular. 4. Ossos. 5. Anticorpos monoclonais. 6. Osteossarcoma – Diagnóstico. 7. Imunohistoquímica – Diagnóstico. 8. Câncer – Diagnóstico. I. Amstalden, Eliane Maria Ingrid. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Canine osteosarcoma: a study on hystopathology, immunohistochemistry and proliferative activity”

Keywords: • Tumors

- Dogs
- Cell proliferation
- Bones
- Monoclonal antibodies
- Osteosarcoma – Diagnosis
- Immunohistochemistry – Diagnosis
- Neoplasm – Diagnosis

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Profa. Dra. Patrícia Sabino de Matos

Prof Dr Leandro Luiz Lopes de Freitas

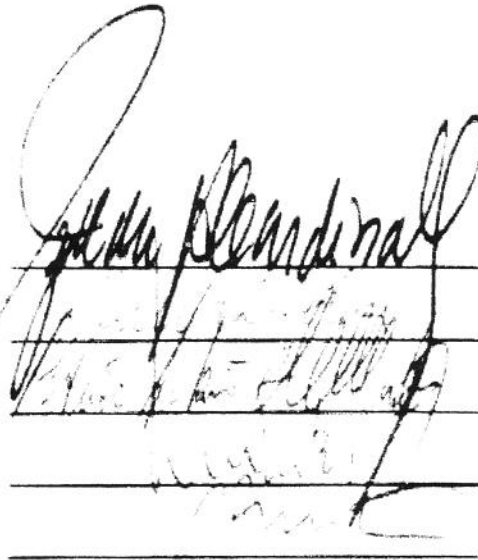
Data da defesa: 15-02-2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliane Maria Ingrid Amstalden

Membros:

Professora Doutora Izilda Aparecida Cardinalli
Professora Doutora Noeme Sousa Rocha
Professora Doutora Patrícia Sabino de Matos
Professor Doutor Leandro Luiz Lopes de Freitas
Professora Doutora Eliana Maria Ingrid Amstalden



Handwritten signatures of the board members, including Izilda Aparecida Cardinalli, Noeme Sousa Rocha, Patrícia Sabino de Matos, Leandro Luiz Lopes de Freitas, and Eliana Maria Ingrid Amstalden.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/02/2007

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Bruno, por ter me possibilitado enxergar os mundos, material e espiritual, por outros ângulos.

Aos meus pais, exemplos de dedicação à família e compromisso com o trabalho.

Aos meus irmãos, fiéis companheiros de jornada, pelo apoio e estímulo.

Ao Sr. Teodoro e Márcia, por terem me adotado como filha, em momentos cruciais da minha vida.

Às minhas avós Otília e Sebastiana (in memoriam), exemplos de mulheres fortes e dedicadas à família.

Aos meus mestres, de todos os níveis, pela maior das lições: “o saber deve ser degustado como fina iguaria”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado perseverança, tolerância e paciência, para enfrentar as vicissitudes da vida!

À Dr.a Ingrid pela oportunidade e por compartilhar seus conhecimentos de forma tão altruísta.

À Patologista Médica Veterinária Priscilla Taboada, do HISTOPET® (Serviço de Anatomia Patológica Veterinária) e ao Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Campus Botucatu, em especial à Prof.a Livre Docente Noeme Souza Rocha, por terem gentilmente permitido o acesso a seus arquivos e disponibilizado seus materiais, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento deste projeto, protocolado sob o n.o 04/08766-3R.

Aos funcionários do laboratório de Patologia Experimental / CAISM, pelo auxílio prestado no processamento dos materiais, especialmente ao Júlio César e Marisa.

Aos professores, médicos assistentes e médicos residentes do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/UNICAMP, pela disponibilidade em ajudar e pelo estímulo na busca de novos conhecimentos científicos.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/UNICAMP, em especial à Maria do Carmo, Adilson e Elizabeth, pela paciência e apoio.

À minha amiga Ana Rita Moraes Nardi, pela paciência e disposição em revisar o texto deste trabalho.

Á minha amiga Rita de Cássia, pelo desprendimento em disponibilizar algumas horas, do seu precioso tempo, para auxiliar-me e confortar-me em momentos decisivos.

Aos meus colegas e amigos pós-graduandos, pelo estímulo, respeito e, principalmente, pela amizade que nasceu enquanto trilhávamos este novo caminho.

A todos meus amigos queridos (melhor não citar nomes. Corro o risco de omitir algum nome...), que me apóiam e me estimulam a cada novo desafio!

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Classificação histológica e gradação dos osteossarcomas caninos.....	22
1.2- Aspectos histogenéticos dos osteossarcomas.....	27
1.3- Imunologia e osteossarcomas.....	28
2-JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	34
3- OBJETIVOS	37
3.1- Objetivo geral.....	38
3.2- Objetivos específicos.....	38
4- MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1- Caracterização da casuística.....	40
4.2- Dados clínicos.....	40
4.3- Avaliação e classificação histopatológica.....	40
4.4- Reação imunoistoquímica.....	41
4.5- Avaliação imunoistoquímica.....	43
4.6- Análise estatística.....	44
4.7- Aprovação do Comitê de Ética.....	44
5- RESULTADOS	45
5.1- Dados clínicos.....	46
5.2- Achados histopatológicos.....	48

5.3- Análise imunoistoquímica com AE1/AE3, HHF35, Fator VIII, S-100, vimentina, 1A4, osteocalcina, CD31 e CD34.....	56
5.4- Análise imunoistoquímica com Ki-67 (MIB-1).....	62
6- DISCUSSÃO	70
6.1- Dados clínicos e histopatológicos.....	71
6.2- Análise imunoistoquímica com AE1/AE3, HHF35, Fator VIII, S-100, vimentina, 1A4, osteocalcina, CD31 e CD34.....	74
6.3- Análise imunoistoquímica com KI-67.....	78
7- CONCLUSÕES	81
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9- ANEXOS	92

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Classificação histopatológica dos osteossarcomas de animais domésticos. Sugerida por POOL (1990), baseada na Organização Mundial da Saúde (SLAYTER et al., 1994).....	26
Tabela 2- Freqüência da imunexpressão dos marcadores HHF35, S-100, vimentina, osteocalcina e 1A4, correlacionados com o subtipo histológico.....	56
Tabela 3- Correlação entre a imunexpressão de HHF35 e subtipos histológicos, em 43 casos de osteossarcoma canino.....	57
Tabela 4- Correlação entre a imunexpressão de proteína S-100 e subtipos histológicos de osteossarcoma canino.....	58
Tabela 5- Correlação entre a imunexpressão de vimentina e subtipos histológicos, em 55 casos de osteossarcoma canino.....	59
Tabela 6- Correlação entre a imunexpressão de osteocalcina e subtipos histológicos, em 45 casos de osteossarcoma canino.....	60
Tabela 7- Correlação entre a imunexpressão de 1A4 e subtipos histológicos de osteossarcoma canino.....	61
Tabela 8- Correlação entre a imunexpressão de Ki-67 e subtipos histológicos, em 53 casos de osteossarcoma canino.....	62
Tabela 9- Freqüências obtidas dos osteossarcomas caninos imunopositivos para Ki-67 (37 casos).....	63

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Distribuição e frequência das idades de 55 cães com osteossarcoma.....	46
Figura 2- Distribuição e frequência das raças de 58 cães com osteossarcoma.....	47
Figura 3- Distribuição e frequência da localização topográfica das lesões de 31 cães com osteossarcoma.....	47
Figura 4- Distribuição e frequência dos subtipos histológicos de 65 osteossarcomas caninos.....	49
Figura 5- Osteossarcoma osteoblástico produtivo. Figuras A (200 x) e B (400 x) – Células neoplásicas osteoblásticas atípicas, entremeadas por abundante quantidade de matriz osteóide, disposta em rede, que se entrelaça. Verificar áreas basofílicas de calcificação (setas).....	50
Figura 6- Osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo. Entre as células neoplásicas é visualizada escassa quantidade de osteóide, formando trama de aspecto delicado – setas. (200x) (HE).....	51
Figura 7- Osteossarcoma condroblástico. Figura A – células tumorais poliédricas envolvidas por matriz tumoral condróide. Osteóide não é visualizado neste campo microscópico (200 x). Figura B – detalhe figura A. Não visualizado osteóide (400x) (HE).....	52
Figura 8- Osteossarcoma fibroblástico. Figura A – Infiltração do espaço medular por células neoplásicas fusiformes, semelhantes à fibroblastos, dispostas em várias direções, conferindo padrão fasciculado. Destruição de tecido ósseo pré-existente (osso residual - seta preta). (200x). Figura B – Detalhe figura A. Discreta quantidade de osteóide tumoral pode ser observado no centro da figura – seta azul. (400x) (HE).....	53

Figura 9-	Osteossarcoma tipo células gigantes. Este subtipo é constituído por osteoblastos neoplásicos, aos quais estão entremeadas inúmeras células gigantes tumorais, multinucleadas, do tipo osteoclastos. Neste campo microscópico é mostrada mínima deposição de osteóide – setas (1000 x) (HE).....	54
Figura 10-	Osteossarcoma indiferenciado. Observar o padrão imaturo das células tumorais, as quais são pequenas e apresentam núcleos hipercromáticos e mitoses freqüentes. Neste subtipo de osteossarcoma tipicamente visualiza-se escassa quantidade de osteóide - seta (400 x) (HE).....	55
Figura 11-	Imunomarcaçã para HHF35 em osteossarcoma condroblástico (200x). Figura A - Imunorreatividade de padrão difuso, é observada no citoplasma das células neoplásicas. À esquerda pode ser visualizado osteóide tumoral (seta). Figura B – Não há imunoexpressão nas células condróides visualizadas no lado esquerdo do campo (cabeças de seta).....	64
Figura 12-	Imunoexpressão para proteína S-100 em osteossarcoma condroblástico. Figuras A (200x) e B (1000x) – Observar positividade apenas nas áreas condroblásticas da neoplasia.....	65
Figura 13-	Imunomarcaçã para vimentina. Figura A: imunoexpressão de padrão difuso é observada no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma osteoblástico. Ilhotas de osteóide tumoral podem ser visualizadas, entremeadas às células tumorais (setas) (200x). Figura B – marcaçã em células tumorais de áreas condroblásticas (400 x).....	66
Figura 14-	Imunomarcaçã para osteocalcina (400x). Figuras A e B: observar imunopositividade de padrão difuso (+++) em área de osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo, em A, e padrão condroblástico, em B. Notar que a matriz tumoral não exhibe imunoexpressão do anticorpo (setas).....	67

Figura 15-	Imunomarcção para 1A4 em osteossarcomas (200 x). Imunorreatividade de padrão difuso é observada no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma do tipo células gigantes, na figura A. Na figura B, a imunoexpressão ocorreu especialmente em células fusiformes, em osteossarcoma fibroblástico.....	68
Figura 16-	Imunomarcção para Ki-67. Figura A – Visão panorâmica mostrando inúmeras células neoplásicas com marcação nuclear, caracterizando o elevado índice de proliferação celular (grau altíssimo), em osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo (100x). Figura B. Detalhe da figura A (400x).....	69

RESUMO



O osteossarcoma destaca-se por ser o sarcoma mais comum dentre os tumores ósseos malignos, na espécie canina, e pelo seu alto potencial de agressividade. Do ponto de vista histológico é um tumor de padrão celular heterogêneo, que se caracteriza pela produção de matriz osteóide e/ou osso imaturo por osteoblastos. Apenas dois estudos sistemáticos, relativos ao osteossarcoma canino, foram identificados na literatura nacional. Um deles refere-se a dados epidemiológicos e o outro aborda achados clínico-morfológicos. Estudos objetivando a avaliação dos aspectos histogenéticos e do índice de proliferação celular não foram ainda descritos na literatura nacional. A proposta deste estudo foi determinar a diferenciação dos diversos elementos celulares constituintes do osteossarcoma canino e avaliar o índice de proliferação celular destes tumores, correlacionando-os com seus diferentes subtipos morfológicos, utilizando-se de imunomarcadores, tais como: vimentina, osteocalcina, proteína S -100, 1A4, HHF35, AE1/AE3, CD31, CD34 e Ki-67. Foi realizado estudo retrospectivo de 65 casos de cães portadores de osteossarcoma, os quais foram avaliados clinicamente quanto ao sexo, raça, idade e localização topográfica das lesões. Os tumores foram classificados quanto ao subtipo histológico em osteoblásticos pouco produtivos ou osteoblásticos produtivos (de acordo com a quantidade de osteóide produzido), condroblásticos, fibroblásticos, do tipo células gigantes, telangiectásicos e indiferenciados. Cães machos, da raça Rottweiler, com idade média de 7,4 anos, foram mais frequentemente afetados por osteossarcoma. Em 77,4 % dos casos as lesões ocorreram no esqueleto apendicular (fêmur). Os subtipos histológicos identificados foram: osteoblásticos (47,7%), fibroblásticos (23,1%), condroblásticos (21,5 %), do tipo células gigantes (4,7%), telangiectásicos (1,5%) e indiferenciados (1,5%). Em 98,2 % dos osteossarcomas houve reatividade para vimentina. Imunorreatividade à osteocalcina ocorreu em células osteoblásticas, condroblásticas e fibroblásticas de 91% dos osteossarcomas. Proteína S-100 foi expressa em 79,7% dos tumores, tendo ocorrido em todos os tumores condroblásticos. Proporção significativa de osteossarcomas reagiu positivamente aos anticorpos 1A4 e HHF35. Todos os osteossarcomas foram negativos para AE1/AE3e para CD31 e CD34. A imunomarcagem com Ki-67 revelou alto índice de proliferação celular em osteossarcomas osteoblásticos pouco produtivos. Os osteossarcomas caninos são constituídos por diversificada população de células, representadas por elementos osteoblásticos, condroblásticos, miofibroblásticos e

mioblásticos, os quais possivelmente, originam-se de uma única célula mesenquimal pluripotente ou de osteoblastos imaturos, que sofrem diferenciação diversificada. Osteossarcomas osteoblásticos pouco produtivos apresentaram índice expressivo de proliferação celular, o qual pode estar correlacionado a um caráter de agressividade mais acentuado.

ABSTRACT



Osteosarcoma is the most common of all malignant canine bone tumors and has a high aggressiveness potential. From the histological point of view it is a tumor with a heterogeneous cell pattern that is characterized by the production of bone matrix and/or immature bone by osteoblasts. Systematic studies with a clear objective to evaluate histogenetic aspects and the cellular proliferation index in canine osteosarcomas have not yet been published. The objective of this study was to determine the differentiation of the constituting cellular elements and evaluate the cellular proliferation index of these tumors correlating them with their different morphological subtypes, using markers such as: vimentin, osteocalcin, S-100 protein, 1A4, HHHF53, factor VIII, AE1/AE3, CD31, CD34 and Ki-67. A retrospective study was performed using 65 cases of canine osteosarcoma, clinically evaluated according to sex, breed, age and topography of the lesions. Tumors were classified according to their histological subtype: moderately productive osteoblastic tumor, productive tumor (both according to the production of osteoid matrix), chondroblastic tumor, fibroblastic tumor, giant cell tumor, telangiectatic tumor and undifferentiated tumors. Males from the Rottweiler breed with an average age of 7,4 years were more frequently affected by osteosarcoma. In 77,4% of cases, the lesions were on the appendicular skeleton (femur). The Identified histological subtypes were: osteoblastic (47,7%), fibroblastic (23,1%), chondroblastic (21,5 %), giant cell (4,7%), telangiectatic (1,5%) and undifferentiated (1,5%). In 98,2% of all tumors there was vimentin reactivity. Immunoreactivity to osteocalcin occurred in osteoblastic, chondroblastic and fibroblastic cells of 91% of all osteosarcomas. The S-100 protein was expressed in 79,7% of all tumors, and in 100% of the chondroblastic tumors. A significant proportion of osteosarcomas reacted positively to the 1A4 and HHHF35 antibodies. All osteosarcomas were negative for AE1/AE3 and CD31 and CD34 testing. Marking essays with Ki-67 revealed a high cell proliferation index in moderately productive osteoblastic osteosarcomas. Canine osteosarcomas are constituted by a diverse cell population, composed of osteoblastic, chondroblastic, myofibroblastic and mioblastic elements, which are probably originated from a single pluripotent mesenchymal cell or from immature osteoblasts that go thru a differentiation process. Moderately productive osteoblastic osteosarcoma presented a considerably high cell proliferation index that may relate to a more aggressive behavior.

1- INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é um tumor ósseo primário maligno, caracterizado pela produção de osteóide e/ou osso imaturo por osteoblastos. Esta neoplasia origina-se principalmente na cavidade medular, sendo incomum o osteossarcoma periosteal (THOMPSON e POOL, 2002).

Neoplasias de diversos tipos, inclusive osteossarcomas, são diagnosticadas com muita frequência nos cães. Talvez isso se deva ao fato destes animais viverem mais próximos ao homem, compartilhando o mesmo ambiente, e serem constantemente observados. Dentre estas neoplasias ressalta-se o osteossarcoma por sua alta malignidade (ZEZZA NETO *et al.*, 1992).

O osteossarcoma canino destaca-se por ser o tumor ósseo primário mais comum, apresentando frequência entre 80% a 85 % (PROBST e ACKERMAN, 1982; LaRUE e WITHROW, 1989; SPODNICK, 1992).

Verificou-se que há risco aumentado de osteossarcoma em cães com alto peso corporal, sendo que os animais pertencentes às raças gigantes ou de grande porte são os mais susceptíveis à doença (DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996; COOLEY e WATERS, 1997; RU *et al.*, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2004). Deve ser considerado, no entanto, que mesmo animais de pequeno porte também podem desenvolver osteossarcomas (GINEL *et al.*, 1996).

Esta neoplasia afeta cães adultos, com idade média de 8 anos, todavia, animais de faixas etárias variando de 3 meses a 16 anos também podem ser acometidos (BRODEY e RISER, 1969; GINEL *et al.*, 1996; DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996; TERRACINI e GLICKMAN, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2004). Em relação ao sexo, estudos prévios demonstraram haver uma discreta prevalência de osteossarcoma entre os machos (DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996).

A neoplasia se desenvolve principalmente na metáfise dos ossos longos, contudo, pode ocorrer em ossos chatos ou curtos, como por exemplo, crânio, escápula, costelas, vértebras, ossos pélvicos e também em tecidos moles (osteossarcoma extraesquelético) (DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996; RU *et al.*, 1998;

BARROGA *et al.*, 1999). As lesões ocorrem preferencialmente no esqueleto apendicular, afetando, por ordem de frequência o rádio, úmero, fêmur e tibia. As lesões no esqueleto axial ocorrem em 20 a 24% dos casos (DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996; THOMAS *et al.*, 1997; CAVALCANTI *et al.*, 2004).

A localização topográfica das lesões, juntamente com os aspectos radiográficos, pode auxiliar no diagnóstico presuntivo de osteossarcoma (THOMPSON e POOL, 2002).

As manifestações clínicas caracterizam-se por claudicação discreta ou grave nas situações onde há fratura associada. Os proprietários dos animais frequentemente referem que estes apresentam dor e aumento de volume local (ENDICOTT, 2003).

O osteossarcoma é a uma neoplasia de comportamento agressivo, invasiva e comumente determina lise e fratura óssea (TERRACINI e GLICKMAN, 1998; BARROGA *et al.*, 1999). Induz com muita frequência metástases, por via hematogênica, as quais, provavelmente, se dão através da infiltração de células neoplásicas pelos capilares sinusóides da medula óssea (THOMPSON e POOL, 2002). Os pulmões são o local preferencial de metástases, entretanto, estas também podem ocorrer em outros órgãos ou mesmo no esqueleto (SPODNICK *et al.*, 1992).

O prognóstico é ruim em virtude, principalmente, da alta incidência de metástases pulmonares, as quais muitas vezes são identificadas ao exame radiográfico, no momento da primeira consulta (BARROGA *et al.*, 1999).

Mesmo quando a lesão primária é removida, antes de lesões metastáticas serem clinicamente detectáveis, metástases pulmonares, ósseas ou em outros locais podem se desenvolver na maioria dos casos (MAYER e GRIER, 2006).

POOL (1990) e SPODNICK *et al.* (1992), afirmam que aproximadamente 72 % dos cães com osteossarcoma, submetidos à amputação, vão ao óbito ou são eutanasiados devido às metástases. Além disso, pode ocorrer recidiva local da lesão.

Os fatores de risco para osteossarcoma ainda não foram completamente elucidados. No entanto, há indícios de que fatores relacionados ao hospedeiro, como rápido crescimento do tecido ósseo, podem contribuir para o desenvolvimento da doença

(PARKIN *et al.*, 1993). Em cães, verificou-se que há risco aumentado de osteossarcoma em animais com alto peso corporal, sendo que os animais pertencentes às raças gigantes são os mais susceptíveis à doença (DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996; COOLEY e WATERS, 1997; RU *et al.*, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2004).

Há inúmeras opções de tratamento do osteossarcoma, os quais podem ser paliativos ou definitivos. Os tratamentos consistem de amputação, quimioterapia, excisão cirúrgica da massa tumoral, radioterapia paliativa e metastectomia. A amputação é um procedimento cada vez menos utilizado e a cirurgia com conservação do membro e a quimioterapia estão sendo cada vez mais freqüentes, favorecendo, inclusive, o aumento do tempo médio de sobrevida dos animais (ENDICOTT, 2003).

