

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ESTRÓGENO, VIMENTINA, TGF $\beta$  E  
MARCADOR DE MACRÓFAGOS EM TUMOR ÓSSEO DE CÉLULAS  
GIGANTES EM GATOS DOMÉSTICOS**

**Ana Cláudia Conte Dune**

**Médica Veterinária**

**JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL**

**Março de 2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ESTRÓGENO, VIMENTINA, TGF $\beta$  E  
MARCADOR DE MACRÓFAGOS EM TUMOR ÓSSEO DE CÉLULAS  
GIGANTES EM GATOS DOMÉSTICOS**

**Ana Cláudia Conte Dune**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirela Tinucci Costa**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).**

**JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL**

**Março de 2008**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ANA CLÁUDIA CONTE DUNE** – nascida em 16 de junho de 1981, em Jaboticabal, São Paulo, é Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal, em 18 de dezembro de 2003. Durante o curso de graduação, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, durante três programas, no período de agosto de 2000 a julho de 2001, sob a orientação da Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati e no período de fevereiro de 2002 a dezembro de 2003, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi. Em fevereiro de 2004 iniciou residência no Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Estadual Paulista/ Jaboticabal na área de Patologia Animal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, o qual concluiu em janeiro de 2006. Em março de 2006 iniciou o curso de mestrado na área de Patologia Animal, na mesma faculdade que realizou o curso de graduação, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, desenvolvendo o projeto que originou a dissertação apresentada à banca no dia 26 de fevereiro de 2008 e aprovada por esta.

“Deus me mostrou verdades muito grandes  
E eu as amei, tomei-as para mim.  
Mas foi no andar diário ano após ano,  
Dor após dor e lutas após lutas,  
Que elas tomaram posse, então, de mim.”

**Lettie Cowman**

“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo.  
Por isso, aprendemos sempre”

**Paulo Freire**

Dedico este trabalho aos meus pais, Cláudio e Ana, ao meu irmão Murilo e ao meu noivo Júnior, pelo amor, compreensão e apoio que sempre me ofereceram em todas as circunstâncias da minha caminhada em busca da realização dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me fortalecer e me tratar como filho em todos os momentos da minha vida.

À Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, pela amizade, confiança, apoio, ensinamentos e por aceitar esta orientação, possibilitando a realização de um grande sonho.

Ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, pela confiança, paciência e ensinamentos transmitidos ao longo da minha vida acadêmica.

À Profa. Dra. Gisele, pela valiosa contribuição na avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

À Profa. Dra. Rosemeire, pelos ensinamentos e importantes considerações feitas para o crescimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, pela simpatia e contribuição na finalização deste trabalho.

Às funcionárias Lia e Francisca do Departamento de Patologia Animal, pelo importante auxílio.

Aos funcionários do Hospital Governador Laudo Natel pela agradável companhia e auxílio.

Aos amigos da pós-graduação: Carolina, Joice, Thiago e Wanderson pelo auxílio durante a realização do mestrado.

Ao amigo e companheiro de trabalho Daniel, pelos ensinamentos e momentos agradáveis proporcionados durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos e do auxílio pesquisa.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da universidade Estadual Paulista - câmpus de Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-Graduação em medicina Veterinária por ter me acolhido.

A todos aqueles que contribuíram com a realização deste estudo.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELA.....</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	ix
<b>RESUMO .....</b>	xi
<b>ABSTRACT.....</b>	xii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	1
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	2
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	3
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	9
4.1 MATERIAL.....	9
4.2 REAÇÃO DE IMUNOISTOQUÍMICA .....	9
4.2.1 ANTICORPOS .....	9
4.2.2 TÉCNICA DA REAÇÃO.....	10
<b>5. RESULTADOS .....</b>	13
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	20
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	24
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	25



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>TABELA 1.</b> Anticorpos empregados nas reações imunoistoquímicas do tumor ósseo de células gigantes de gatos, em cortes parafinados, com as respectivas diluições, clones e procedências.	10
<b>TABELA 2.</b> Critério adotado para classificar os resultados obtidos nas reações imunoistoquímicas. Pontuação atribuída de acordo com a porcentagem de células marcadas por campo.	12