Os sarcomas ósseos (osteossarcoma, condrossarcoma e fibrossarcoma), especialmente na forma de lesões iniciais, não exibem características radiográficas patognomônicas, de forma que o diagnóstico definitivo dessas lesões deve ser realizado através de exame citopatológico ou histopatológico (THOMPSON e POOL, 2002).

Ao exame radiográfico os osteossarcomas podem ser líticos, produtivos ou mistos, com calcificação estendendo-se para os tecidos moles adjacentes. Os tumores originam-se no canal medular e expandem-se promovendo a erosão da cortical óssea. Caracteristicamente as lesões envolvem a metáfise. O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outros tumores ósseos primários ou metastáticos, micoses sistêmicas e osteomielites. Apesar de lesões líticas e proliferativas serem freqüentemente associadas com osteossarcoma essas alterações também ocorrem em outras osteopatias (EDINCOTT, 2003).

Em relação aos indicadores prognósticos do osteossarcoma canino, a idade pode ser considerada, pois os animais com idade entre 7 e 10 anos apresentaram melhor prognóstico (MISDORP e HART, 1979; SPODNIK *et al.*, 1992).

Também constituem indicadores prognósticos importantes: a raça (RU *et al.*, 1998), o peso corporal, a localização da lesão, o subtipo histológico do tumor (HAMMER *et al.*, 1995), presença de metástases (BARROGA *et al.*, 1999), níveis séricos

de fosfatase alcalina (GARZOTTO *et al.*, 2000), graduação do tumor (KIRPENSTAIJN, 2002), diâmetro e volume do tumor (FORREST *et al.*, 1992), densidade vascular do tumor (COOMBER *et al.*, 1998) e grau de necrose tumoral, após quimioterapia (POWERS *et al.*, 1991).

Animais com tumores do esqueleto axial têm um prognóstico melhor que aqueles com lesões no esqueleto apendicular e, nos casos em que se verificam altos níveis séricos de fosfatase alcalina, a sobrevida é menor. Mutações do p53 também tem sido associada com resistência à quimioterapia (ENDICOTT, 2003).

1.1- Classificação histopatológica e graduação dos osteossarcomas caninos

Os osteossarcomas são classificados histologicamente, considerando-se o tipo celular e a natureza da matriz produzida pelas células neoplásicas, a qual pode exibir característica condróide, osteóide, colagenosa, ou ainda, apresentar profusa proliferação de canais vasculares e de células gigantes multinucleadas (THOMPSON e POOL, 2002).

Histologicamente, o osteossarcoma se caracteriza pela proliferação de células mesenquimatosas com capacidade de produção de matriz osteóide e/ou osso tumoral. Estes aspectos constituem características fundamentais para o diagnóstico de osteossarcoma, de forma que o diagnóstico definitivo deve ser estabelecido apenas em presença de osteóide e/ou osso tumoral, produzido pelas células mesenquimatosas malignas (POOL, 1990; THOMPSON e POOL, 2002).

Em virtude da natureza multipotencial das células mesenquimatosas primitivas, é comum a observação de padrão histológico heterogêneo, podendo ocorrer a formação de cartilagem, colágeno e osteóide. Os osteoblastos malignos exibem variações morfológicas, podendo mostrar-se fusiformes, semelhantes a fibroblastos, arredondados ou ovais, com citoplasma basofílico e núcleo excêntrico e hipercromático. Estas células não se assemelham aos osteoblastos não neoplásicos. Também podem estar presentes células gigantes multinucleadas, do tipo osteoclastos, em quantidade variável. Pode ocorrer o predomínio de qualquer um destes elementos e nestes casos deve ser realizado o

diagnóstico diferencial com outros sarcomas primários ou metastáticos ou outras lesões ósseas pseudotumorais (POOL 1990).

POOL (1990) e THOMPSON e POOL (2002), descrevem que o osteóide tem aspecto hialino e eosinofílico e apresenta-se em quantidade variável, dispondo-se na forma de escassos aglomerados, como no osteossarcoma pouco produtivo, ou formando padrão em treliça, como no osteossarcoma produtivo.

De acordo com THOMPSON e POOL (2002), escassas quantidades de osteóide podem ser indistinguíveis de colágeno, pois ambos são birrefringentes, refletindo seu conteúdo colagenoso, e nem mesmo colorações histoquímicas permitem uma precisa distinção entre os dois. Em geral o osteóide é menos fibrilar do que o colágeno, mais amorfo e, freqüentemente, circunda as células tumorais, enclausurando-as dentro de lacunas. Se o material for mineralizado é mais provável que se seja osteóide e não colágeno, contudo, devido a freqüente necessidade de descalcificação dos tecidos para processamento laboratorial, este critério não pode ser utilizado com segurança nesta distinção. Fibrina em áreas de hemorragia também pode mimetizar osteóide, entretanto, essa não é birrefringente.

POOL (1990), afirma que proliferação de osso reacional é um aspecto bastante comum em lesões ósseas inflamatórias e neoplásicas. As trabéculas de osso reacional proliferado são interconectadas entre si e margeadas por uma camada única (rims) de osteoblastos e os espaços entre elas contém tecido conjuntivo não neoplásico. Já no osteossarcoma, os espaços entre espículas ou trabéculas de osso tumoral são preenchidos por células neoplásicas, que não estão dispostas formando camada única ao longo da superfície trabecular.

O sistema de classificação do osteossarcoma canino mais utilizado é o sugerido por POOL (1990), o qual é baseado na classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SLAYTER *et al.*, 1994) (tabela 1). Um esquema de classificação semelhante é utilizado para classificação de osteossarcoma humano (DAHLI e UNNI, 1977; UNNI *et al.*, 2005). De acordo com esta classificação, o osteossarcoma pode ser: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, telangiectásico, do tipo células gigantes e

indiferenciado (pobrememente diferenciado). Dependendo da quantidade de matriz óssea formada o osteossarcoma osteoblástico é subclassificado em não produtivo ou produtivo (POOL, 1990). O osteossarcoma pode ainda ser classificado como combinado, quando em um mesmo tumor, são identificados elementos celulares pertencentes a dois ou mais subtipos histológicos (DELISLE e DEVAUCHELLE, 1996; CAVALCANTI *et al.*, 2004).

A seguir são descritas as características histológicas dos diversos subtipos de osteossarcoma canino, em ordem decrescente de frequência:

Osteossarcoma osteoblástico

Conforme POOL (1990), o osteossarcoma osteoblástico é constituído por osteoblastos anaplásicos e volumosos e/ou células fusiformes. Tais células têm citoplasma basofílico, núcleos hipercromáticos e excêntricos. Estes tumores apresentam variações na quantidade de osteóide, de forma que podem ser subclassificados em:

- a) Osteossarcomas osteoblásticos produtivos: as células tumorais produzem quantidade abundante de matriz osteóide tumoral, a qual se dispõe, muito freqüentemente, em trabéculas conferindo um padrão entrelaçado. Entre estas são observadas células neoplásicas.
- b) Osteossarcomas osteoblásticos pouco produtivos: produzem lesões ósseas líticas e tendem a apresentar discreta quantidade de osteóide tumoral em permeio às células osteoblásticas atípicas com o padrão acima descrito.

Osteossarcoma condroblástico

As células tumorais mesenquimatosas produzem matriz condróide em abundância, além de osteóide tumoral. Na maioria das vezes, os dois tipos de matriz tumoral estão dispostas lado-a-lado ou entremeando-se. Este subtipo pode ter o diagnóstico equivocado com condrossarcoma, nos casos em que amostras de tecido tumoral apresentam predomínio de áreas condróides. No entanto, deve-se considerar que radiograficamente os osteossarcomas têm um caráter mais agressivo e que, além disto, a presença de osteóide, mesmo escasso, favorece o diagnóstico de osteossarcoma (POOL, 1990; THOMPSON e POOL, 2002).

Osteossarcoma fibroblástico

Na lesão inicial pode haver predomínio de células tumorais fusiformes, que se assemelham às células do fibrossarcoma central. Nestes casos pode ser difícil identificar presença de osteóide tumoral, o qual é escasso, dificultando o diagnóstico. Entretanto, à medida que a lesão evolui podem ser visualizadas extensas áreas de matriz osteóide, as quais envolvem aglomerados de células tumorais (POOL, 1990; SLAYTER, 1994).

Osteossarcoma do tipo células gigantes

Este tumor assemelha-se ao osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo, exceto por apresentar extensas áreas onde são observadas células gigantes tumorais. Este subtipo histológico de osteossarcoma deve ser diferenciado do tumor ósseo de células gigantes (POOL, 1990).

Osteossarcoma telangiectásico

A característica marcante deste tumor é a presença de canais vasculares de diâmetros variados, revestidos por células tumorais (e não por células endoteliais). A quantidade de osteóide presente pode ser muito reduzida, sendo necessária uma cuidadosa avaliação para que possa ser identificado. Este subtipo de osteossarcoma deve ser diferenciado de hemangiossarcomas, considerando que estes tumores também podem ocorrer, com frequência, no tecido ósseo, em cães.

Osteossarcoma indiferenciado

Este tumor, também denominado osteossarcoma pobremente diferenciado, é caracterizado por células tumorais que formam quantidade mínima de osteóide típico. Espículas ou trabéculas de osso tumoral maiores não são observadas. As células

neoplásicas podem ser volumosas e pleomórficas ou pequenas, assemelhando-se às células reticulares do estroma da medula óssea (SLAYTER, 1994; THOMPSON e POOL, 2002).

Tabela 1- Classificação histopatológica dos osteossarcomas de animais domésticos. Sugerida por POOL (1990), baseada na Organização Mundial da Saúde (SLAYTER *et al.*, 1994).

Central
Osteossarcoma
Osteoblástico
Pouco produtivo
Produtivo
Condroblástico
Fibroblástico
Tipo células gigantes
Telangiectásico
Indiferenciado (pobrememente diferenciado)
Periférico
Osteossarcoma periosteal
Osteossarcoma parosteal

Em adição a estes subtipos convencionais, outros subtipos foram recentemente divulgados em osteossarcomas do homem, tais como o osteossarcoma semelhante ao fibrohistiocitoma maligno, o osteossarcoma de baixo grau histológico central e o tipo rico em células gigantes (HASEGAWA *et al.*, 1991).

Em virtude da diversidade de aspectos morfológicos dos osteossarcomas e das rápidas mudanças que ocorrem em um mesmo tumor, estabelecer um sistema de graduação, que possa facilitar a determinação do prognóstico é um procedimento questionável, pois não parece resultar na obtenção de dados precisos (HAMMER *et al.*, 1995; STRAW *et al.*, 1996), no entanto, recentemente KIRPENSTAJN *et al.*, (2002), propuseram um sistema de graduação histológica para osteossarcoma canino. Este sistema consiste na categorização do osteossarcoma em graus I, II e III. Os autores concluíram que os tumores de grau III foram associados à menor sobrevida e um pior prognóstico.

O diagnóstico diferencial entre osteossarcoma, e outras lesões ósseas líticas ou proliferativas, é baseado no exame histopatológico. Este tumor deve ser diferenciado de condrossarcomas, fibrossarcomas, hemangiossarcomas, tumores de células redondas, tumores de células gigantes, fibromas ossificantes, displasias fibrosas, entre outros. Deve-se considerar que o arranjo das células tumorais pode variar amplamente dentro de um mesmo tumor e que biópsias pequenas podem gerar diagnóstico equivocado (POOL, 1990). Em casos de tumores localizados na mandíbula ou maxila, o diagnóstico diferencial deve ser realizado com tumores odontogênicos (GINEL *et al.*, 1996).

1.2- Aspectos histogenéticos dos osteossarcomas

Inicialmente estudos com microscopia eletrônica consideraram que os principais componentes celulares dos osteossarcomas no homem eram osteoblastos em vários estágios de diferenciação (WILLIAMS *et al.*, 1976). No entanto, posteriormente verificou-se que estes tumores, na verdade, eram constituídos por distintos tipos celulares (KATENKAMP *et al.*, 1978; REDDICK *et al.*, 1980).

Posteriormente GRUNDEMANN *et al.* (1981), ao estudarem a histogênese de osteossarcomas no homem, através de microscopia eletrônica, concluíram que o osteossarcoma é constituído de diversos componentes celulares, de padrão variado e que podem ser identificadas células osteoblásticas, fibroblásticas e condroblásticas. Em associação a estes tipos celulares, há também células miofibroblásticas e angioblásticas.

GRUNDEMANN *et al.* (1981) e KATENKAMP *et al.* (1989), afirmam que seus achados sugerem que o osteossarcoma pode ser originado de uma única célula pluripotente, com potencial para diferenciar-se em linhagens de células condroblásticas, osteoblásticas, fibroblásticas, miofibroblásticas e angioblásticas.

As semelhanças existentes entre os diversos subtipos de osteossarcomas reforçam a tese de que as células constituintes deste tumor devem ser originadas de uma célula progenitora comum (REDDICK *et al.*, 1980).

Atualmente, com o advento da imunoistoquímica, as características histogenéticas das células tumorais do osteossarcoma puderam ser melhor investigadas. HASEGAWA *et al.* (1991) e HASEGAWA *et al.* (1997), através de estudos imunoistoquímicos, observaram que além de osteoblastos, condroblastos, células semelhantes a miofibroblastos e a angioblastos, o parênquima do osteossarcoma do homem apresentava células mesenquimais indiferenciadas e células semelhantes a histiócitos.

1.3- Imunoistoquímica e osteossarcomas

A imunoistoquímica tem sido rotineiramente utilizada na patologia cirúrgica, em espécimes teciduais colhidos do homem, fornecendo importante auxílio principalmente no diagnóstico de neoplasias malignas indiferenciadas.

Na patologia cirúrgica veterinária, de forma crescente, também têm sido utilizadas técnicas imunoistoquímicas para o diagnóstico diferencial de neoplasias anaplásicas, porém, muitos dos marcadores celulares foram originalmente produzidos para reconhecer antígenos humanos, de forma que o seu uso tem apresentado algumas

limitações, em virtude da falta de anticorpos espécie – específicos. Apesar disto o estudo de CASSALI *et al.* (2001), comprovou a eficácia de marcadores humanos em tumores mamários de cadelas.

A avaliação imunoistoquímica do osteossarcoma objetiva principalmente o diagnóstico diferencial com outros sarcomas ósseos ou com neoplasias indiferenciadas, entretanto, a imunistoquímica também pode ser empregada na caracterização do imunofenótipo do osteossarcoma, sendo utilizados diversos marcadores celulares como: osteocalcina, osteonectina, proteína S-100, alfa-actina de músculo liso, citoqueratinas de baixo peso molecular (CAM 5.2 – citoqueratinas 8 e 18), antígeno epitelial de membrana (EMA) e Fator XIIIa, entre outros (HASEGAWA, 1997).

A análise imunoistoquímica de proteínas ósseas específicas, tais como osteocalcina, osteonectina e osteopontina e a análise da enzima fosfatase alcalina tem sido realizada, tanto no osteossarcoma de humanos (TAKADA *et al.*, 1992; HASEGAWA *et al.*, 1997), quanto no de cães (HOENERHOFF *et al.*, 2004).

Estudos imunoistoquímicos, em osteossarcoma humano, determinaram que a osteocalcina (ácido γ - carboxiglutâmico – proteína óssea) e osteonectina são marcadores de células tumorais de origem osteoblástica e são passíveis de serem identificadas através desta técnica (HASEGAWA *et al.*, 1991; HASEGAWA *et al.*, 1997).

A osteocalcina é uma proteína de baixo peso molecular, que liga cálcio e localiza-se principalmente no tecido ósseo, constituindo aproximadamente 10-20% da proteína óssea não colagenosa. Anticorpos monoclonais ou policlonais anti-osteocalcina podem depositar-se nos osteoblastos. Esta característica possibilita que a osteocalcina seja um importante instrumento de ajuda no diagnóstico imunoistoquímico das neoplasias ósseas (HASEGAWA *et al.*, 1991; SERRA *et al.* 1992; TAKADA *et al.*, 1992). A osteocalcina também pode ser utilizada como marcador de diferenciação celular no osteossarcoma canino (HONG *et al.*, 2000).

A proteína S-100 é identificada principalmente no tecido nervoso, mais especificamente nas células gliais e de Schwann. As células de Langerhans na pele e as células reticulares interdigitadas do paracórtex do linfonodo também expressam

proteína S-100. Proteína S-100 pode ser utilizada na identificação de melanomas, neoplasias de nervos, de células de Schwann e mioblastomas de células granulares (HASEGAWA, 1997).

A função da proteína S-100 nas células ainda não está bem compreendida. Acredita-se que esteja relacionada ao transporte de cálcio intracelular ou microtubular, ou ambos. A imunorreatividade para proteína S-100 deve ser tanto citoplasmática, quanto nuclear para ser considerada válida. Foi verificada a presença desta proteína nestes dois compartimentos celulares em melanócitos normais ou neoplásicos (WICK, 2006).

Os melanomas, em sua maioria, expressam proteína S-100. No entanto, há diversas outras lesões que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial com lesões melanocíticas, tais como, carcinomas pobremente indiferenciados, gliomas malignos, tumores da bainha de nervos periféricos e lesões com células de Langerhans. A proteína S-100 deve ser útil especialmente para a realização de avaliação inicial no diagnóstico de tumores melanocíticos e não como marcador específico para estes tumores (ALVES *et al.* 1999; WICK, 2006)

A distribuição das citoqueratinas é específica para cada subtipo de epitélio, possibilitando que sejam utilizadas como importantes marcadores de diferenciação epitelial, sendo empregadas rotineiramente no diagnóstico de tumores (DABBS, 2006).

O “coquetel” de citoqueratinas AE1/AE3 é um anticorpo de utilização bastante comum no diagnóstico de neoplasias indiferenciadas e é constituído por uma mistura de dois diferentes clones de anticorpos monoclonais anti-citoqueratina (AE1 e AE3), os quais identificam determinadas citoqueratinas de alto ou baixo peso molecular. AE1 detecta as citoqueratinas de alto peso molecular 10, 14, 15 e 16 e a de baixo peso molecular 19. O clone AE3 por sua vez identifica as citoqueratinas de alto peso molecular 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e as de baixo peso molecular 7 e 8 (ALVES *et al.*, 1999; HELLMEN *et al.*, 2000; DABBS, 2006). Este “coquetel” constituído pelas citoqueratinas AE1/AE3 é o mais comumente utilizado no diagnóstico de neoplasias indiferenciadas, tanto nas do homem, quanto nas de animais domésticos. A maioria dos carcinomas expressam AE1/AE3 (ALVES *et al.*, 1999; HELLMEN *et al.*, 2000).

CERILLI e WICK (2006), referem que a alfa-actina de músculo liso (1A4) é uma proteína citoesquelética pertencente ao grupo da espectrina, distrofina e utrofina. No músculo liso a alfa-actina está localizada na banda Z, associada à F-actina. Este anticorpo é utilizado para identificação de células musculares lisas em tecido normal ou para o diagnóstico de doenças musculares. Reage com células musculares lisas, miofibroblastos e células mioepiteliais. Este anticorpo é principalmente utilizado para o diagnóstico diferencial de leiomiomas, leiomiossarcomas e adenomas pleomórficos.

A actina é uma proteína citoesquelética encontrada em abundância em células musculares e não musculares e apresenta três isotipos (α , β , γ), os quais diferem entre si por sua seqüência de aminoácidos e seus pontos isoelétricos. O anticorpo anti-actina muscular (HHF35) reconhece os isômeros alfa e gama actina músculo-específicos, no entanto, não reage com actina não muscular. Marca a alfa actina dos músculos cardíaco e liso. Além disso, também é expresso em miofibroblastos do estroma de diversos tumores incluindo carcinomas. Não reage com actina de origem não muscular (células endoteliais). Pode ser utilizado para confirmação diagnóstica do leiomioma, leiomiossarcoma e rabdomiossarcoma. Não marca melanoma ou linfoma (ALVES, 1999; DABBS, 2006).

A vimentina é uma proteína de 57-kD e é um membro importante da família dos filamentos intermediários de proteínas, sendo o primeiro a ser expresso durante a diferenciação celular. Esta Proteína é identificada em inúmeras células mesenquimatosas, incluindo, fibroblastos, células endoteliais, células mesoteliais, células granulosas do ovário, cápsula de Bowman (no rim), endométrio, epitélio ovariano, células mioepiteliais, melanócitos, epitélio do folículo tireoidiano. Células do sistema linfematopoético também expressam vimentina, porém em menores quantidades (ALVES *et al.*, 1999; DABBS, 2006).

A vimentina é incluída no painel primário para diagnóstico diferencial de neoplasias, o qual inclui, ainda, CD45, citoqueratina e proteína S-100. Reação intensa da vimentina em neoplasias, sem a coexpressão de outros filamentos protéicos intermediários, sugere fortemente origem mesenquimatosa ou melanoma. No entanto, deve ser lembrado que a expressão de vimentina não está restrita apenas às células mesenquimatosas, pois

pode haver expressão da mesma em diversos tipos de neoplasias, incluindo carcinomas (DABBS, 2006).

A imunomarcção de células endoteliais pode ser realizada com os anticorpos CD31 (JC/70 A) ou CD34 (QB-END/10). CD31 é uma glicoproteína expressa em células endoteliais, plaquetas, megacariócitos, granulócitos, monócitos e subpopulações de linfócitos T e B. É o marcador mais sensível para tumores vasculares. O CD34, além de ser um marcador de células endoteliais, também é marcador de células hematopoiéticas primitivas. É utilizado no diagnóstico de tumores vasculares e de tumores estromais mesenquimatosos, dermatofibrossarcoma *protuberans* e tumor fibroso solitário (ALVES *et al.* 1999).