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1.</b> Representação da expressão, em percentual, do anticorpo receptor de estrógeno (RE), anti-TGF $\beta_1$ e o anti-vimentina (ANTI-VIM) nos diferentes tipos de células do tumor ósseo de células gigantes de gatos domésticos, pela reação de imunistoquímica. Método ABC.	14
<b>FIGURA 2.</b> Fotomicrografias do tumor ósseo de células gigantes em humano (A) e em gato doméstico (B). Ambas, evidenciando as células multinucleadas (seta preta), células alongadas do estroma (seta vermelha) e de células mononucleares (seta amarela). Coloração Hematoxilina - Eosina. Aumento 100x em A. e 120x em B.	15
<b>FIGURA 3.</b> Fotomicrografias do tumor ósseo de células gigantes de gatos domésticos expressando receptor de estrógeno (clone-1D5), evidenciando marcação castanho no citoplasma das células gigantes (seta preta) e de células mononucleares (seta amarela). Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração Hematoxilina de Harris. Aumento 120x.	16
<b>FIGURA 4.</b> Fotomicrografias do tumor ósseo de células gigantes de gatos domésticos expressando TGF $\beta_1$ , evidenciando marcação castanho no citoplasma das células gigantes (seta preta) e de células mononucleares (seta amarela). Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração Hematoxilina de Harris. Aumento 120x	17

- FIGURA 5.** Fotomicrografias do tumor ósseo de células gigantes de gatos domésticos expressando vimentina, evidenciando marcação castanho no citoplasma das células gigantes (seta preta), de células mononucleares (seta amarela) e de células alongadas do estroma (seta vermelha). Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração Hematoxilina de Harris. Aumento 120x. 18
- FIGURA 6.** Fotomicrografia do pulmão de gato doméstico, mostrando células reativas ao anticorpo monoclonal marcador de macrófagos (MAC387) em A, e ausência de reatividade do tumor ósseo de células gigantes de gatos domésticos frente ao mesmo anticorpo em B. Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Aumento 120x. 19

## RESUMO

O tumor ósseo de células gigantes apresenta 3 diferentes tipos celulares, sendo duas estromais: fibroblastos neoplásicos e células mononucleares; e o terceiro tipo, células gigantes. Propôs-se que este tumor é de linhagem monócito-macrofágica e acredita-se que as células gigantes se formam por fusão de células mononucleares. Aparentemente os fibroblastos neoplásicos que expressam o fator transformador de crescimento TGF $\beta$ 1 estão envolvidos no recrutamento das células gigantes para o tumor. Com o intuito de compreender melhor a histogênese, o envolvimento do estrógeno e a expressão de receptores TGF $\beta$ 1, foi realizado este estudo em casos deste tumor em gatos domésticos. Para tanto foi utilizado o método imuno-enzimático Streptoavidina-biotina utilizando-se o anticorpo primário anti-vimentina, clone 3B4 (Dako A/s, Denmark); o anticorpo marcador de macrófago, MAC387 (Dako A/s, Denmark); o anticorpo para receptores de estrógeno, clone 15D (Dako A/s, Denmark) e o anticorpo marcador para TGF $\beta$ 1 (Santa Cruz Biotechnology). Os resultados foram analisados pela porcentagem e desvio padrão de células marcadas para cada anticorpo e permitiram concluir que: o TOCG de gatos domésticos, assim como em humanos, tem origem mesenquimal e expressa receptores de estrógeno e de TGF $\beta$ 1 e as células gigantes do tumor não reagem com o clone 387, marcador de células de linhagem mielomonocítica.

**Palavras-chave:** tumor ósseo, célula gigante, receptor de estrógeno, TGF $\beta$ 1, vimentina, macrófago, gato.

## ABSTRACT

Giant cell tumor of bone are composed of 3 different cell types: round mononuclear stromal cells, spindle-shaped mononuclear stromal cells, and giant cells. Some authors assert giant cell could arise by fusion of mononuclear cell mielomonocytic. Apparently neoplastic fibroblast that expression TGF $\beta$  is involved in the recruitment of giant cells from tumor. For better understand of histogenesis, the involved of receptors estrogen and of expression of TGF $\beta$  receptors, achieved this study in this cases tumor in domestics cats. By using the immune-enzymatic Streptoavidin- biotin using the primary antibody anti-vimentin, clone VIM 3B4 (Dako A/s, Denmark); antibody myeloid/histocyte clone MAC 387 (Dako A/s, Denmark); antibody estrogen receptor clone 1D5 (Dako A/s, Denmark) and the antibody TGF $\beta$ 1 (Santa Cruz Biotechnology). The results analyzed for percent and standara deviation of marks cells for each antibody and permissive to come to a conclusion: the GCT of bone in domestic cats, like humans, has mesenchymal origin and has expression of estrogen receptors and of TGF $\beta$ , and giants cells this tumor not react with the clone 387, mark the cells myeloidmonocyte lineage.