O CD34 é uma proteína de 110-kD que é expressa por células embrionárias do sistema hematopoético, incluindo elementos linfóides e mielogênicos e também por células endoteliais. Este anticorpo é um importante indicador de diferenciação vascular, podendo ser utilizado no diagnóstico imunoistoquímico de angiossarcomas ou sarcomas de Kaposi. Entretanto este não apresenta especificidade, pois pode ser expresso em tumores da bainha de nervos periféricos e sarcomas epitelióides, os quais assemelham-se ao angiossarcoma ou hemangioendotelioma. Em virtude disto o CD34 deve ser utilizado em um painel de reagentes, considerando-se outras possibilidades diagnósticas (CERILLI E WICK, 2006).

Ainda de acordo com CERILLI E WICK (2006), o CD31 (molécula-1 de adesão celular plaqueta-endotélio) é uma glicoproteína transmembrana de 130 kD, que é encontrada em células endoteliais, megacariócitos, plaquetas e outros elementos hematopoiéticos. O CD31 também é conhecido como JC/70 A. Este marcador apresenta acentuada sensibilidade e tem expressão restrita às neoplasias endoteliais.

O antígeno relacionado ao fator VIII é uma proteína polimérica que é sintetizada exclusivamente por células endoteliais e megacariócitos. O fator VIII tem função dupla: é responsável pela formação de complexos circulantes com o fator anti-hemofílico (proteína coagulante fator VIII) e também tem papel fundamental na agregação plaquetária. Na patologia cirúrgica o anticorpo fator VIII é empregado na distinção entre

neoplasias vasculares e outras neoplasias de tecidos moles, pois permite a demonstração de diferenciação vascular (ALVES *et al.*, 1999; DABBS, 2006).

A análise imunoistoquímica para determinação do índice de proliferação celular, utilizando-se principalmente o Ki-67, também tem sido cada vez mais utilizada no osteossarcoma do homem (SCOTLANDI *et al.*, 1995; CHANO *et al.*, 1996; HERNÁNDEZ-RODRIGUÉZ *et al.*, 2001) e no osteossarcoma canino (OHTA *et al.*, 2004).

O índice de proliferação celular, importante na avaliação prognóstica, pode ser mensurado utilizando-se, por exemplo, o Ki-67 (VOLLMER *et al.*, 1989) ou o PCNA (*Proliferating-Cell Nuclear Antigen*) (CASSALI *et al.*, 2001; LOUKOPOULOS *et al.*, 2004).

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal específico para um antígeno nuclear, que é expresso na maioria das fases do ciclo celular (G1,S, G2 e M), contudo está ausente em células em repouso (G0). A avaliação imunoistoquímica com Ki-67 permite uma rápida e fácil avaliação de amostras de neoplasias sem a necessidade de incubação preliminar com precursores de DNA. Apesar de pouco se conhecer sobre a natureza deste antígeno, a eficácia do Ki-67 como marcador tem sido avaliada e aplicada ao diagnóstico de diversos tipos de neoplasias, tais como: carcinoma, melanoma e sarcomas de tecidos moles (VOLLMER *et al.*, 1989;). O Ki-67 também pode ser utilizado como marcador na avaliação do prognóstico do osteossarcoma humano (HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

2- JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

No Brasil, os escassos trabalhos publicados sobre osteossarcoma canino são descritos na forma de relatos de casos, enfatizando principalmente as condutas terapêuticas (SIQUEIRA e CAVALCANTI, 1993; DALECK, 1996; PACHECO *et al.*, 1999). Apenas ZEZZA NETO *et al.* (1992) e CAVALCANTI *et al.*, (2004), abordam considerações gerais e epidemiológicas sobre esta neoplasia.

A literatura estrangeira, em sua maioria, descreve aspectos epidemiológicos, fatores prognósticos e terapêuticos do osteossarcoma canino (SPODNICK *et al.*, 1992; THOMPSON *et al.*, 1992; HAMMER *et al.*, 1995; BERG, 1996; KIRPENSTEIJN *et al.* 2002).

As propriedades imunoistoquímicas deste tumor têm sido estudadas (MENDOZA *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2004; BARGER *et al.*, 2005), objetivando a identificação dos diferentes tipos celulares, que compõem o parênquima do osteossarcoma canino, ou do índice de proliferação destas células (LOUKOPOULOS *et al.*, 2003; HOENERHOFF *et al.*, 2004; OHTA *et al.*, 2004). Todavia, não há relatos de estudos sistemáticos (envolvendo grande número de casos), objetivando a análise dos aspectos acima referidos, utilizando-se especialmente o ki-67.

Os estudos que visaram analisar as características das células tumorais do osteossarcoma canino foram apresentados, em sua maioria, na forma de relatos de casos isolados (HOENERHOFF *et al.*, 2004) ou foram realizados com linhagens de células tumorais isoladas e mantidas em cultivo (LOUKOPOULOS, 2004).

Considerando-se que na literatura nacional, não foram identificados estudos com osteossarcomas caninos, que tenham avaliado os aspectos acima relacionados e que inúmeras são as pesquisas realizadas com osteossarcoma humano, objetivando a análise destes parâmetros (GRUNDMANN *et al.*, 1981; HASEGAWA *et al.*, 1991; HASEGAWA *et al.*, 1997; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001), pressupõe-se que, estudos sobre a natureza histogenética e do índice de proliferação celular, nesta neoplasia, poderiam responder às seguintes questões:

- 1) Quais os tipos celulares predominantes no osteossarcoma canino?
- 2) Os elementos celulares do osteossarcoma canino podem ser originados de células mesenquimatosas pluripotentes?
- 3) O índice de proliferação celular pode estar correlacionado com os diferentes subtipos histológicos?

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar, com auxílio da imunohistoquímica, os componentes celulares e o índice de proliferação celular do osteossarcoma canino.

3.2- Objetivos específicos

1. Determinar a diferenciação das células tumorais dos diferentes subtipos histológicos do osteossarcoma canino, através da expressão dos imunomarcadores osteocalcina, proteína S-100, alfa-actina de músculo liso (1A4), HHF35, citoqueratinas (AE1/AE3), vimentina, fator VIII (fator de von Willebrand), CD34 e CD31.
2. Avaliar a atividade proliferativa das células tumorais de osteossarcomas através da expressão de Ki67.
3. Correlacionar os achados de diferenciação celular e de atividade proliferativa com as feições morfológicas do osteossarcoma canino.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Caracterização da casuística

Foi realizado estudo retrospectivo com levantamento de 65 casos de osteossarcoma canino, no período de 2000 a 2006. Tais casos foram provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, da FMVZ /UNESP, Campus de Botucatu e do HISTOPET® (Serviço de Anatomia Patológica Veterinária), sediado em São Paulo – SP.

4.2- Dados clínicos

Os prontuários dos animais foram analisados para obtenção de dados clínicos, tendo sido considerados os seguintes quesitos: raça, sexo, idade e localização topográfica das lesões, presença ou não de metástase à primeira consulta. Todos os casos com pelo menos um dado clínico referido no prontuário foram incluídos. Foram excluídos os casos de osteossarcomas de outras espécies, como gatos.

4.3- Avaliação e classificação histopatológica

Blocos de parafina, contendo fragmentos de osteossarcoma, obtidos através de procedimento de biopsia ou necropsia, foram seccionados com micrótomo à espessura de 4 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e destinados aos procedimentos de imunohistoquímica.

Os osteossarcomas foram classificados histologicamente, segundo o método modificado de DAHLIN e UNNI (1977), sugerido por POOL (1990), 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.

Somente foram incluídos no estudo os casos cuja quantidade de tecido tumoral foi considerada suficiente e com boa representatividade de tumor viável.

4.4- Reação imunoistoquímica

Cortes histológicos de osteossarcomas caninos, com 5 µm de espessura, foram colocados sobre lâminas previamente tratadas com solução de organossilano (3-aminopropiltrióxissilano, SIGMA, St. Louis, MO, USA, cód. 3648), em acetona 20%. Em seguida os cortes foram levados à estufa e mantidos a 110°C, por uma hora. Na seqüência foram submetidos à desparafinização com xilol e reidratados em gradientes decrescentes de álcool etílico (100%, 80% e 50%), cada um com “banhos” por 5 minutos, e lavados em água destilada.

A seguir, foram realizadas incubações dos cortes histológicos na seguinte seqüência:

1. Para bloqueio da peroxidase endógena, foi realizada imersão em solução de peróxido de hidrogênio 30%, três banhos por 3 minutos, seguida de duas lavagens de 5 minutos, cada, em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,6.
2. Recuperação antigênica pelo método do calor úmido, com as lâminas imersas em solução tampão (tampão citrato 10 mM, pH 6,0 a 95° C), em panela a vapor [*Steam Cuisine 700 Hi Speed – T-Fal®*], por 35 minutos.
3. Esfriamento à temperatura ambiente, por 20 minutos, seguido de duas lavagens, por 5 minutos em PBS.
4. Incubação por 18 horas, em geladeira comum a 6° C, com os anticorpos primários, diluídos em soro albumina bovina (1% BSA em PBS), HHF35, anti-alfa actina de músculo liso (1 A4), citoqueratinas, anti-fator VIII (fator de Von Willebrand), anti-Ki-67, anti-osteocalcina, anti-S –100, anti-CD34, anti-CD31 e anti-vimentina, os quais estão relacionados no quadro abaixo, com suas características, especificações e respectivas diluições.
5. Retirada das lâminas da geladeira e eliminação do excesso de anticorpos dos cortes com duas lavagens em PBS, por 5 minutos cada.
6. Aplicação do sistema de detecção e amplificação do sinal Em Vision-peroxidase (Dakopatts, cód. K1491).

7. Revelação da peroxidase através de reação com 3,3 - diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EUA, cód. D5637), a 3%, em PBS, por 5 minutos a 37° C.
8. Lavagem em água corrente por 5 minutos.
9. Contracoloração com hematoxilina de Harris, diluída a 50%, em água destilada, por 1 minuto.
10. Retirada do excesso de corante através de lavagem em água corrente.
11. Desidratação dos cortes, em gradiente crescente de álcoois, clarificação em xilol e montagem com lamínula, em meio de montagem permanente Entellan®.

Quadro I- Detalhamento dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Antígeno / especificidade Principal	Laboratório	Diluição
Actina muscular	HHF35 - Células musculares	DAKO	1:400
Alfa actina de músculo liso	1 A4 - diferenciação muscular lisa	DAKO	1:50
CD34	QB-END/10 – células endoteliais	DAKO	1:150
CD31	JC/70 ^A – células endoteliais e células hematopoiéticas	DAKO	1: 100
Citoqueratinas	AE1/AE3 – diferenciação epitelial	DAKO	1:50
Fator VIII	F8/86 - Células endoteliais	DAKO	1:300
Ki-67	MIB-1, antígeno de proliferação celular	DAKO	1:150
Osteocalcina	OCG3, osteoblastos	ABCAM	1:100
Proteína S-100	Policlonal - histiócitos, condrócitos, condroblastos, adipócitos, células de Schwann	DAKO	1:1000
Vimentina	V9 – células mesenquimais	DAKO	1:100

4.5- Avaliação Imunoistoquímica

Na avaliação imunoistoquímica todo o corte histológico foi analisado e a área de maior imunopositividade foi computada. Considerou-se como requisito mínimo, para a análise, a presença de tumor viável em pelo menos um campo microscópico, em aumento de 400x.

O grau de reatividade conferida pelos anticorpos anti-actina muscular, 1A4 anti-alfa actina de músculo liso, anti-CD31, anti-CD34, anti-citoqueratinas, anti-fator VIII, anti-osteocalcina, anti-proteína S-100 e anti-vimentina, foi avaliado semiquantitativamente. Todas as áreas de tumor viável foram avaliadas, tendo sido estabelecidos os seguintes critérios, de acordo com HASEGAWA *et al.* (1997) (modificado):

- (0) = quando houve ausência de imunorreatividade nas células neoplásicas;
- (+) = quando a reatividade era esparsa ou focal em menos de 30% de células tumorais;
- (++) = quando houve reatividade, em um ou mais focos, atingindo 30 a 50% das células e
- (+++) = quando mais de 50% das células apresentaram reatividade, conferindo um padrão difuso.

Os anticorpos acima relacionados reconhecidamente exibem imunorreatividade intracitoplasmática, exceto o anticorpo anti-proteína S-100, que apresenta reatividade tanto nuclear quanto citoplasmática.

A determinação do grau de imunopositividade dos diferentes anticorpos foi avaliada considerando-se o subtipo histológico predominante em cada tumor.

A avaliação das células neoplásicas positivas para o Ki-67 foi realizada de forma semiquantitativa, em microscópio óptico, utilizando-se aumento de 400 x. Foram observadas as áreas com maior densidade de núcleos com imunomarcagem (áreas *hotspot*), estabelecendo-se a porcentagem de núcleos de células tumorais marcados, em cada uma das

áreas de diferentes subtipos histológicos do tumor. Tratando-se de neoplasia mesenquimatosa, consideraram-se os seguintes critérios: índice de proliferação celular (IPC) baixíssimo – quando houve reatividade nuclear $\leq 5\%$ das células; baixo - quando IPC foi superior a 5 e menor ou igual a 10%; alto – quando IPC foi maior que 10 e menor ou igual a 30% e altíssimo, quando IPC foi maior que 30%.

Os controles positivos foram tecidos normais ou neoplásicos, nos quais previamente reconheceu-se a presença de epítomos relevantes.

4.6- Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo Serviço de Estatística da Comissão de Pesquisa da FCM / UNICAMP, utilizando o programa computacional *SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.1.3. Foram aplicados os testes Exato de Fisher ou o Qui-Quadrado, para verificação de associações entre variáveis categóricas. Foram considerados significantes valores menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0.05$).

4.7- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA), do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob o protocolo n.o 403 -1, fornecido em 09/12/2002.

5- RESULTADOS

5.1- Dados clínicos

Com base nos prontuários de 65 animais com osteossarcoma, foi determinada a idade de 55 deles, a qual variou de 6 meses a 15 anos, com uma média de 7,4 anos (figura 1) . O sexo de 58 animais foi avaliado, sendo 32 machos (55,2 %) e 26 fêmeas (44,8%), tendo sido verificada proporção macho: fêmea de 1,2.

Os cães mais afetados por osteossarcoma pertenciam às raças Rottweiler ou eram SRD (Sem Raça Definida). A distribuição e a frequência das raças, em 58 animais, é demonstrada na figura 2. Quarenta e sete animais foram de raça pura (71%) e 11 (17%) Sem Raça Definida (SRD). Em 8 casos não constava referência à raça nos prontuários.

A topografia das lesões foi analisada em 31 casos. Em 24 as lesões ocorreram no esqueleto apendicular (77,4%) e em 7 (22,6%) no esqueleto axial. Em ordem decrescente de frequência as lesões apresentaram a seguinte distribuição: fêmur, articulação coxo-femural, rádio, rádio/ulna, mandíbula, osso nasal, costelas, tibia, articulação n úmero-rádio-ulnar, vértebra e dígito. A distribuição e frequência da localização topográfica das lesões são demonstradas na figura 3.

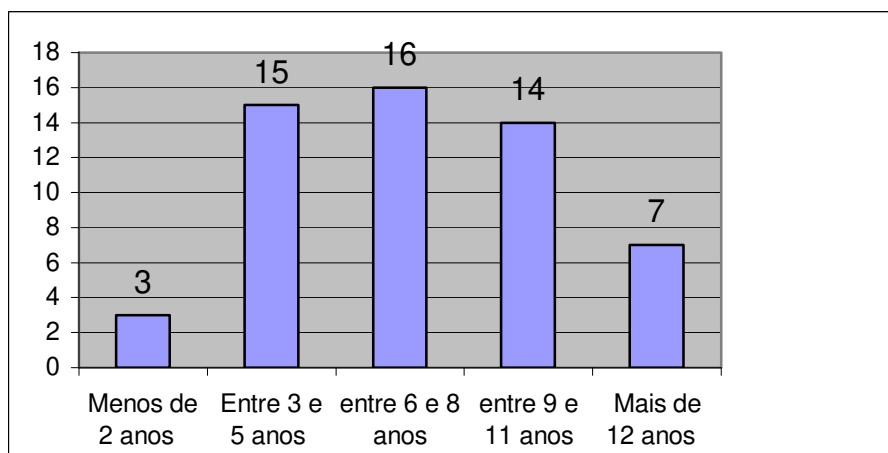


Figura 1- Distribuição e frequência das idades de 55 cães com osteossarcoma.

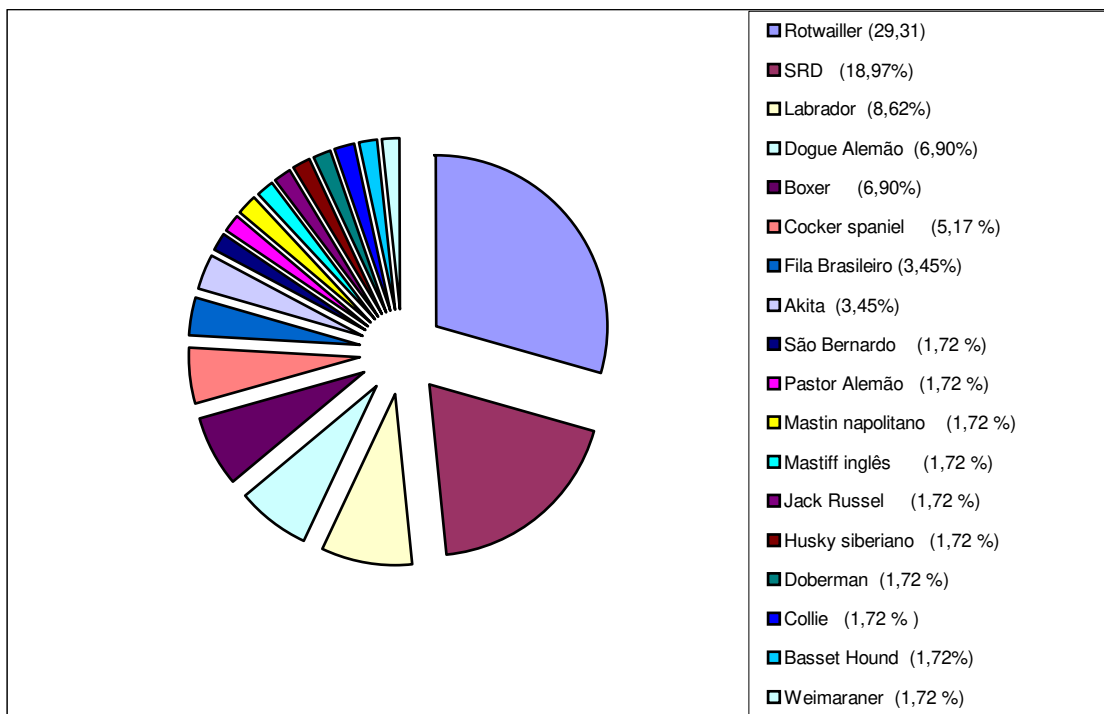


Figura 2- Distribuição e frequência das raças de 58 cães com osteossarcoma.

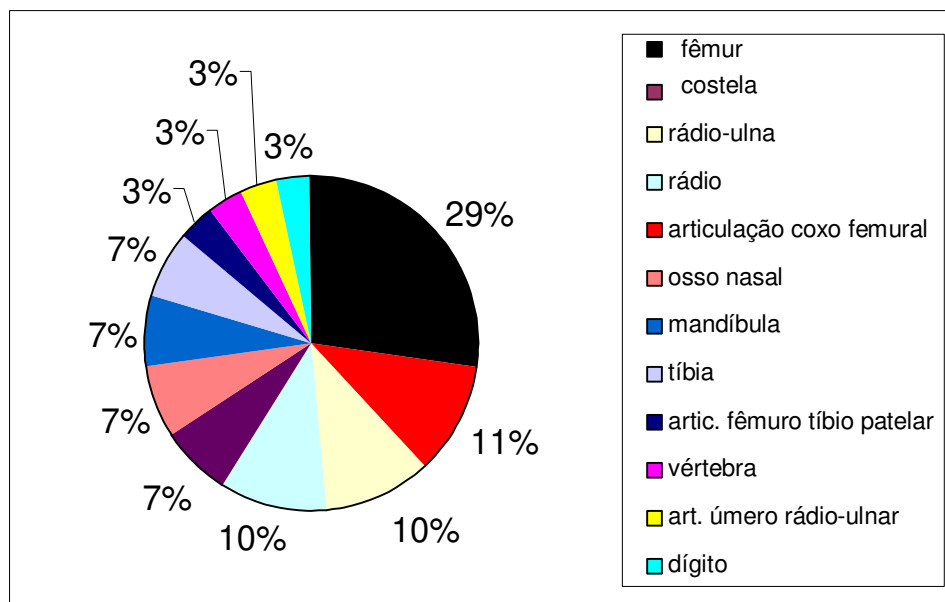


Figura 3- Distribuição e frequência da localização topográfica das lesões de 31 cães com osteossarcoma.

5.2- Achados histopatológicos

O exame histopatológico das lesões revelou proliferação de células tumorais mesenquimatosas formando aglomerados, bandas ou massas densas infiltrativas, com produção variável de osteóide por estas células. Tais células apresentaram alto índice mitótico, pleomorfismo e anaplasia, caracterizada por aumento de volume e hiperchromatismo. A quantidade e composição da matriz tumoral, variou entre os diversos tumores ou em um mesmo tumor, desde a composição típica osteóide, à fibrosa ou condróide. Frequentemente eram observadas extensas áreas de hemorragia e necrose.

De acordo com os aspectos acima e baseados na classificação histológica de POOL (1990), os resultados da análise de 65 casos de osteossarcomas caninos foram os seguintes, em ordem decrescente de frequência (figura 4): osteoblásticos (31 casos – 47,7%) (figuras 5 e 6); condroblásticos (14 casos – 21,5 %) (figura 7); fibroblásticos (15 casos – 23,1 %) (figura 8); osteossarcoma tipo células gigantes (3 casos – 4,7%) (figura 9); telangiectásico (1 caso – 1,5 %) e osteossarcoma indiferenciado (1 caso – 1,5 %) (figura 10). Considerando-se a quantidade de osteóide presente, os osteossarcomas osteoblásticos foram ainda subclassificados em: a) produtivos (61%) (figura 5) e b) pouco produtivos (39%) (figura 6). Todos os osteossarcomas observados foram do tipo central.

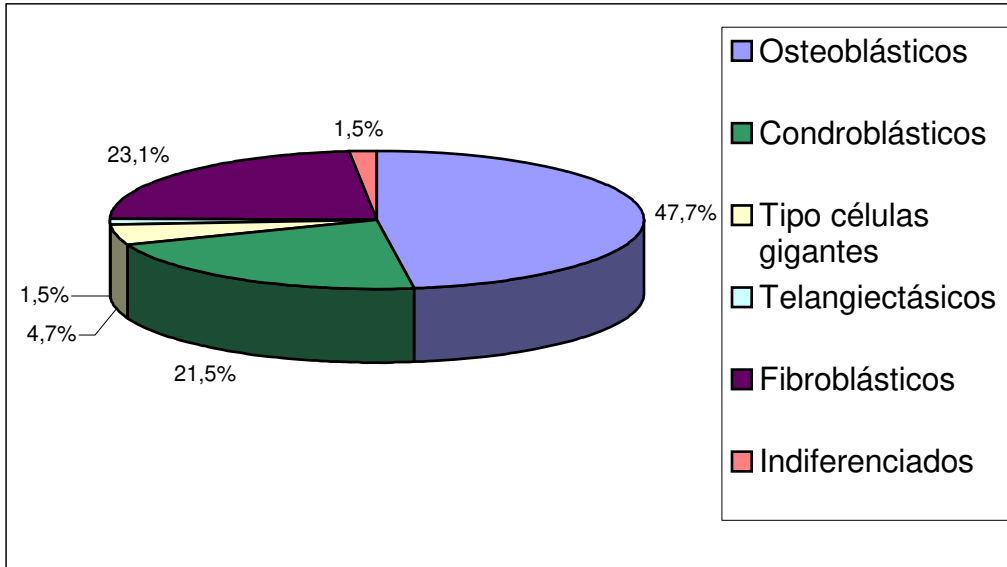


Figura 4- Distribuição e freqüência dos subtipos histológicos de 65 osteossarcomas caninos.

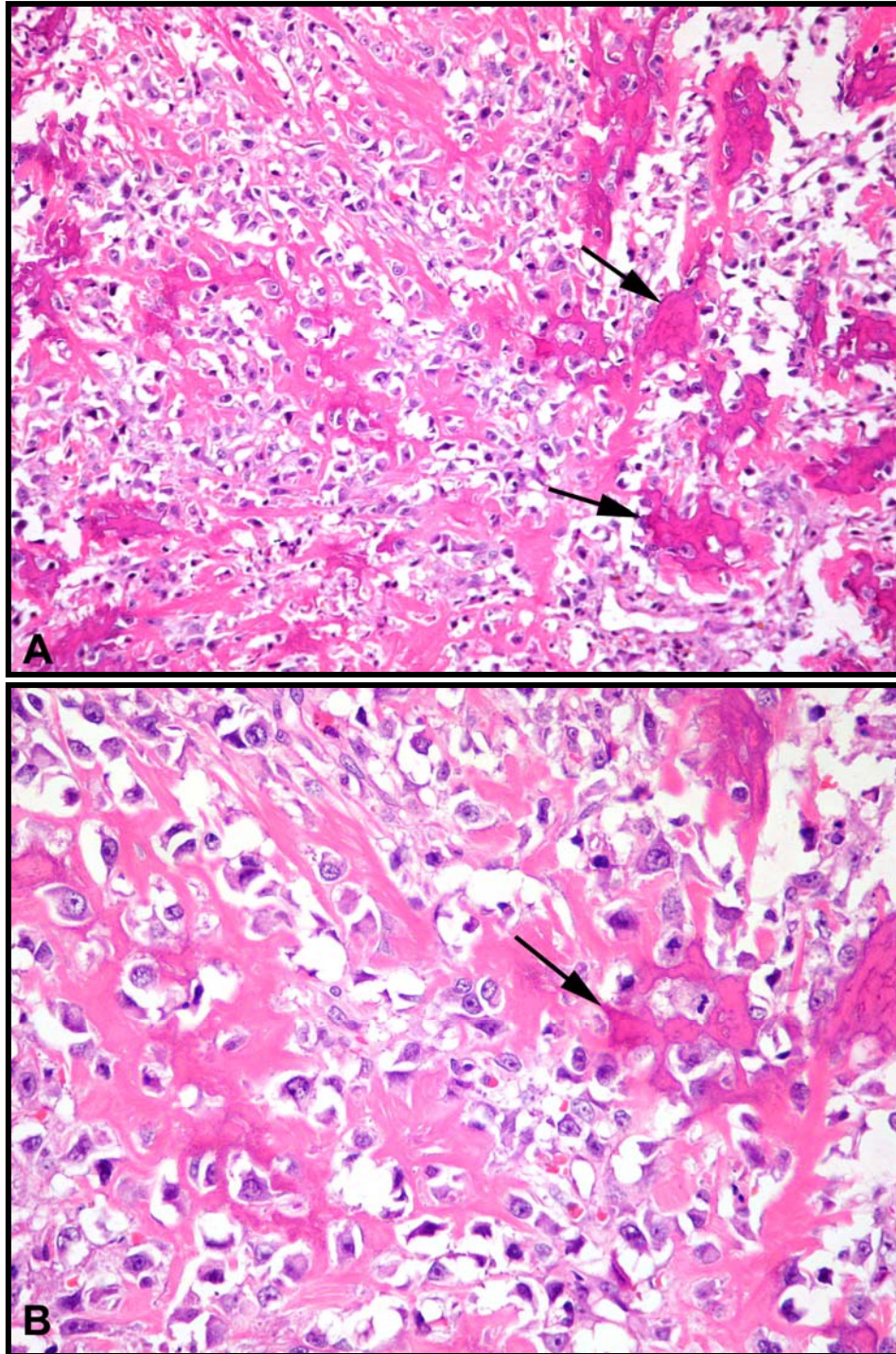


Figura 5- Osteossarcoma osteoblástico produtivo. **Figuras A** (200 x) e **B** (400 x) – Células neoplásicas osteoblásticas atípicas, entremeadas por abundante quantidade de matriz osteóide, disposta em rede, que se entrelaça. Verificar áreas basofílicas de calcificação (setas).

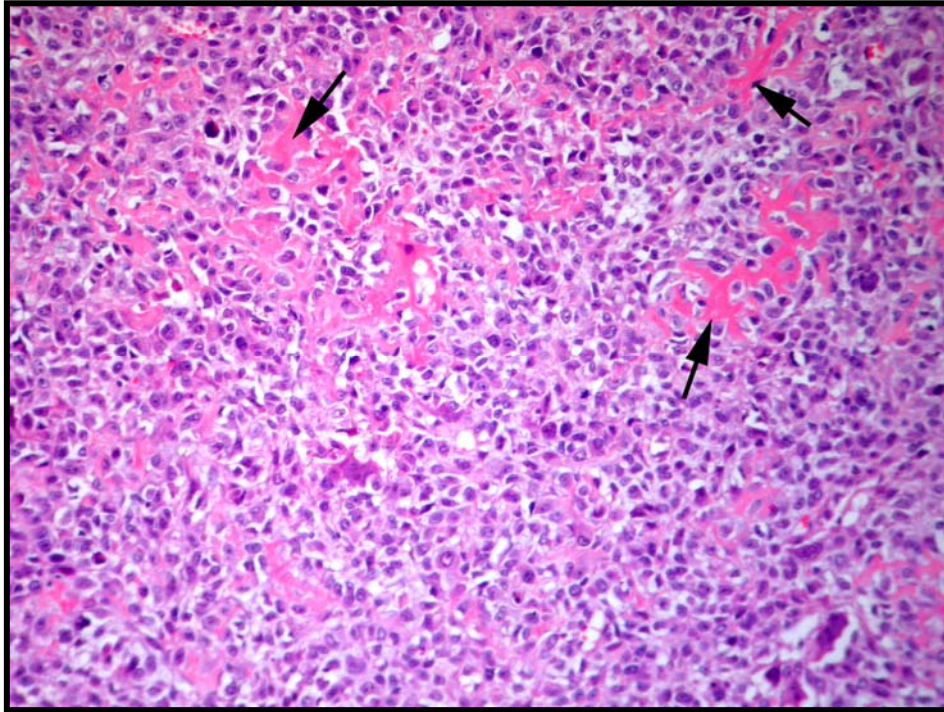


Figura 6- Osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo. Entre as células neoplásicas é visualizada escassa quantidade de osteóide, formando trama de aspecto delicado – setas. (200x) (HE).

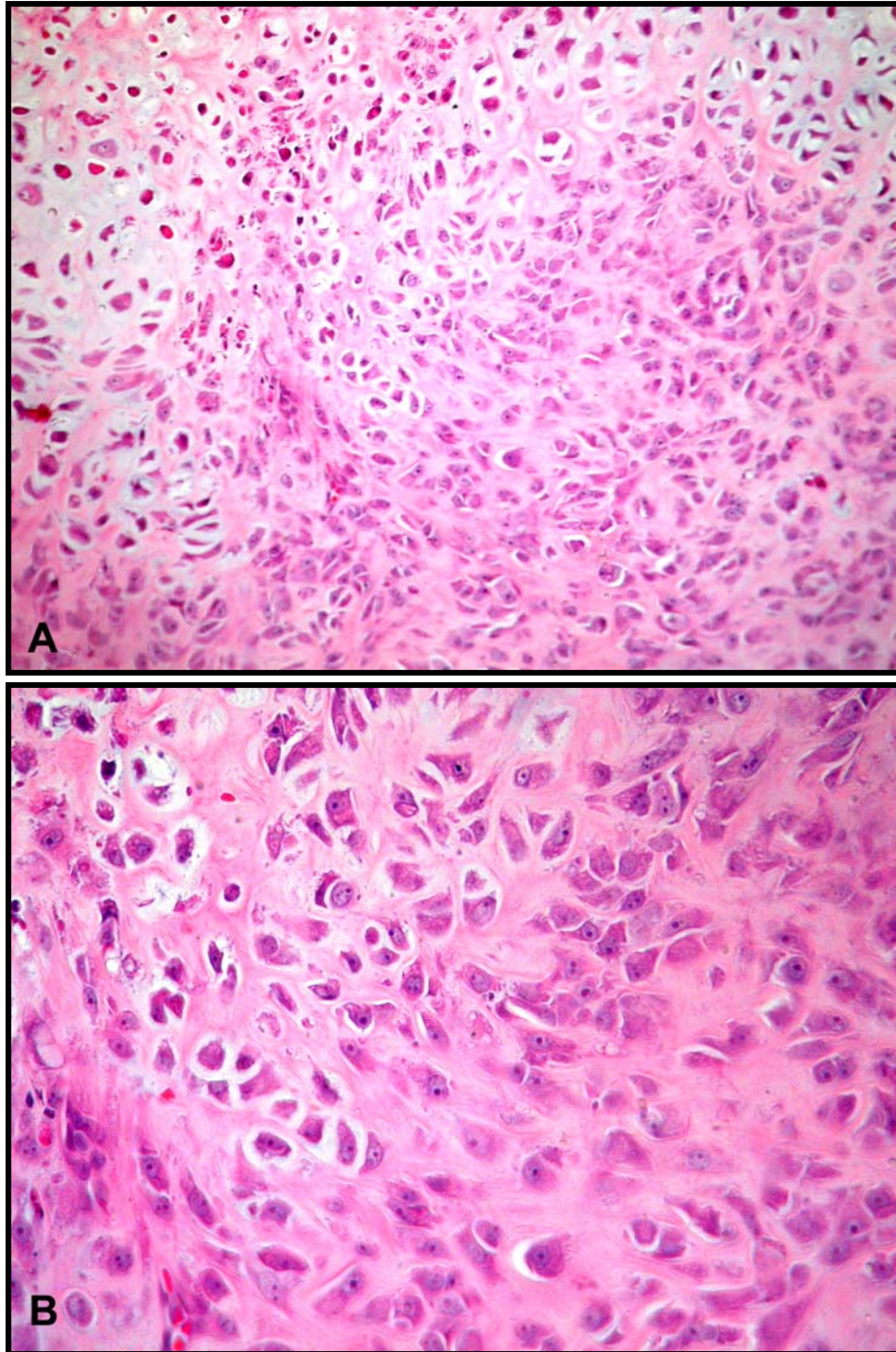


Figura 7- Osteossarcoma condroblástico. **Figura A** – células tumorais poliédricas envolvidas por matriz tumoral condróide. Osteóide não é visualizado neste campo microscópico (200 x). **Figura B** – detalhe figura A. Não visualizado osteóide (400x) (HE).

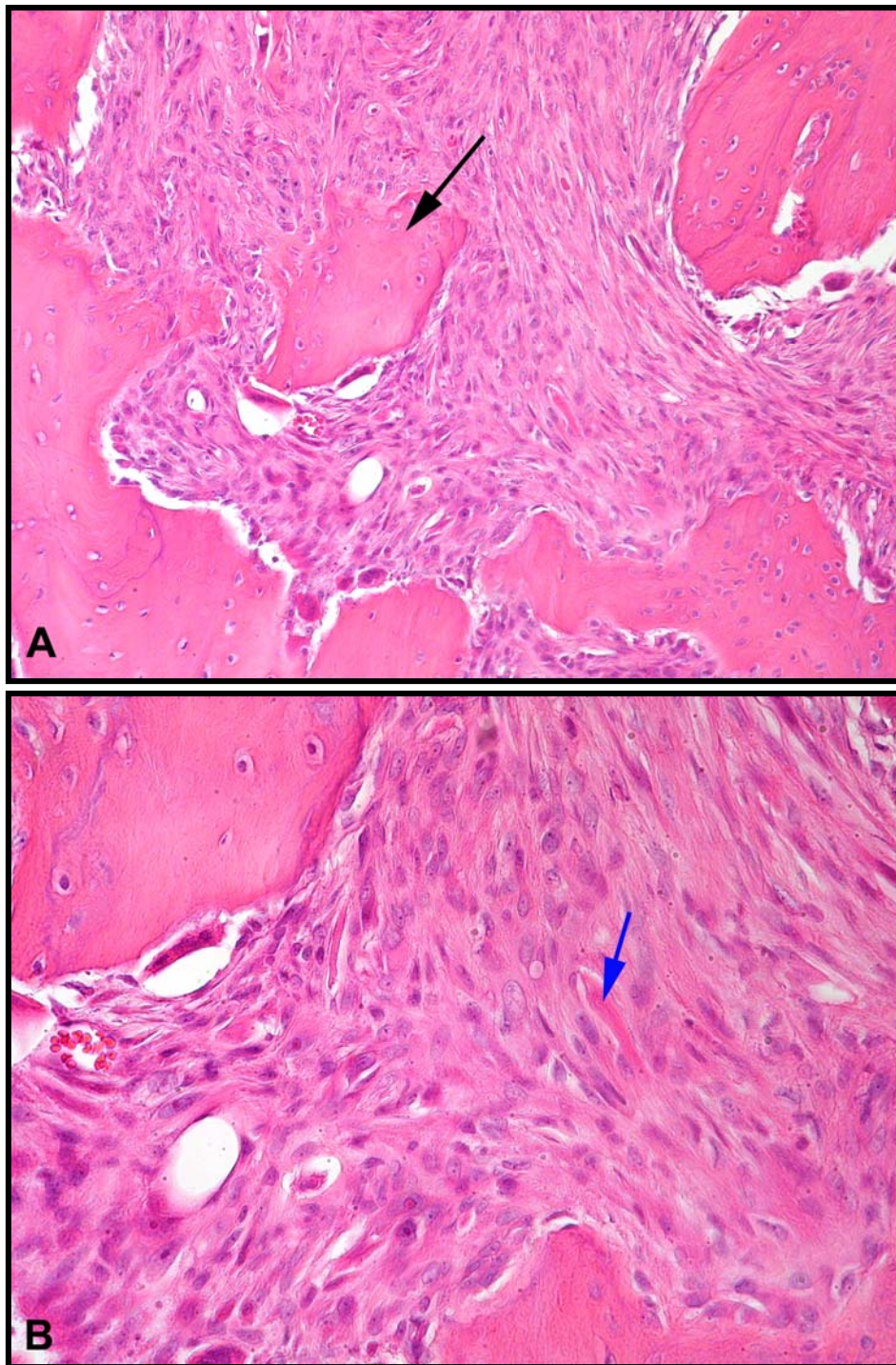


Figura 8- Osteossarcoma fibroblástico. **Figura A** – Infiltração do espaço medular por células neoplásicas fusiformes, semelhantes a fibroblastos, dispostas em várias direções, conferindo padrão fasciculado. Destruição de tecido ósseo pré-existente (osso residual - seta preta). (200x). **Figura B** – Detalhe figura A. Discreta quantidade de osteóide tumoral pode ser observada no centro da figura – seta azul. (400x) (HE).

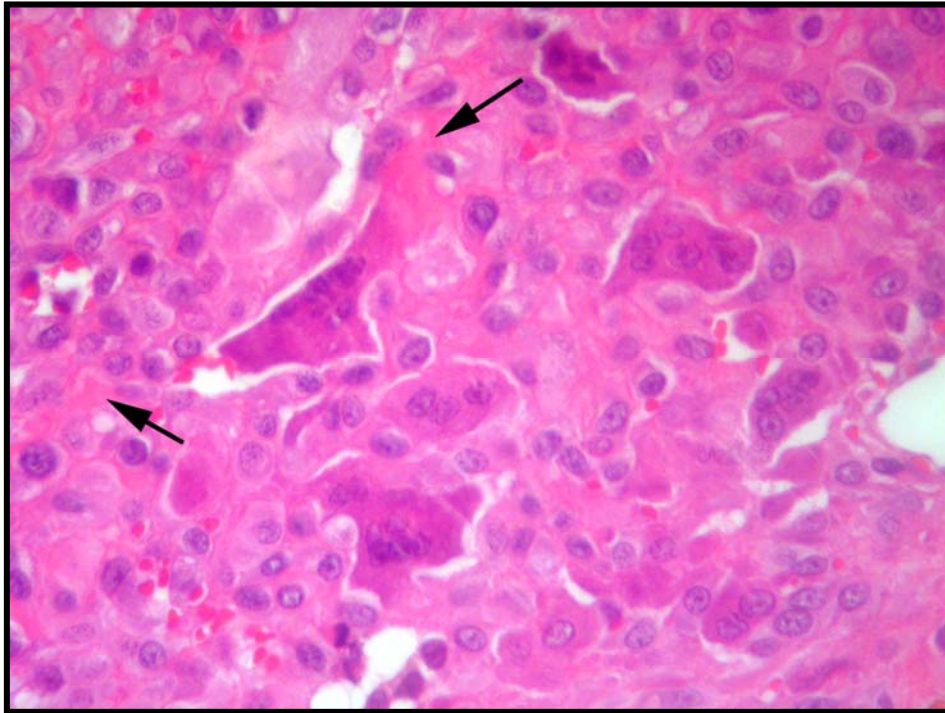


Figura 9- Osteossarcoma tipo células gigantes. Este subtipo é constituído por osteoblastos neoplásicos, aos quais estão entremeadas inúmeras células gigantes tumorais, multinucleadas, do tipo osteoclastos. Neste campo microscópico é mostrada mínima deposição de osteóide – setas (1000 x) (HE) .

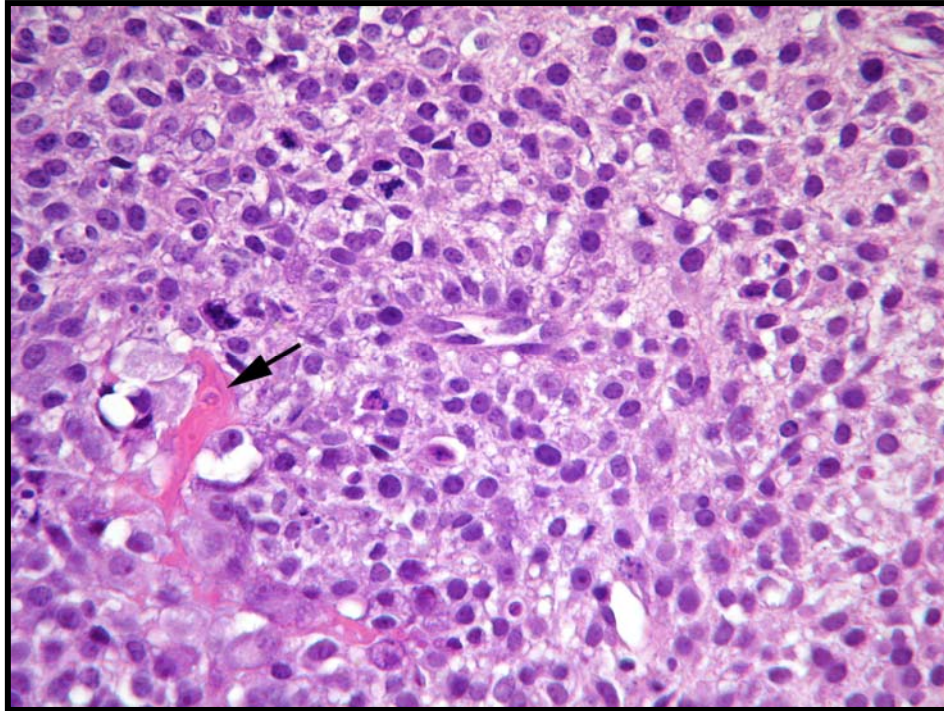


Figura 10- Osteossarcoma indiferenciado. Observar o padrão imaturo das células tumorais, as quais são pequenas e apresentam núcleos hiper cromáticos e mitoses freqüentes. Neste subtipo de osteossarcoma tipicamente visualiza-se escassa quantidade de osteóide - seta (400 x) (HE).

5.3- Análise imunoistoquímica de AE1/AE3, HHF35, Fator VIII, S-100, vimentina, 1A4, osteocalcina, CD34 e CD31.

Sessenta e quatro osteossarcomas foram submetidos à avaliação imunoistoquímica, tendo sido analisados os seguintes imunomarcadores: AE1/AE3, HHF35, Fator VIII, S-100, vimentina, 1A4, osteocalcina, CD34 e CD31. Os resultados obtidos na análise de HHF35, S-100, vimentina, osteocalcina e 1A4, estão sumarizados na tabela 2 e no ANEXO 1.

Tabela 2- Frequência da imunoexpressão dos marcadores HHF35, S-100, vimentina, osteocalcina e 1A4, correlacionados com o subtipo histológico.

Subtipo histológico	Total de casos (%)	Número de casos positivos (%)				
		HHF35	S-100	Vim	Ost	1A4
Osteoblásticos	31 (47,7%)	14 (53,8%)	22 (46,8%)	23 (42,7 %)	18 (43,9 %)	12 (34,3%)
Condrolásticos	14(21,5%)	4 (15,4%)	13 (27,7%)	13 (24,0 %)	10 (24,4 %)	9 (25,7%)
Fibroblásticos	15 (23,1%)	8 (30,8%)	10 (21,3%)	14 (25,9 %)	10 (24,4 %)	10 (28,5 %)
Tipo células gigantes	3 (4,7%)	0	1(2,1%)	3 (5,5 %)	2 (4,9 %)	2 (5,7 %)
Telangiectásico*	1 (1,5%)	0	1(2,1%)	1 (1,9 %)	1 (2,4 %)	1 (2,9 %)
Indiferenciados	1 (1,5%)	0	0	0	0	1 (2,9 %)
Total	65	26	47*	54*	41*	35*

Legenda: vim = vimentina; ost = osteocalcina. * Incluído o subtipo telangiectásico.

Os dados obtidos quanto à imunorreatividade de padrão focal (+) ou esparsa (++), foram considerados em conjunto para finalidade de análise estatística. Os casos que mostraram artefatos de técnica ou quantidade insuficiente de material foram excluídos da avaliação.

A imunoexpressão para o anticorpo AE1/AE3, em todos os osteossarcomas avaliados (58 casos), foi negativa. Os anticorpos CD-31 e CD-34 não apresentaram qualquer expressão imunoistoquímica, nem mesmo as estruturas vasculares presentes na lesão (controle interno negativo). Quanto à avaliação imunoistoquímica com Fator VIII, a mesma não foi possível, em virtude da formação de intensa quantidade de artefatos de técnica.

De 43 osteossarcomas analisados com o marcador HHF35, 26 (60,5 %) mostraram imunorreatividade positiva, sendo que reatividade de padrão difuso foi observada em 7 (16,3 %) tumores (4 osteoblásticos produtivos e 3 fibroblásticos) e imunomarcção de padrão focal foi exibida em 19 (44,2%) tumores (5 fibroblásticos, 10 do tipo osteoblástico e 4 condroblásticos) (tabela 3). A imunomarcção ocorreu especialmente nas áreas com células fusiformes (figura 11). Dezesete tumores (39,5%) apresentaram imunorreatividade negativa para HHF35.

Tabela 3- Correlação entre a imunexpressão de HHF35 e subtipos histológicos, em 43 casos de osteossarcoma canino.

	Osteob	Condro	Fibrobl	TCG	Total (%)
(-)	7	6	3	1	17
	16.28	13.95	6.98	2.33	39.53
	33.33	60.00	27.27	100.0	
(+))	4	3	3	0	10
	9.30	6.98	6.98	0.00	23.26
	19.05	30.00	27.27	0.00	
(++)	6	1	2	0	9
	13.95	2.33	4.65	0.00	20.93
	28.57	10.00	18.18	0.00	
(+++)	4	0	3	0	7
	9.30	0.00	6.98	0.00	16.28
	19.05	0.00	27.27	0.00	
Total	21	10	11	1	43
	48.84	23.26	25.58	2.33	100

Legenda- Osteob (osteoblástico); condro (condroblástico); fibrob (fibroblástico); TCG (tipo células gigantes); (-) negativo; (+) reatividade focal em menos de 30% de células tumorais; (++) reatividade focal, em 30 a 50% das células tumorais ; (+++) reatividade em mais de 50% das células. p - valor = 0.4938 (Fisher).

Cinquenta e sete osteossarcomas foram testados com proteína S-100, sendo que 46 (80,7 %) apresentaram imunopositividade. A imunorreatividade, além de ser identificada em células tumorais condroblásticas, ocorreu também em células osteoblásticas e fibroblásticas, e apresentou-se principalmente em padrão focal (37 casos – 64,9%), com intensa reação, não havendo dúvidas quanto à positividade. Imunoexpressão de padrão difuso foi verificada em 9 casos (15,8%). Seis tumores osteoblásticos, 4 fibroblásticos e 2 do tipo células gigantes foram negativos. Todos os osteossarcomas condroblásticos testados (13 casos) foram imunopositivos para a o anticorpo S-100 (tabela 4), tendo sido mais freqüente o padrão de reatividade esparsa ou focal, em menos de 30% das células (+) (figura 12).

Tabela 4- Correlação entre a imunoexpressão de proteína S-100 e subtipos histológicos de osteossarcoma canino.

	Osteob	Condro	Fibrobl	TCG	Total (%)
(-)	4	0	5	2	11
	7.02	0.00	8.77	3.51	19.30
	15.38	0.00	33.33	66.67	
(+))	10	6	4	0	20
	17.54	10.53	7.02	0.00	35.09
	38.46	46.15	26.67	0.00	
(++)	8	4	4	1	17
	14.04	7.02	7.02	1.75	29.82
	30.77	30.77	26.67	33.33	
(+++)	4	3	2	0	9
	7.02	5.26	3.51	0.00	15.79
	15.38	23.08	13.33	0.00	
Total	26	13	15	3	57
	45.61	22.81	26.32	5.26	100.0

Legenda- Osteob (osteoblástico); condro (condroblástico); fibrob (fibroblástico); TCG tipo células gigantes); (-) negativo; (+) reatividade focal em menos de 30% de células tumorais; (++) reatividade focal, em 30 a 50% das células tumorais ; (+++) reatividade em mais de 50% das células. p – valor = 0.4520 (Fisher).

A análise de 55 osteossarcomas com vimentina revelou imunomarcção positiva em 98,2% dos casos, tendo havido predomínio de marcação imunoistoquímica de padrão difuso (92,7%) (figura 13). Imunorreatividade de padrão focal (+) não foi observada. Em um caso (osteossarcoma osteoblástico produtivo) a reatividade a este anticorpo resultou negativa (tabela 5).

Tabela 5- Correlação entre a imunoexpressão de vimentina e subtipos histológicos, em 55 casos de osteossarcoma canino.

	Osteob	Condro	Fibrobl	TCG	Total (%)
(-)	1	0	0	0	1
	1.82	0.00	0.00	0.00	
	4.00	0.00	0.00	0.00	
(++)	1	1	1	0	3
	1.82	1.82	1.82	0.00	5.45
	4.00	7.69	7.14	0.00	
(+++)	23	12	13	3	51
	41.82	21.82	23.64	5.45	92.73
	92.00	92.31	92.86	100.0	
Total	25	13	14	3	55
	45.45	23.64	25.45	5.45	100

Legenda- Osteob (osteoblástico); condro (condroblástico); fibrobl (fibroblástico); TCG (tipo células gigantes); (-) negativo; (+) reatividade focal, em menos de 30% das células tumorais; (++) reatividade focal, em 30 a 50% das células tumorais; (+++) reatividade em mais de 50% das células.

Dentre 45 osteossarcomas avaliados para osteocalcina 41 (91%) apresentaram imunoexpressão positiva. Quatro casos (9%) foram negativos. Em 49% (22 casos) dos osteossarcomas a imunopositividade apresentou-se de padrão difuso e em 42% de padrão focal. Os tumores que exibiram padrão difuso de reatividade foram, por ordem decrescente de frequência, os osteoblásticos (7 casos pouco produtivos e 3 casos produtivos), condroblásticos (7 casos), fibroblásticos (3 casos) e tipo células gigantes (2 casos). A imunorreatividade focal foi verificada em 8 osteossarcomas osteoblásticos (6 produtivos e 2 pouco produtivos), em 7 fibroblásticos, em 3 condroblásticos e no telangiectásico (tabela 6).

A intensidade da marcação foi uniforme entre os casos analisados. A imunopositividade para a osteocalcina ocorreu no citoplasma das células osteoblásticas, condróides e fibroblásticas. As células gigantes tumorais (células tipo osteoclastos) também apresentaram citoplasmas intensamente marcados. A matriz condróide e a matriz osteóide não mostraram imunorreatividade (figura 14).

A marcação imunoistoquímica pela osteocalcina foi negativa em agrupamentos de células fusiformes de osteossarcomas fibroblásticos ou em áreas fibroblásticas de subtipos mistos (combinados) de osteossarcomas. Frequentemente estas células mostravam-se arranjadas em padrão fasciculado ou dispostas na periferia de áreas condróides.

Tabela 6- Correlação entre a imunexpressão de osteocalcina e subtipos histológicos, em 45 casos de osteossarcoma canino.

	Osteob	Indif	Condro	Fibrobl	TCG	Telang	Total (%)
(-)	3	0	0	0	1	0	4
	6.67	0.00	0.00	0.00	2.22	0.00	8.89
	14.29	0.00	0.00	33.33	0.00		
(+))	1	0	0	3	0	0	4
	2.22	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	8.89
	4.76	0.00	30.00	0.00	0.00		
(++)	7	0	3	4	0	1	15
	15.56	0.00	6.67	8.89	0.00	2.22	33.33
	33.33	30.00	40.00	0.00	100.0		
(+++)	10	0	7	3	2	0	22
	22.22	0.00	15.56	6.67	4.44	0.00	48.89
	47.62	70.00	30.00	66.67	0.00		
Total	21	0	10	10	3	1	45
	46.67	0.00	22.22	22.22	6.67	2.22	100.0

Legenda- Osteob (osteoblástico); indif (indiferenciado); condro (condroblástico); fibrob (fibroblástico); TCG (tipo células gigantes); telang (telangiectásico); (-) negativo; (+) reatividade focal, em menos de 30% das células tumorais; (++) reatividade focal, em 30 a 50% das células tumorais; (+++) reatividade em mais de 50% das células.

A imunorreação positiva para o anticorpo alfa-actina de músculo liso (1A4) ocorreu em células tumorais fusiformes e poliédricas (figura 15). Pericitos e células musculares lisas da parede vascular também foram marcadas. De 57 casos avaliados, 35 tumores (61%), apresentaram imunoreatividade positiva para este anticorpo (tabela 7), sendo que 30 mostraram padrão de imunomarcção focal, cuja distribuição, em ordem decrescente de frequência, foi a seguinte: osteoblásticos (11 casos), condroblásticos (8 casos), fibroblásticos (9 casos), telangiectásico (1 caso e tipo células gigantes (1 caso). Em 5 casos a imunoreatividade para o anticorpo 1A4 exibiu padrão difuso e em 22 resultou negativa.

Tabela 7- Correlação entre a imunoexpressão de 1A4 e subtipos histológicos de osteossarcoma canino.

	Osteob	Indif	Condro	Fibrobl	TCG	Telang	Total (%)
(-)	11	0	5	5	1	0	22
	19.30	0.00	8.77	8.77	1.75	0.00	38.60
	47.83	0.00	35.71	33.33	33.33	0.00	
(+))	8	0	6	5	0	0	19
	14.04	0.00	10.53	8.77	0.00	0.00	33.33
	34.78	0.00	42.86	33.33	0.00	0.00	
(++)	3	0	2	4	1	1	11
	5.26	0.00	3.51	7.02	1.75	1.75	19.30
	13.04	0.00	14.29	26.67	33.33	100.0	
(+++)	1	1	1	1	1	0	5
	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	0.00	8.77
	4.35	100.0	7.14	6.67	33.33	0.00	
Total	23	1	14	15	3	1	57
	40.35	1.75	24.56	26.32	5.26	1.75	100.0

Legenda- Osteob (osteoblástico); indif (indiferenciado); condro (condroblástico); fibrobl (fibroblástico); TCG (tipo células gigantes); telang (telangiectásico); (-) negativo; (+) reatividade focal em menos de 30% das células tumorais; (++) reatividade focal, em 30 a 50% das células tumorais; (+++) reatividade em mais de 50% das células.

No presente estudo não foi verificada correlação estatisticamente significativa entre os subtipos histológicos e outras variáveis, tais como aspectos clínicos (raça, sexo idade e localização das lesões) ou com a expressão dos diferentes anticorpos.

5.4- Análise imunoistoquímica de Ki-67 (MIB-1)

A avaliação do índice de proliferação celular com Ki-67 (MIB-1), foi procedida em 53 tumores (ANEXO 2). Entre estes 37 (69,8 %) mostraram imunopositividade para Ki-67 e 16 (30,2%) foram negativos (tabela 8). Os casos negativos foram excluídos da análise estatística.

Tabela 8- Correlação entre a imunopositividade de Ki-67 e subtipos histológicos, em 53 casos de osteossarcoma canino.

	Osteob	Condro	Fibrobl	TCG	Total (%)
Negativos	11	3	2	0	16
	20.7	5.66	3.77	0.00	30.19
	44.00	23.08	15.38	0.00	
Positivos	14	10	11	2	37
	26.42	18.87	20.75	3.77	69.81
	56.00	76.92	84.62	100.0	
Total	25	13	13	2	53
	47.17	24.53	24.53	3.77	100.0

Legenda- Osteob (osteoblástico); condro (condroblástico); fibrobl (fibroblástico); TCG (tipo células gigantes).
p – valor = 0.1866 (Fisher).

Os osteossarcomas osteoblásticos pouco produtivos, na sua totalidade, apresentaram índice de proliferação celular alto ou altíssimo (figura 16), sendo que o índice altíssimo ocorreu em aproximadamente 2/3 dos tumores (63%). Por outro lado 45% dos osteoblásticos produtivos exibiram índice de proliferação altíssimo e 27% mostraram índice baixíssimo (tabela 9).

Os osteossarcomas fibroblásticos apresentaram índice de proliferação celular alta, em 57% dos casos, e baixíssimo ou baixo no restante. Nenhum osteossarcoma fibroblástico exibiu índice altíssimo. Já os osteossarcomas condroblásticos apresentaram índice de proliferação baixíssimo (< de 5% de núcleos de células tumorais marcados), em pouco mais da metade dos casos (55%). Valores altos de índice de proliferação celular ($10 \leq 30$), ocorreram em áreas intratumorais de padrão fibroblástico (1 caso); osteoblástico (1 caso) e condroblástico (1 caso) (tabela 9).

Os dois osteossarcomas do tipo células gigantes e o único osteossarcoma telangiectásico, analisados com Ki-67, revelaram elevado índice de proliferação celular (ANEXO 2).

Verificou-se que o subtipo histológico está correlacionado com o índice de proliferação celular, ou seja, observou-se que a diferença na incidência de cada subtipo é significativa, sendo que o subtipo osteoblástico pouco produtivo apresentou maiores proporções de índice de proliferação celular alto ou altíssimo (tabela 9).

Tabela 9- Frequências obtidas dos osteossarcomas caninos imunopositivos para Ki-67 (37 casos).

Subtipo histológico	IPC bxmo (n - %)	IPC bx (n - %)	IPC alt (n - %)	IPC altmo (n - %)	n
Osteoblásticos pouco produtivos	0 (0%)	0 (0%)	3 (38%)	5 (63%)	8
Osteoblásticos produtivos	3 (27%)	1 (9%)	2 (18%)	5 (45%)	11
Fibroblásticos	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	0 (0%)	7
Condroblásticos	6 (55%)	0 (0%)	3 (27%)	2 (18%)	11
Total	10	3	12	12	37

Legenda: IPC = índice de proliferação celular; bxmo = baixíssimo; bx = baixo; alt = alto; altmo = altíssimo

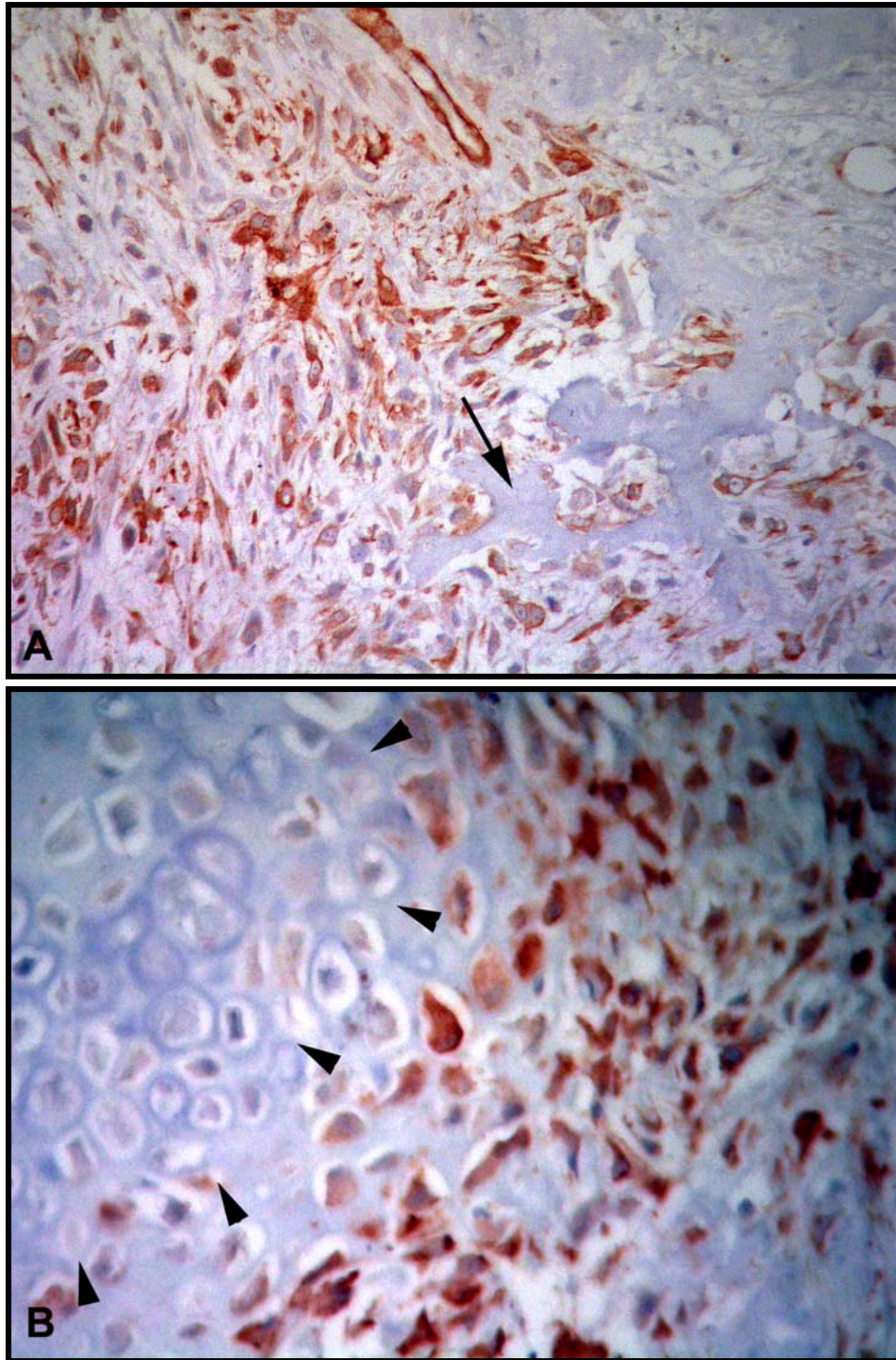


Figura 11- Imunomarcção para HHF35 em osteossarcoma condroblástico (200x).

Figura A - Imunorreatividade de padrão difuso, é observada no citoplasma das células neoplásicas. À esquerda pode ser visualizado osteóide tumoral (seta). **Figura B** – Não há imunoexpressão nas células condróides visualizadas no lado esquerdo do campo (cabeças de seta).

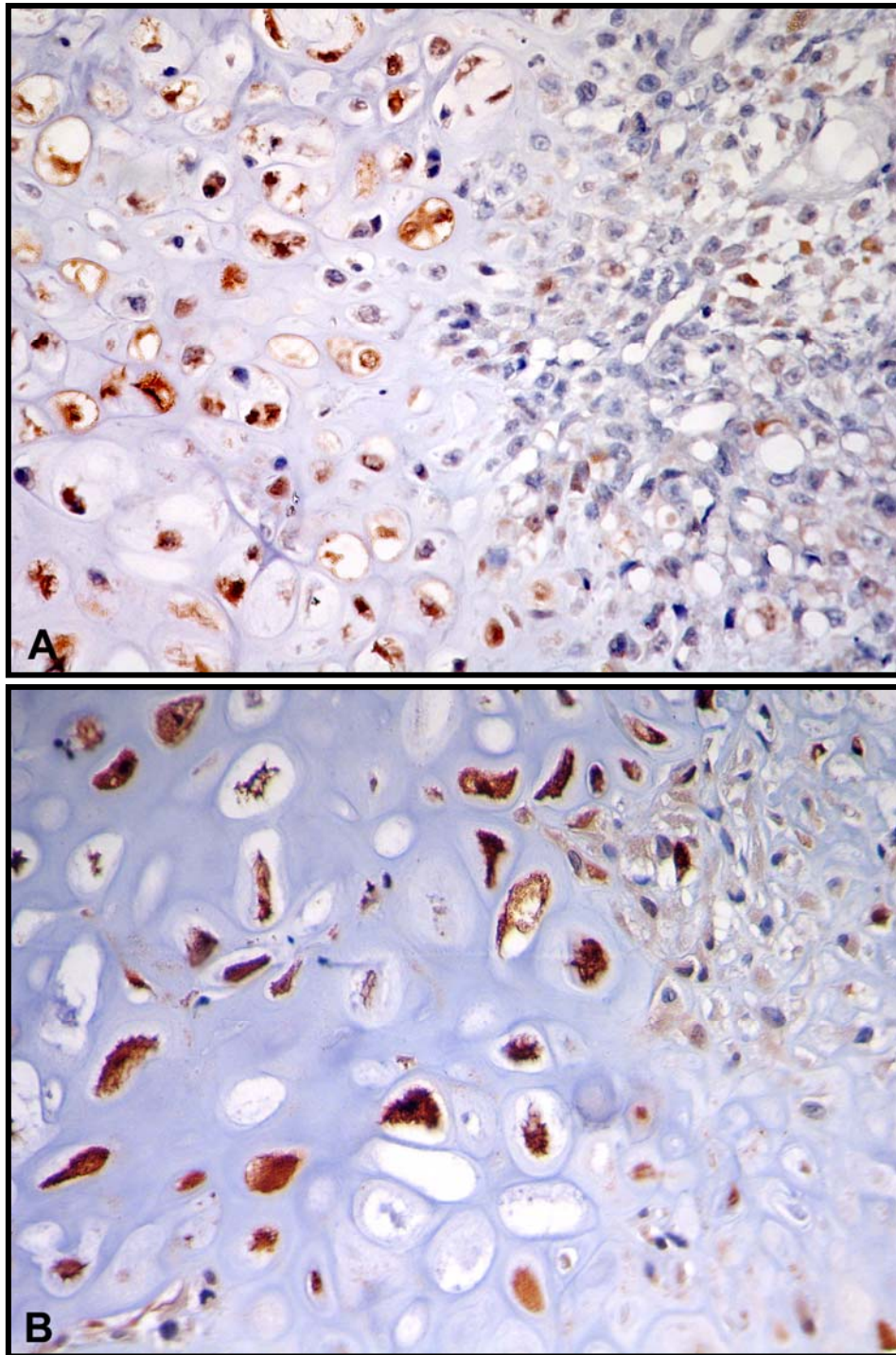


Figura 12- Imunoexpressão para proteína S-100 em osteossarcoma condroblástico. **Figuras A** (200x) e **B** (1000x) – Observar positividade apenas nas áreas condroblásticas da neoplasia.

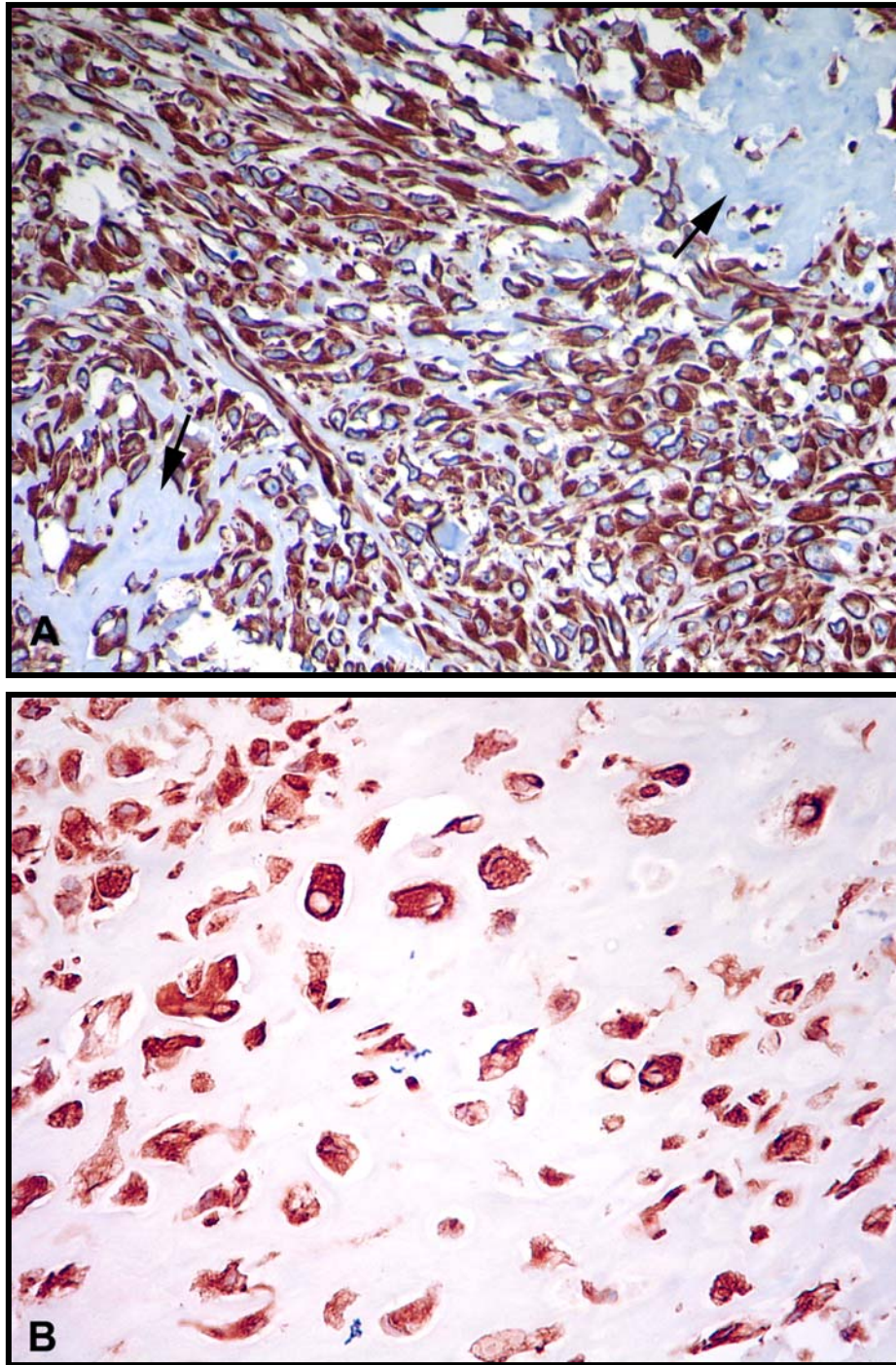


Figura 13- Imunomarcção para vimentina. **Figura A:** imunoexpressão de padrão difuso é observada no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma osteoblástico. Ilhotas de osteóide tumoral podem ser visualizadas, entremeadas às células tumorais (setas) (200x). **Figura B** – marcação em células tumorais de áreas condroblásticas (400 x).

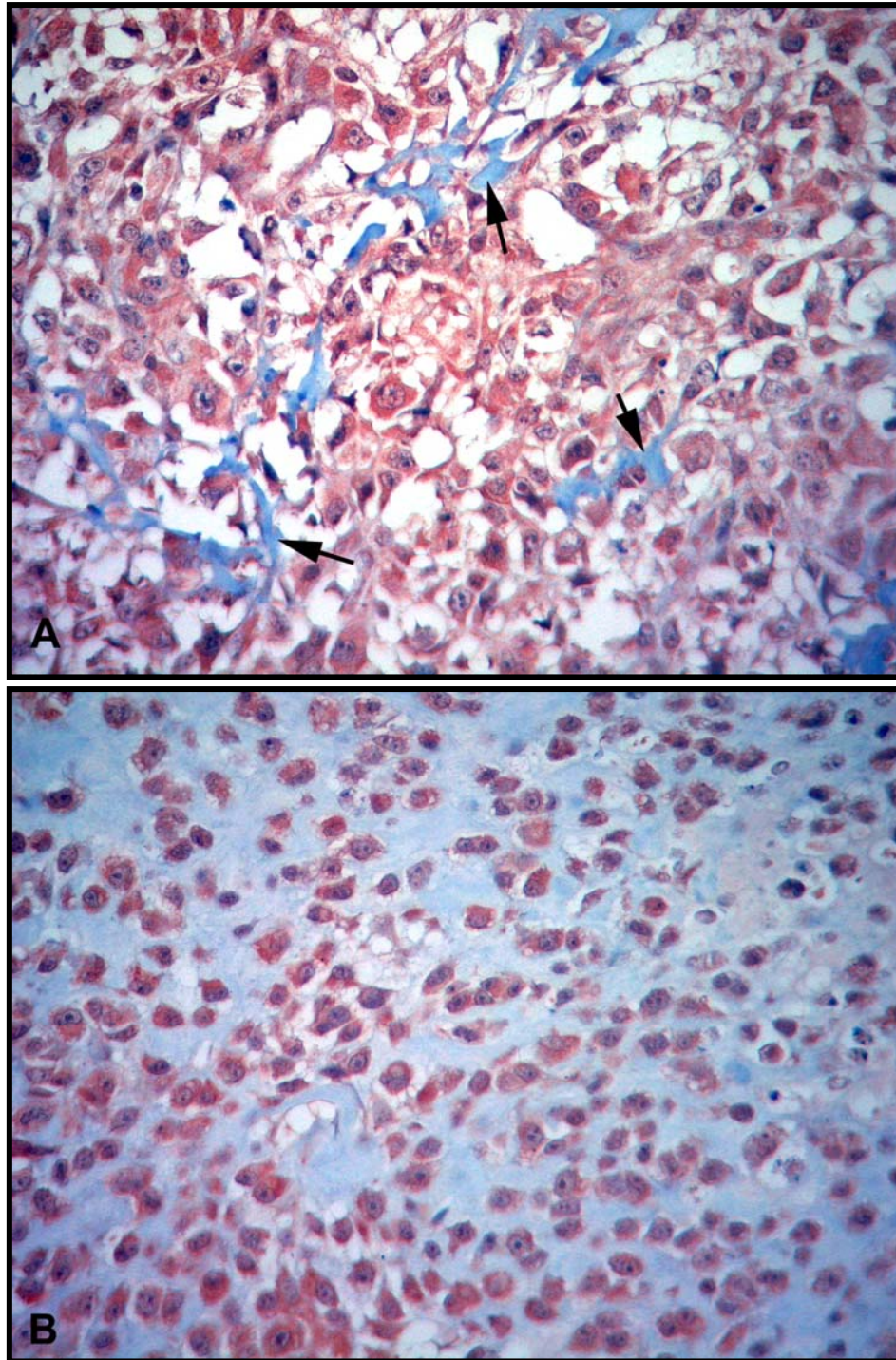


Figura 14- Imunomarcção para osteocalcina (400x). **Figuras A e B:** observar munopositividade de padrão difuso (+++) em área de osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo, em A, e padrão condroblástico, em B. Notar que a matriz tumoral não exhibe imunoexpressão do anticorpo (setas).

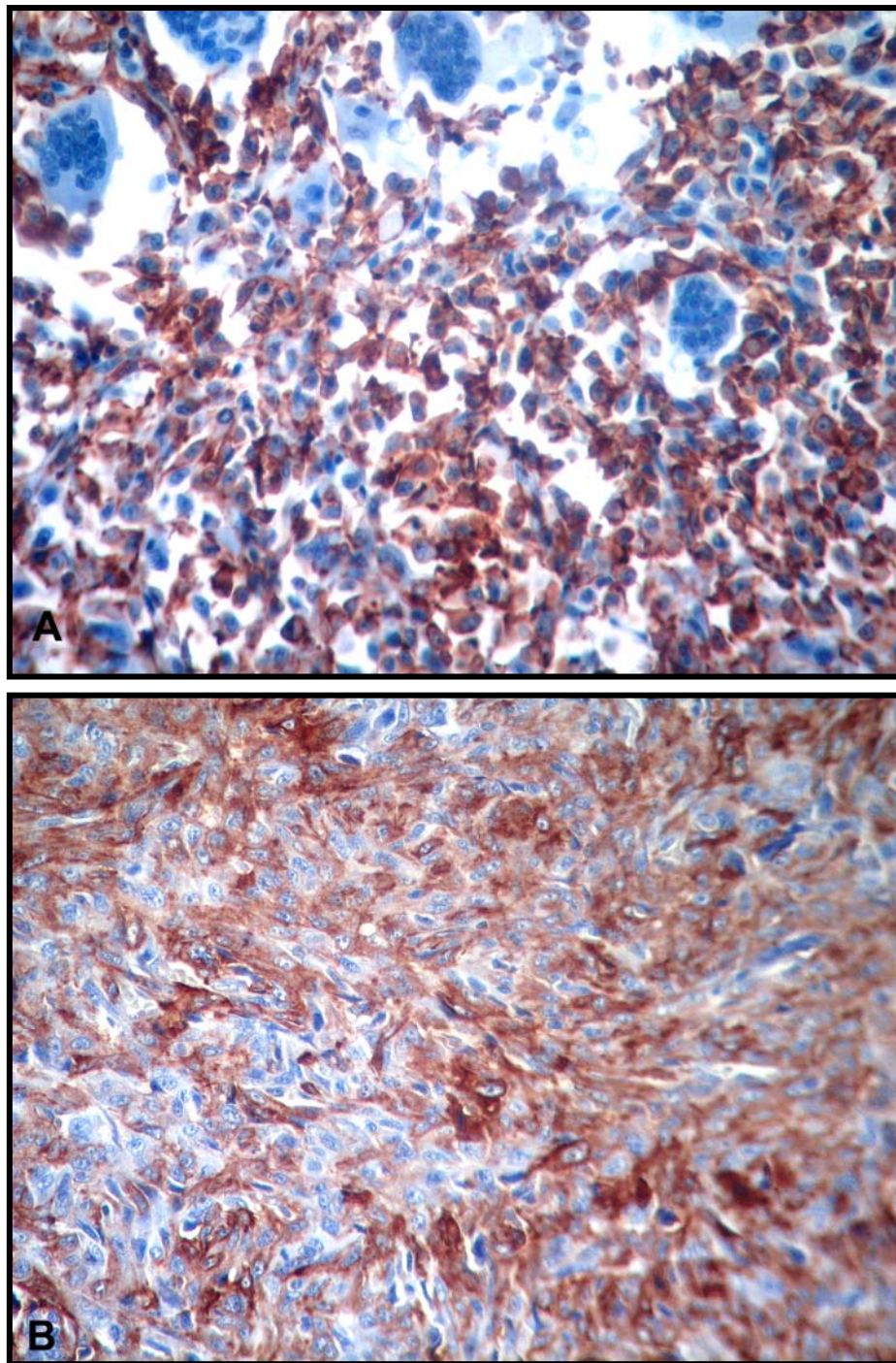


Figura 15- Imunomarcção para 1A4 em osteossarcomas (200 x). Imunorreatividade de padrão difuso é observada no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma do tipo células gigantes, **na figura A**. Na **figura B**, a imunoexpressão ocorreu especialmente em células fusiformes, em osteossarcoma fibroblástico.

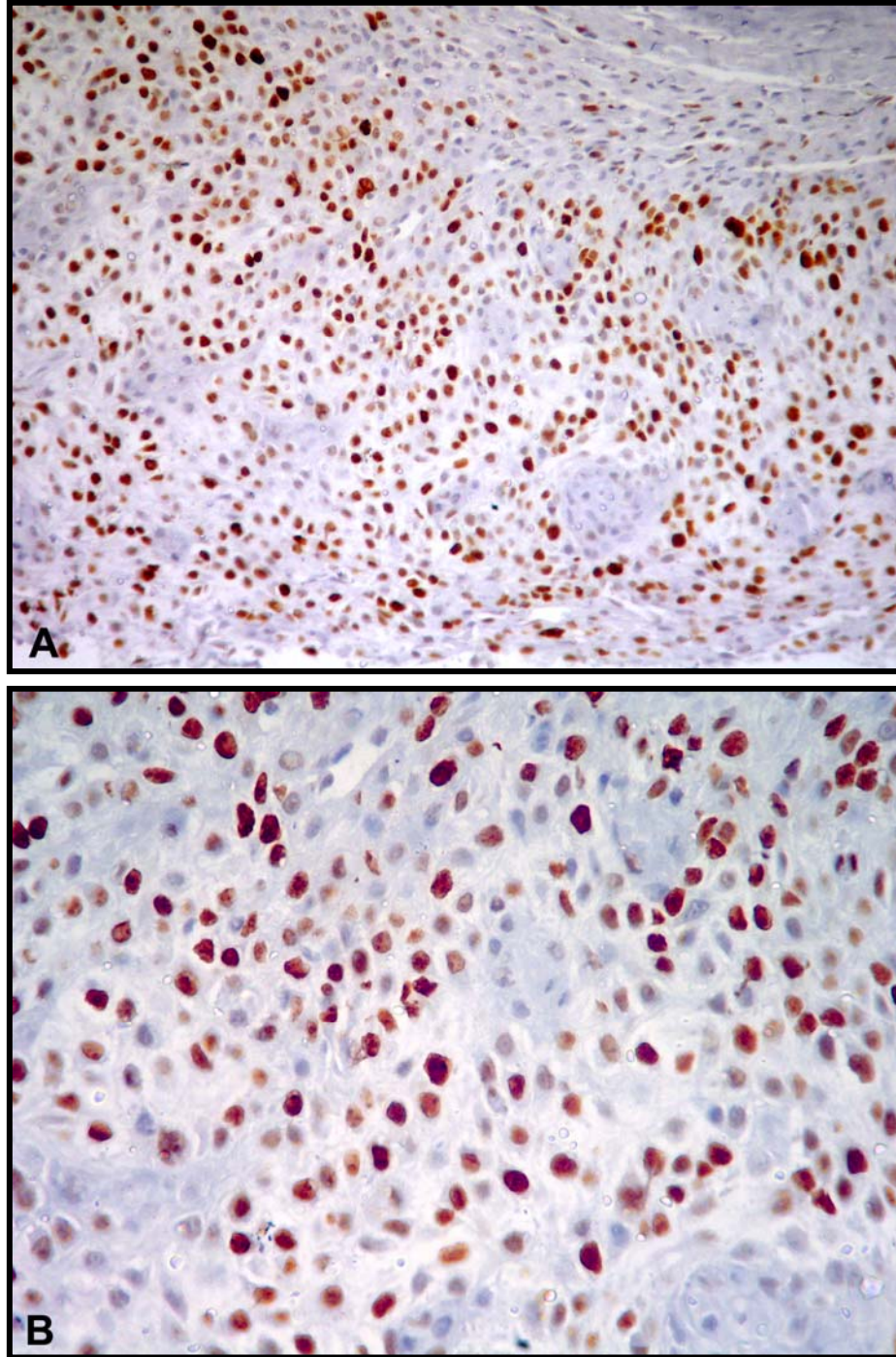


Figura 16- Imunomarcção para Ki-67. **Figura A** – Visão panorâmica mostrando inúmeras células neoplásicas com marcação nuclear, caracterizando o elevado índice de proliferação celular (grau altíssimo), em osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo (100x). **Figura B.** Detalhe da figura A (400x).

6- DISCUSSÃO

6.1- Dados clínicos e histopatológicos

Neste estudo observou-se que o osteossarcoma é mais comum em cães adultos com idade média de 7,4 anos. Resultado semelhante foi referido por HEYMAN *et al.* (1992); ZEZZA NETO *et al.* (1992), DELISLE e DEVAUCHELLE (1996) e CAVALCANTI *et al.* (2004).

Os trabalhos de BRODEY e RISER (1969) e de POOL (1990), demonstraram discreta predominância de osteossarcoma entre os cães machos, exceto na raça São Bernardo, cujas fêmeas foram as mais afetadas. Na presente análise também foi verificada discreta prevalência de osteossarcoma entre os cães machos. RU *et al.* (1998), afirmam que, comparando-se com as fêmeas, os cães machos apresentam risco aumentado de desenvolver osteossarcoma.

Segundo BERG *et al.* (1996); DELISLE e DEVAUCHELLE (1996) e SPODNICK *et al.* (1992), a raça constitui um significativo fator de risco para osteossarcoma, sendo os animais das raças de grande porte ou gigantes, os mais afetados. Nesta análise também confirmaram-se estes achados.

Comprovou-se haver predomínio de osteossarcoma em cães de raça pura, tanto neste, quanto em estudo anterior (CAVALCANTI *et al.*, 2004). As raças mais afetadas por ordem decrescente de frequência, no presente estudo, foram: Rottwailer, Labrador Retriever, Boxer e Dogue Alemão; no anterior, a raça mais afetada foi o Pastor Alemão. DALECK (1996), no Brasil, refere maior ocorrência de osteossarcoma no Fila Brasileiro e HAMMER *et al.* (1995), nos Estados Unidos, relataram maior incidência no Pastor Alemão.

O estudo anterior realizado por CAVALCANTI *et al.* (2004), abrangeu a análise de casos de osteossarcoma canino na década de 90. Naquele estudo a raça mais afetada foi a Pastor Alemão e neste foi a Rottwailer. Observa-se que ambas as raças afetadas foram de cães de grande porte. Este fato se deve provavelmente aos períodos analisados e aos hábitos (modismos) em relação à escolha da raça pelos proprietários, em

distintas épocas. Atualmente há um crescente interesse em criar animais hábeis na função de vigilância, como por exemplo, cães da raça Rottweiler.

Este estudo também demonstrou que cães Sem Raça Definida (SRD) apresentam acentuada susceptibilidade ao osteossarcoma, ocupando o segundo lugar na frequência de aparecimento desta neoplasia, quando são considerados, em conjunto, animais de raça pura e animais SRD.

TJALMA (1990), refere que cães com peso superior a 36,5 kg têm entre 61 a 180 vezes mais chance de desenvolver tumores esqueléticos do que aqueles com peso inferior a 9 kg. RU *et al.*(1998), também referem que o peso elevado, característica de cães de raças gigantes, constitui fator de risco para osteossarcoma. Porém, neste mesmo estudo os autores verificaram haver mais forte, e mais consistente, associação de osteossarcomas com a alta estatura do que com o peso, sugerindo que o crescimento rápido pode constituir fator de risco para estes tumores.

Em relação à distribuição anatômica das lesões, verificou-se expressiva prevalência de osteossarcoma no esqueleto apendicular (77,4%), sendo o fêmur, o rádio e rádio/ulna os ossos mais afetados, por ordem decrescente de frequência. Estes achados estão em concordância com os estudos de BRODEY e RISER (1969); THOMSON e FUGENT (1992) e COOLEY e WATERS (1997), os quais observaram que o esqueleto apendicular é três a quatro vezes mais afetado que o axial. CAVALCANTI *et al.* (2004), também verificaram distribuição e frequência semelhantes. KNECHT e PRIESTER (1998), demonstraram que os membros anteriores são duas vezes mais afetados do que os pélvicos.

A porcentagem de lesões, observadas nesta análise, comprometendo o esqueleto axial foi de 22,6 %, sendo mais afetados os ossos do crânio, o que está em concordância com as observações de HEYMAN *et al.* (1992), COOLEY e WATERS (1997) e KNECHT e PRIESTER (1998).

O osteossarcoma frequentemente localiza-se na metáfise dos ossos longos (FEENEY *et al.*, 1982), no entanto, nesta avaliação não foi possível a obtenção de dados precisos sobre este aspecto. É possível que a alta incidência de osteossarcoma no esqueleto apendicular, especialmente nos membros anteriores de animais de raças de grande porte, e

em metáfises de ossos longos, esteja relacionada aos altos níveis de crescimento do tecido ósseo na zona metafisária e sobrecarga de peso sustentada nos membros anteriores.

Osteossarcoma é uma neoplasia altamente metastatizante, ocorrendo metástases principalmente para os pulmões, sendo que 90% dos animais, desenvolvem metástases em até um ano após a amputação do membro (BRODEY e RISER, 1969). Estudos anteriores verificaram que, já ao diagnóstico, as metástases pulmonares estavam presentes em 5 a 11 % dos casos (HEYMAN *et al.*, 1992; La RUE e WITHROW, 1989; PACHECO *et al.*, 1999).

Não foi possível avaliar a incidência de metástases, em virtude de não constarem nos prontuários dados referentes à presença ou não de metástases ao exame radiográfico. A falta de dados nos prontuários, referentes à presença ou não de metástases ao diagnóstico e determinação precisa do tempo de sobrevivência livre da doença, após ter sido instituído um tratamento, possibilitariam o estudo do prognóstico do osteossarcoma.

Histologicamente verificou-se que os subtipos de osteossarcoma observados, por ordem decrescente de frequência, foram: osteoblásticos, fibroblásticos, condroblásticos e do tipo células gigantes. Os subtipos telangiectásico e indiferenciado ocorreram raramente, com um caso de cada. Entre os osteoblásticos o subtipo produtivo correspondeu a quase 2/3 destes. HAMMER *et al.* (1995) e KIRPENSTEIJN *et al.* (2002), também verificaram distribuição e frequência semelhantes.

Os osteossarcomas condroblásticos e fibroblásticos, em humanos, estão correlacionados com um melhor prognóstico do que os demais subtipos histológicos (SCOTLANDI *et al.*, 1995). No osteossarcoma canino, todavia, há controvérsias em relação à determinação destes parâmetros (KIRPENSTEIJN, 2002; THOMPSON e POOL, 2002), no entanto, MISDORP E HART (1979), verificaram que cães apresentando osteossarcomas fibroblásticos tinham um prognóstico melhor do que animais com outras variantes histológicas do tumor.

6.2- Análise imunoistoquímica da expressão de AE1/AE3, HHH35, Fator VIII, S-100, vimentina, 1A4, osteocalcina, CD31 e CD34.

Não foi observada, neste estudo, imunorreatividade para AE1/AE3 em nenhum dos osteossarcomas analisados, indicando a inexistência de células tumorais com diferenciação epitelial. Este achado está em discordância com as observações de HASEGAWA *et al.* (1991), que verificaram imunoexpressão de AE1/AE3 em células tumorais de osteossarcomas humanos, caracterizando desta forma o imunofenótipo epitelial destas células. No entanto, convém acrescentar, que tais observações se realizaram em uma pequena quantidade de casos.

A proteína S-100 é assim denominada por causa de sua solubilidade em sulfato de amônia 100% e é uma proteína altamente específica para tecido nervoso (especialmente nas células de Schwann), contudo também é encontrada em grande diversidade de tipos celulares normais, tais como: condrócitos, melanócitos, histiócitos, adipócitos, músculo cardíaco e esquelético, entre outros. Este anticorpo permite, principalmente, a evidenciação de neoplasias constituídas por células de Schwann ou melanócitos (HASEGAWA *et al.*, 1997; ALVES *et al.*, 1999).

Os diversos subtipos de osteossarcoma avaliados neste estudo, especialmente os condroblásticos, apresentaram imunoexpressão de proteína S -100. A imunorreatividade foi verificada em células tumorais condroblásticas, fibroblásticas e osteoblásticas. Inúmeros estudos com osteossarcomas humanos também identificaram a expressão de proteína S-100 nos mesmos tipos celulares identificados neste estudo (OKAJIMA *et al.* 1988; HASEGAWA *et al.* (1991) e HASEGAWA *et al.* (1997). OKAJIMA *et al.* (1988), aventam a possibilidade dos osteoblastos malignos do osteossarcoma apresentarem a capacidade de sintetizar proteína S-100.

A vimentina é considerada o mais importante dos filamentos intermediários protéicos, pois está presente na maioria das células fetais no início do desenvolvimento. As células mesenquimatosas e células endoteliais apresentam imunomarcção para vimentina (CERILLI e WICK, 2006).

Neste estudo a imunoeexpressão de vimentina ocorreu em 98,2 % dos tumores analisados, considerando-se, portanto, que a reatividade positiva das células tumorais à vimentina confirma a origem mesenquimal destas.

HASEGAWA *et al.* (1991), referem ter observado imunomarcção positiva para vimentina em todos (18 casos) osteossarcomas humanos por eles avaliados. Entretanto, não foram identificados relatos anteriores de avaliação sistemática da expressão de vimentina em tecidos de osteossarcomas caninos. Em um estudo foram realizados testes imunistoquímicos para vimentina em exames citológicos de osteossarcoma canino (BARGER *et al.*, 2005).

Em apenas um único caso a expressão da vimentina foi negativa. Considerando que a imunomarcção para este anticorpo, em termos práticos, pode ser utilizada para avaliar a qualidade da imunorreção e a viabilidade do material (DABBS, 2006). Neste caso atribuiu-se o resultado negativo à uma possível perda de antigenicidade tecidual, devido ao processo de descalcificação ou outros fatores de ordem técnica, uma vez que o tecido não estava necrótico.

A actina de músculo liso (1A4) reage especificamente com o isotipo alfa da actina de músculo liso. Não reage com actina de células musculares esqueléticas ou cardíacas ou com actina de células não musculares. Este anticorpo possibilita o diagnóstico de neoplasias de origem muscular, pois é útil na determinação da diferenciação muscular lisa, miofibroblástica ou mioepitelial (ALVES *et al.*, 1999).

O anticorpo 1A4 também é um imunomarcador para células miofibroblásticas, células epiteliais e pericitos, freqüentemente desmina-negativos (ALVES, *et al.*, 1999; DABBS, 2006).

O HHF35 é uma outra classe de actina muscular e reconhece os isotipos alfa e gama das actinas musculares, contudo não reage com as actinas não musculares. Este anticorpo permite a evidencição de células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas e de leiomiiossarcomas e rabiomiiossarcomas (ALVES *et al.*, 1999).

Observou-se que o osteossarcoma canino expressa frequentemente marcadores de musculatura lisa. Tanto 1A4 quanto HHF35 foram demonstrados em torno de 60% dos casos, sendo que a grande maioria destes apresentou padrão de distribuição focal, ou seja, 1A4 (86%) e HHF35 (73%). Padrão difuso foi verificado em apenas 5 casos. De acordo com ALVES *et al.* (1999), reações difusas e intensas costumam ser interpretadas como evidência de diferenciação para músculo liso. Estas observações sugerem uma possível diferenciação miofibroblástica ou muscular lisa ou mioepitelial nos diferentes subtipos de osteossarcoma canino. Tais achados corroboram aqueles de HASEGAWA *et al.* (1991), que afirmam ter identificado imunorreatividade de células tumorais do osteossarcoma humano para o anticorpo 1A4.

Em termos práticos, a situação que se apresenta como problemática é o diagnóstico diferencial de osteossarcoma fibroblástico ou fusocelular com o leiomiossarcoma ósseo primário ou metastático. Deve-se levar em consideração que no primeiro caso, em geral, a expressão de 1A4 e HHF35 é focal; já no leiomiossarcoma é difusa. Outro aspecto a ser lembrado é que apenas o osteossarcoma produz osteóide, característica esta que é definitiva para o diagnóstico deste tipo de tumor.

A avaliação imunoistoquímica com o Fator VIII mostrou-se prejudicada devido à presença de artefato de técnica, caracterizado por intensas “reações de fundo”. HASEGAWA *et al.* (1991), ao estudarem o osteossarcoma humano não averiguaram qualquer expressão para Fator VIII.

ALVES *et al.* (1999), referem que apesar do fator VIII apresentar alta especificidade para demonstração de diferenciação vascular, em neoplasias do homem, seu uso tem sido sobrepujado pelo CD31 e CD34, os quais apresentam maior sensibilidade. Entretanto, neste estudo os testes imunoistoquímicos com estes dois outros anticorpos (CD31 e CD34), em osteossarcoma canino, também não demonstraram qualquer reatividade. É possível que, em virtude destes anticorpos serem anti-tecido humano não tenha havido reatividade em tecido de cão. O processo de descalcificação, ao qual os tecidos tumorais foram submetidos também pode ter interferido nos resultados.

Os osteossarcomas caninos avaliados com anti-osteocalcina humana, em sua maioria, apresentaram reação positiva. Ocorreu imunorreatividade principalmente com o citoplasma das células tumorais e, como era esperado, não houve expressão na matriz tumoral. Tais achados são consistentes com as observações de HASEGAWA *et al.* (1991) e TAKADA *et al.* (1992), que referem que a osteocalcina está localizada no citoplasma de células osteoblásticas, de ossos normais ou osteossarcomas, mas não na matriz osteóide tumoral. HOENERHOFF *et al.* (2004), também confirmaram tais achados em osteossarcoma canino.

Neste trabalho verificou-se que houve reatividade positiva especialmente em células osteoblásticas, entretanto, a reatividade com a osteocalcina também ocorreu em células tumorais condroblásticas e fibroblásticas, aventando a possibilidade de que tais células também podem estar relacionadas à produção de matriz osteóide e/ou osso tumoral nos osteossarcomas. HASEGAWA *et al.* (1991), também referem a ocorrência de imunexpressão de osteocalcina em condroblastos.

O anticorpo osteocalcina, apesar de ter sido produzido contra antígenos humanos, reagiu favoravelmente com células de osteossarcoma canino, fixado em formalina e incluso em parafina, de forma que este anticorpo pode ser utilizado para o diagnóstico imunistoquímico de rotina de tumores ósseos desta espécie.

Apesar da viabilidade, o emprego da osteocalcina no diagnóstico do osteossarcoma deve ser criterioso, uma vez que em estudo realizado por TAKADA *et al.* (1992), com osteossarcoma humano, verificou-se que a imunexpressão de osteocalcina não ocorre apenas no osteossarcoma, mas também em outros tipos de lesões, tais como, osteomielite, osteomas ou outros tumores ósseos. Estudos para avaliação destes aspectos na espécie canina ainda são necessários.

Os resultados obtidos mostram que o anticorpo anti-osteocalcina não apresenta especificidade, pois marcou também outros elementos celulares, além das células com fenótipo osteoblástico, tais como células gigantes do tipo osteoclastos. Contudo, o anticorpo apresentou 91% de sensibilidade na demonstração de células com fenótipo osteoblástico. Tais achados corroboram aqueles de FANBURG-SMITH *et al.*, (1999), que

referem índices aproximados de sensibilidade deste anticorpo, em estudo com osteossarcoma humano.

Não houve significância entre os subtipos histológicos e outras variáveis, tais como: raça, sexo, idade e localização das lesões.

Na avaliação imunoistoquímica também não foi observada significância entre os subtipos histológicos e expressão dos diversos anticorpos utilizados. Considerou-se que tal fato deveu-se à grande quantidade de casos onde a imunomarcção pelos anticorpos resultou negativa. Nos casos onde não houve imunorreatividade pode ter ocorrido perda de antigenicidade para estes anticorpos. Outra possibilidade que pode ser aventada é que em virtude destes anticorpos terem sido desenvolvidos contra antígenos humanos, pode não ter havido especificidade para os mesmos, especialmente naqueles anticorpos onde a especificidade é espécie-dependente. A descalcificação dos tecidos também pode ter influenciado a antigenicidade para alguns dos anticorpos.

6.3- Análise imunoistoquímica da expressão de Ki-67 (MIB-1)

A avaliação do índice de proliferação celular em neoplasias de animais com o anticorpo anti-humano Ki-67 é de utilização simples. O único aspecto que constitui um empecilho para sua utilização, na rotina diagnóstica, na Medicina Veterinária é o alto custo do anticorpo.

No que se refere à aplicação do Ki-67 para avaliação do índice de proliferação celular de osteossarcoma canino, este pode ser utilizado, considerando-se a possibilidade deste tipo de avaliação permitir a predição do prognóstico ou até mesmo auxiliar na escolha da terapia mais adequada a cada caso.

Embora a avaliação de Ki-67 tenha sido amplamente realizada em diversos tumores de cães, tais como mastocitomas (ABADIE *et al.*, 1999; SEGUIN *et al.*, 2006) e tumores de mama (DE MATOS *et al.*, 2006), há poucos relatos em osteossarcoma canino.

Entretanto, a análise da imunexpressão de Ki-67, pode ser utilizada para predição do prognóstico destes tumores (OHTA *et al.*, 2004).

SCOTLANDI *et al.* (1995), em estudo com osteossarcoma humano, demonstraram, através da análise de dados clínicos, existir correlação positiva entre a imunexpressão de Ki-67 e os subtipos histológicos de osteossarcoma.

A imunexpressão de Ki-67, neste estudo, ocorreu em proporções elevadas nos tumores osteoblásticos, especialmente nos do tipo pouco produtivos, que mostraram índice de proliferação alto ($10 \leq 30 \%$) ou altíssimo ($>30\%$). Elevada porcentagem de núcleos de células com imunorreatividade também foi verificada no único caso de osteossarcoma telangiectásico e em um tumor tipo células gigantes. O alto índice de proliferação celular no osteossarcoma telangiectásico pode estar relacionado com um mau prognóstico, pois de acordo com HAMMER *et al.* (1995), cães com osteossarcoma telangiectásico apresentam índices de 100% de metástases pulmonares, às quais são detectadas já à primeira consulta.

A maior proporção de células imunomarcadas com o Ki-67 foi observada nas áreas de maior celularidade e de menor quantidade de osteóide dos tumores, característica esta típica do osteossarcoma osteoblástico pouco produtivo e do indiferenciado. Estas observações são consistentes com as de OHTA *et al.*, (2004).

Por outro lado, nos tumores condroblásticos e nos fibroblásticos a imunexpressão do Ki-67 apresentou tendência a índices de proliferação celular menos elevados. Tais observações podem estar relacionadas a um menor grau de agressividade destes tumores e estão em concordância com dados obtidos anteriormente por MISDORP e HART (1979), os quais verificaram que cães com osteossarcomas fibroblásticos apresentaram prognóstico mais favorável do que aqueles com outros subtipos deste tumor. SCOTLANDI *et al.* (1995), relataram menor índice de proliferação celular em osteossarcomas condroblásticos de humanos.

SCOTLANDI *et al.* (1995), ao estudarem o osteossarcoma humano, concluíram que 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.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.* (2001), observaram que alto índice de imunomarcção nuclear pelo Ki-67, superior a 50%, em osteossarcoma humano, estava correlacionado com pobre prognóstico e metástases pulmonares.

O caráter heterogêneo do osteossarcoma dificulta a determinação do índice de proliferação celular pelo Ki-67, uma vez que foram verificadas diferenças na proporção de células tumorais 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 YU *et al.* (1992), que sugerem 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 inúmeras amostras do osteossarcoma, para garantir bons resultados na análise com Ki-67.

Neste estudo os tumores que se mostraram negativos ao Ki-67 podem ter apresentado escassez de células em proliferação ou ainda a antigenicidade das células tumorais pode ter sido comprometida pela descalcificação.

7- CONCLUSÃO

1. Este estudo contribuiu para reforçar que o osteossarcoma canino é um tumor heterogêneo, com padrões histológicos diversificados, constituído por variados tipos celulares, tais como: osteoblastos, condroblastos, células miofibroblásticas e mioblásticas. Estes tipos celulares possivelmente são originados de uma única célula mesenquimal pluripotente ou mesmo de osteoblastos imaturos, que sofrem diferenciação diversificada.
2. O expressivo índice de proliferação celular, detectado em osteossarcomas osteoblásticos pouco produtivos, sugere um comportamento biológico de maior agressividade desse subtipo histológico.
3. A positividade para marcadores de diferenciação muscular não afasta o diagnóstico de osteossarcoma, em lesões ósseas primárias.
4. Considerando-se a heterogeneidade morfológica e imunoistoquímica e a não especificidade para o anticorpo osteocalcina, a evidência de osteóide tumoral constitui, ainda, o parâmetro mais seguro para o diagnóstico de osteossarcoma.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **J Am Vet Med Assoc** 1999; 215:1629-34.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.270.

Barroga EF, Kadosawa T, Okumura M, Fujinaga T. Effects of vitamin D and retinoids on the differentiation and growth in vitro of canine osteosarcoma and its clonal cell lines. **Res Vet Sci** 1999; 66:231-6.

Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, de Lorimier LP, Fan T, Hoffmann W. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. **Vet Pathol** 2005; 42:161-5.

Berg J, Weinstein MJ, Schelling SH, Rand WM. Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb-sparing surgery: 22 cases (1987-1990). **J Am Vet Med Assoc** 1992; 200:2005-8.

Brodey RS, Riser WH. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. **Clin Orthop Relat Res** 1969; 62:54-64.

Cassali GD, Silva P, Rêma A, Gärtner F, Gobbi H, Tafuri WL, Schmitt FC. A new methodology for the improvement of diagnostic immunohistochemistry in canine veterinary pathology: automated system using human monoclonal and polyclonal antibodies. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2001; 53:326-31.

Chano T, Matsumoto K, Ishizawa M, Morimoto S, Hukuda S, Okabw H, Kato H, Fujino S. Analysis of the presence of osteocalcin, S-100 protein, and proliferating cell nuclear antigen in cells of various types of osteosarcomas. **Eur J Histochem** 1996; 40:189-98.

Cavalcanti JN, Amstalden EMI, Guerra JI, Magna LC. Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. **Braz J Vet Res Anim Sci** 2004; 41:299-305.

Cerilli LA, Wick MR. Immunohistology of soft tissue and osseous neoplasms. In: Dabbs DJ. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2nd Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p.65-120.

Cooley DM, Waters DJ. Skeletal neoplasms of small dogs: a retrospective study and literature review. **J Am Anim Hosp Assoc** 1997; 33:11-23.

Coomber BL, Denton J, Sylvestre A, Kruth S. Blood vessel density in canine osteosarcoma. **Can J Vet Res** 1998; 62:199-204.

Dabbs DJ. Immunohistology of metastatic carcinoma of unknown primary. In: Dabbs DJ. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2nd Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p.180-226.

Dahlin DC, Unni KK. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. **Am J Surg Pathol** 1977; 1:61-72.

Daleck CR. Osteossarcoma canino. **Clin Vet** 1996; 1:26-7.

Delisle F, Devauchelle P. Les ostéosarcomes du chien. **Le Point Veterinaire**. 1996; 27: 65-8.

De Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carvalheira JG, Dos Santos MS, Rutteman GR, Gartner MdeF. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. **Anticancer Res** 2006; 26:1821-6.

Endicott M. Principles of treatment for osteosarcoma. **Clin Tech Small Anim Pract** 2003; 18:110-4.

Fanburg-Smith JC, Bratthauer GL, Miettinen M. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in extraskeletal osteosarcoma: a study of 28 cases. **Hum Pathol** 1999; 30:32-8.

Feeney DA, Johnston GR, Grindem CB, Tombs JP, Caywood DD, Hanlon, GF. Malignant neoplasia of canine ribs: clinical, radiographic and pathologic findings. **J Am Vet Med Assoc** 1982; 180:927-933.

Forrest LJ, Dodge RK, Page RL, Herdner GL, McEntee MC, Novotney CA, Throll DE. Relationship between quantitative tumor scintigraphy and time to metastasis in dogs with osteosarcoma. **J Nucl Med** 1992; 33:1542-7.

Garzotto CK, Berg J, Hoffman WE, Rand WM. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. **J Vet Intern Med** 2000; 14:587-92.

Ginel PJ, Novales M, Molleda JM, Perez J, Mozos E. Mandibular fibroblastic osteosarcoma in a three-month-old dog. **Vet Rec** 1996; 139:120-1.

Grundmann E, Roessner A, Immenkamp M. Tumor cell types in osteosarcoma as revealed by electron microscopy. Implications for histogenesis and subclassification. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol** 1981; 36:257-73.

Hammer AS, Weeren FR, Padgett SL, Weisbrode SE. Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. **J Am Anim Hosp Assoc** 1995; 31:321-6.

Hasegawa T, Hirose T, Kudo E, Hizawa K, Usui M, Ishii S. Immunophenotypic heterogeneity in osteosarcomas. **Hum Pathol** 1991; 22:583-90.

Hasegawa T, Hirose T, Seki K, Hisawa K, Ishii S, Wakabayashi J. Histological and immunohistochemical diversities, and proliferative activity and grading in osteosarcomas. **Cancer Detect Prev** 1997; 21:280-7.

Hellmen E, Moller M, Blankesteyn MA, Andersson L, Westermark B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumors and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. **Breast Cancer Res Treat** 2000; 61:197-210.

Hernandez-Rodriguez NA, Correa E, Sotelo R, Contreras-Paredes A, Gomez-Ruiz C, Green L, Mohar A. Ki-67: a proliferative marker that may predict pulmonary metastases and mortality of primary osteosarcoma. **Cancer Detect Prev** 2001; 25:210-5.

Heyman SJ, Diefenderfer DL, Godschmidt MH, Newton CD. Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986-1989). **Vet Surg** 1992; 21:304-10.

- Hoenerhoff MJ, Kiupel M, Rosenstein D, Pool RR. Multipotential osteosarcoma with various mesenchymal differentiations in a young dog. **Vet Pathol** 2004; 41:264-8.
- Hong SH, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N, Kadosawa T, Matsunaga S. Differentiation induction of canine osteosarcoma cell lines by retinoides. **Res Vet Sci** 2000; 68:57-62.
- Katenkamp D, Stiller D, Waldmann G. Ultrastructural cytology of human osteosarcoma cells. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol** 1978; 381:49-61.
- Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. **Vet Pathol** 2002; 39:240-6.
- Knecht CD, Priester WA. Musculoskeletal tumors in dogs. **J Am Vet Med Assoc** 1978; 172:72-4.
- Kobayashi M, Sakai H, Hirata A, Yonemaru K, Yanai T, Watanabe K, Yamazoe K, Kudo T, Masegi T. Expression of myogenic regulating factors, myogenin and MyoD, in two canine botryoid rhabdomyosarcomas. **Vet Pathol** 2004; 41:275-7.
- LaRue SM, WITHROW SJ. Tumors of the skeletal system. In: Withrow SJ, MacEwen EG. **Clinical Veterinary Oncology**. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1989. p.234-245.
- Loukopoulos P, Thornton JR, Robinson WF. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Vet Pathol** 2003; 40:237-48.
- Loukopoulos P, O'Brien T, Ghoddusi M, Mungall BA, Robinson WF. Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Res Vet Sci** 2004; 77:131-41.
- Mayer MN, Grier CK. Palliative radiation therapy for canine osteosarcoma. **Can Vet J** 2006; 47:707-9.
- Mendoza S, Konishi T, Dernell WS, Withrow SJ, Miller CW. Status of the p53, Rb and MDM2 genes in canine osteosarcoma. **Anticancer Res** 1998; 18:4449-53.
- Misdorp W, Hart AA. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. **J Natl Cancer Inst** 1979; 62:537-45.

- Okajima K, Honda I, Kitagawa T. Immunoistochemical distribution of S-100 protein in tumors and tumor-like lesions of bone and cartilage. **Cancer** 1988; 61:792-9.
- Ohta G, Sakai H, Kachi S, Hirata A, Yonemaru K, Kitajima A, Yanai T, Masegi T. Assessment of proliferative potentials of canine osteosarcomas and chondrosarcomas by MIB-1 immunohistochemistry and bromodeoxyuridine incorporation. **J Comp Pathol** 2004; 131:18-27.
- Pacheco A, Rodriguez ICR, Martinez EMA, Flores MM, Garcia JP, Monroy NFM. Osteosarcoma paraosteal (juxtacortical). Revisión de un caso clínico patológico en un perro. **Vet Mex** 1999; 30: 117-120.
- Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. **Int J Cancer** 1993; 53:371-6.
- Patnaik AK, Lieberman PH, Erlandson RA, Macewen, EG, Hurvitz AI. A clinicopathologic and ultrastructural study of undifferentiated malignant tumors of the oral cavity in dogs. **Vet Pathol** 1986; 23:170-5.
- Pool RR. Tumors of bone and cartilage. In: Moulton JE. **Tumors of Domestic Animals**. 3rd Ed. Berkley: Univiversity California Press; 1990. p.157-230.
- Powers BE, Withrow SJ, Thrall DE, Straw RC, LaRue SM, Page RL, Gillette EL. Percent tumor necrosis as a predictor of treatment response in canine osteosarcoma. **Cancer** 1991; 67:126-34.
- Probst CW. Malignant neoplasia of the canine appendicular skeleton. **Compendium of Continuing Education** 1982; 4:260-70.
- Reddick RL, Michelitche HJ, Levine AM, Triche TJ. Osteogenic sarcoma: a study of the ultrastructure. **Cancer** 1980; 45:64-71.
- Ru G, Terracini B, Glickman LT. Host related risk factors for canine osteosarcoma. **Vet J** 1998; 56:31-9.

Ruel Y. Une chienne dogue allemand âgée de sept ans boite depuis un mois. Elle présente un gonflement de l'extrémité distale du radius-ulna gauche. **Le Point Veterinaire** 1997; 28:1675-6.

Sagartz JE, Bodley WL, Gamblin RM, Couto CG, Tierney LA, Capen CC. p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. **Vet Pathol** 1996; 33: 213-21.

Scotlandi K, Serra M, Manara MC, Maurici D, Benini S, Nini G, Campanacci M, Baldini N. Clinical relevance of Ki-67 expression in bone tumors. **Cancer** 1995; 75:806-14.

Seguin B, Besancon MF, McCallan JL, Dewe LL, Tenwolde MC, Wong EK, Kent MS. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). **J Vet Inter Med** 2006; 20:933-40.

Serra M, Morini C, Scotlandi K, Fisher LW, Zini N, Colombo MP, Campanacci M, Maraldi NM, Olivari S, Baldini N. Evaluation of osteonectin as a diagnostic marker of osteogenic bone tumors. **Hum Pathol** 1992; 23:1326-31.

Siqueira VJ, Cavalcanti JN. Osteossarcoma pós-fratura umeral em um cão. **Cães e Gatos** 1993; 42:4-6.

Slyter MV, Boodinger TR, Pool RR, Danmrich K, Misdorp W, Larsen S. Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals. **World Health Organization**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1994. 51 p.

Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, Henderson RA, MacEwen G, Maulden N, McCaw DL, et al. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). **J Am Vet Med Assoc** 1992; 200:995-9.

Straw RC, Withrow SJ, Powers BE. Primary osteosarcoma of the ulna in 12 dogs. **J Am Anim Hosp Assoc** 1991; 27:323-6.

Straw RC, Powers BE, Klausner J, Henderson RA, Morrison WB, McCaw DL, Harvey HJ, Jacobs RM, Berg RJ. Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). **J Am Anim Hosp Assoc** 1996; 32:257-62.

Takada J, Ishii S, Ohta T, Koshiba H, Matsuyama T, Usui M, Yamawaki S, Mori M. Usefulness of a novel monoclonal antibody against human osteocalcin in immunohistochemical diagnosis. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1992; 420:507-11.

Thomas WB, Daniel GB. Mcgavin, M.D. Parosteal osteosarcoma of the cervical vertebra in a dog. **Vet Radiol Ultrasound** 1997; 38:120-3.

Thompson JP, Fugent MJ. Evaluation of survival times after limb amputation, with an without subsequent administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). **J Am Vet Med Assoc** 1992; 200:531-3.

Thompson KG, Pool RR. Tumors of bones. In: Meuten DJ. **Tumors in domestic animals**. 4th Ed. Iowa: Editor Donald J. Meuten; 2002. p.199-317.

Tjalma RA. Canine bone sarcoma: estimation of relative risk as a function of body size. **J Natl Cancer Inst** 1966; 36:1137-50.

Unni KK, Inwards CY, Bridge JA, Kindblom LG, Wold LE. Bone-forming lesions. In: Unni KK, Inwards CY, Bridge JA, Kindblom LG, Wold LE. **Tumors of the bones and Joints – AFIP Atlas of Tumor Pathology**. Washington, DC: American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology; 2005. p.119-92.

Vollmer E, Roessner A, Wuisman P, Harle A, Grundman E. The proliferation behavior of bone tumors investigated with the monoclonal antibody ki-67. **Curr Top Pathol** 1989; 80:91-114.

Wick MR. Immunohistology of melanocytic neoplasms. In: Dabbs DJ. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2nd Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006. p.162-179.

Williams AH, Schwinn CP, Parker JW. The ultrastructure of osteosarcoma. A review of twenty cases. **Cancer** 1976; 3:1293-301.

Yu CC, Woods AL, Levison DA. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. **Histochem J** 1992; 24:121-31.

Zeza Neto L, Germani MH, Grilo MD, Filho UR, Badiz FP. Sarcoma osteogênico em cães. **Unimar Ciências** 1992; 1:57-9.

9- ANEXOS

ANEXO 1- Quadro mostrando a imunexpressão dos anticorpos HHH35, AE1/AE3, Fator VIII, S -100, vimentina, osteocalcina e 1A4, nos diferentes subtipos histológicos, em 64 casos de osteossarcoma canino.

N.o	Classificação	HHF35	AE1/AE3	S-100	VIM	OC	1A4
1	Osteob. produtivo	(+++)	(-)	(+)	(+++)	(-)	(-)
2	Condrolástico	(+)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
3	Indiferenciado	NR	NR	NR	NR	NR	(+++)
4	Condrolástico	(-)	(-)	(++)	(+++)	(++)	(+)
5	Osteob. pouco produtivo	(+++)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(+)
6	Osteob. produtivo	(+++)	(-)	(+)	(+++)	NR	(-)
7	Osteoblástico produtivo	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8	Pouco produtivo	(++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+)
9	Pouco produtivo	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
10	Ost. fibroblástico	(+)	(-)	(++)	(+++)	(+)	(+)
11	Osteob. produtivo	(++)	(-)	(+++)	(+++)	NR	(++)
13	Osteob. produtivo	(+)	(-)	(-)	(+++)	(++)	(+)
15	Osteoblástico produtivo	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	NR	(-)
16	Ost. pouco produtivo	(+++)	(-)	(+)	(+++)	NR	(+++)
17	Osteob. pouco produtivo	(-)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)
18	Osteoblástico produtivo	(+)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)
19	OS tipo células gigantes	(-)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)
21	Osteob. produtivo	(-)	(-)	(+)	(+++)	NR	(-)
22	Condrolástico	NR	NR	NR	NR	(+++)	(+)
23	Osteob. pouco produtivo	(++)	(-)	(++)	NR	NR	NR
24	Telangiectásico	NR	(-)	(++)	(+++)	(++)	(++)
25	Fibroblástico	(++)	(-)	(++)	(+++)	(++)	(+)
26	Fibroblástico	(-)	(-)	(-)	NR	NR	NR
27	Osteob. pouco produtivo	(++)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)
28	Osteob. produtivo	(++)	(-)	(+++)	NR	NR	NR
29	Osteob. pouco produtivo	(+++)	(-)	(++)	NR	NR	NR
30	Osteob. produtivo	(+)	(-)	(++)	(+++)	(++)	(+)
31	Osteoblástico pouco produtivo	(++)	(-)	NR	(+++)	NR	NR
32	Osteoblástico produtivo	NR	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
33	Osteoblástico produtivo	(++)	(-)	(+)	(+++)	(++)	(+)
34	Fibroblástico	NR	(-)	(-)	(+++)	(+)	(-)
35	Fibroblástico	(-)	(-)	(+)	(++)	NR	(-)
36	Osteoblástico produtivo	NR	NR	NR	NR	NR	NR
37	Condrolástico	NR	(-)	(++)	(+++)	(++)	(+)
38	Osteoblástico pouco produtivo	(+)	(-)	(+)	(+++)	(+++)	NR
39	Osteob. pouco produtivo	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++)	(+++)

Continua na próxima página

ANEXO 1 - Quadro mostrando a imunexpressão dos anticorpos HHF35, AE1/AE3, Fator VIII, S -100, vimentina, osteocalcina e 1A4, nos diferentes subtipos histológicos, em 64 casos de osteossarcoma canino (continuação).

N.º	Classificação	HHF35	AE1/AE3	S-100	VIM	OC	1A4
40	Condrolástico	(-)	(-)	(+)	(+ + +)	(+ + +)	(+)
41	Osteob. produtivo	NR	(-)	(+)	(+ + +)	(+ +)	(-)
42	Condrolástico	(-)	(-)	(+ + +)	(+ + +)	NR	(+ +)
43	Tipo células gigantes	NR	(-)	(-)	(+ + +)	(+ + +)	(+ + +)
44	Tipo células gigantes	NR	(-)	(-)	(+ + +)	(-)	(+ +)
45	Osteoblástico produtivo	NR	NR	NR	NR	NR	NR
46	Osteoblástico produtivo	(+)	(-)	NR	(+ + +)	(-)	(+ +)
49	Condrolástico	(+)	(-)	(+)	(+ + +)	NR	(-)
50	Osteob. produtivo	NR	(-)	(-)	(+ + +)	(+ + +)	(+)
51	Osteoblástico pouco produtivo	NR	(-)	(+)	(+ + +)	(+ +)	(+)
52	Condrolástico	(-)	(-)	(+)	(+ + +)	(+ +)	(+)
53	Osteob. pouco produtivo	(-)	(-)	(-)	(+ +)	(+ + +)	(-)
54	Condrolástico	(-)	(-)	(+)	(+ + +)	(+ + +)	(-)
55	Osteob. produtivo	(-)	(-)	(+)	(+ + +)	NR	(-)
56	Fibrolástico	NR	NR	(+)	(+ + +)	(+ +)	(+)
58	Fibrolástico	NR	(-)	(-)	NR	NR	(+ +)
59	Condrolástico	(-)	(-)	(+ + +)	(+ + +)	(+ + +)	(+ + +)
60	Condrolástico	NR	(-)	(+ +)	(+ +)	(+ + +)	(-)
61	Condrolástico	(+ +)	(-)	(+)	(+ + +)	NR	(+ +)
62	Osteob. produtivo	(-)	(-)	(+ + +)	(+ + +)	(+)	(+ +)
63	Fibrolástico	NR	(-)	(-)	(+ + +)	(+)	(+ +)
64	Osteob. pouco produtivo	(-)	(-)	(+ + +)	(+ + +)	(+ + +)	(+ +)
66	Osteob. produtivo	NR	(-)	(+ +)	(+ + +)	(+ + +)	(-)
67	Osteob. produtivo	NR	NR	(+ +)	(+ + +)	(+ +)	(+)
68	Osteob.pouco produtivo	(-)	(-)	(+)	(+ + +)	(+ + +)	(-)
69	Osteob. produtivo	(+)	(-)	(+ +)	(+ + +)	(+ +)	(+)
70	Condrolástico	(+)	(-)	(+)	(+ + +)	(+ + +)	(+)
71	Fibrolástico	(-)	(-)	(+)	(+ + +)	(+ +)	(+)
72	Osteoblástico produtivo	NR	NR	(+ + +)	(+ + +)	(+ + +)	(-)
73	Condrolástico	NR	(-)	(+ +)	(+ + +)	NR	(-)

Legenda: (-) negativo; (+) focal até 30%; (+ +) focal entre 30-50%; (+ + +) difuso - mais de 50%

NR = não realizado ; VIM (vimentina); OC (osteocalcina)

ANEXO 2 - Frequência da imunexpressão de Ki - 67 nos diferentes subtipos histológicos de osteossarcomas caninos (53 casos).

Subtipo histológico	N.o	Ki-67 (MIB-1)
Osteob. produtivos	1	Negativo
	6	Áreas produtivas < 5%; áreas fibroblásticas < 5%
	11	Áreas produtivas 20 %; áreas fibroblásticas 5%
	15	Negativo
	18	áreas osteoblásticas < 5 %
	21	áreas osteoblásticas 50%
	28	Negativo
	30	Áreas produtivas 10 %; áreas fibroblásticas < 5%
	32	Negativo
	33	Áreas osteoblásticas: 40%; áreas fibroblásticas 40%
	36	Áreas osteoblásticas:50%; áreas condroblásticas > 5%
	41	Negativo
	46	Negativo
	51	Negativo
	55	Áreas osteoblásticas 40%; áreas condroblásticas < 10%
	62	Áreas osteoblásticas < 5%; áreas fibroblásticas
66	Negativo	
67	Áreas osteoblásticas 50%	
69	Negativos	
72	Áreas osteoblásticas 30%	
Osteob. pouco produtivos	5	Áreas pouco produtivas 50 %; áreas indiferenciadas 40 %
	16	Áreas indiferenciadas 40%
	17	Áreas pouco produtivas 40%
	27	Negativo
	29	Negativo
	38	Áreas osteoblásticas 30%
	39	Áreas osteoblásticas 30%
	53	Negativo
	64	Áreas osteoblásticas 70%; fibroblásticas 10%
	68	Áreas osteoblásticas: 80%; áreas fibroblásticas l. 15%
9	Áreas pouco produtivas 30%; áreas fibroblásticas 10 %;	

Continua

ANEXO 2- Frequência da imunexpressão de Ki - 67 nos diferentes subtipos histológicos de osteossarcomas caninos (53 casos) (continuação).

Subtipo histológico	N.o	Ki-67 (MIB-1)
Condrolásticos	2	Áreas condrolásticas < 5%
	4	Áreas condrolásticas < 5 %; áreas fibrolásticas < 5%
	22	áreas condrolásticas 30%
	37	Áreas condrolásticas > 5%; áreas osteoblásticas 50%;
	40	Áreas condrolásticas > 5 %; áreas fibrolásticas > 5%
	42	Áreas condrolásticas > 5%;
	49	Negativo
	52	Áreas condrolásticas < 5%; áreas fibrolásticas 30%;
	54	Áreas condrolásticas 20 %; áreas osteoblásticas 30%
	59	Áreas condrolásticas 20%; áreas osteoblásticas 80%; áreas fibrolásticas 20%;
	60	Áreas condrolásticas < 5%
	61	Negativo
	70	Negativo
73	Areas condrolásticas < 5%	
Fibrolásticos	10	Áreas fibrolásticas < 5%
	25	Áreas fibrolásticas < 5%; áreas anaplásticas 10%;
	26	Áreas fibrolásticas 30%
	35	Negativo
	56	Áreas fibrolásticas 30%; áreas condrolásticas 10%;
	58	áreas fibrolásticas 20%
	63	Áreas fibrolásticas 10%
71	Áreas fibrolásticas 20%; áreas osteoblásticas 30%	
Tipo células gigantes	19	Áreas de cél. gigantes 20 %; áreas condrolásticas < 5%; áreas fibrolásticas < 5%
	43	Áreas células gigantes 40%; áreas osteoblásticas 30%
Telangiectásico	24	Áreas telangiectásicas 60%; áreas fibrolásticas 20%