**Keywords:** bone tumor, giant cell, estrogen receptor, TGF $\beta$ <sub>1</sub>, vimentin, macrophage, cat.

## 1. INTRODUÇÃO

Tumor é uma neoformação de células indiferenciadas que proliferam descontroladamente e não possuem arranjo estrutural ordenado, formando assim, uma massa anormal de tecido cujo crescimento descoordenado excede o do tecido normal e não realiza nenhuma função útil ao hospedeiro.

A interação tumor-hospedeiro pode determinar a resposta imune contra o tumor. Experimentos com tumores humanos sugerem que as interações entre as células do tumor com as do hospedeiro podem ter efeitos estimulatórios ou inibitórios na imunidade antitumor, em decorrência da composição heterogênea das células infiltradas (linfócitos, monócitos, eosinófilos) e das suas diferentes interações com as células do tumor, com significância prognóstica variável.

O tumor ósseo de células gigantes (TOCG) é uma neoplasia óssea complexa, pois apresenta um padrão biológico agressivo e imprevisível. Em humanos corresponde a 5% de todas as neoplasias ósseas. Na China representa 20% das neoplasias ósseas diagnosticadas.

O TOCG é uma neoplasia primária, rara em animais domésticos, que se localiza principalmente na epífise de ossos longos podendo, em alguns casos, estender-se para os tecidos moles circunvizinhos. Histologicamente é formado por células gigantes, células mononucleares ovóides e um estroma de fibroblastos neoplásicos com fibras de colágeno, da mesma forma que o descrito no tumor humano.

No TOCG em humanos, tal como nos animais domésticos, a histogênese não está definida e os poucos estudos sobre ela dificultam seu entendimento e abordagem terapêutica.

O tumor de células gigantes em gatos domésticos tem sido diagnosticado na rotina do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Na literatura são escassas as informações sobre esta neoplasia em animais domésticos.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar se o TOCG de gatos domésticos tem a mesma histogênese mesenquimal do tumor humano.

Avaliar se as células gigantes multinucleadas poderiam ser células de origem macrofágica.

Avaliar a expressão de receptores de estrógeno e do fator de crescimento transformado ( $TGF\beta_1$ ) no TOCG.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Cânceres são doenças caracterizadas pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma das células transformadas (CHAMMAS, 1999), e o crescimento destas é determinado, em grande parte, pela capacidade proliferativa de invadirem os tecidos do hospedeiro e deslocarem-se para sítios distantes (ABBAS et al., 2004).

O tumor ósseo de células gigantes (TOCG) é assim denominado por conter uma profusão de células gigantes do tipo osteoclástico, dando origem ao sinônimo osteoclastoma (COTRAN, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde e a Classificação histológica internacional dos tumores dos animais domésticos (SLAYTER et al. , 1994) o tumor de células gigantes é bem vascularizado, possui células mononucleares e células multinucleadas. A histogênese e natureza deste tumor são incertas (ZHENG et al., 2001; THOMPSON & POOL, 2002).

O primeiro caso relatado deste tumor foi em 1818, mas somente em 1940 foi formalmente definido como tumor ósseo de células gigantes (REFAI et al., 2008)

O TOCG de humanos pode apresentar coloração marrom-avermelhada ou acinzentada, consistência friável e com áreas de tecido fibroso. Apresenta uma densa população de células arredondadas mononucleares estromáticas e muitas células multinucleadas com núcleos semelhantes aos das células mononucleares. O TOCG ainda é um enigma por se comportar, às vezes, como um tumor benigno verdadeiro e outras como um tumor maligno, já que ora mostra crescimento contido e local e ora apresenta crescimento rápido, expansivo, com fraturas patológicas e sintomatologia, como a dor característica provocada por microfraturas, dificultando a decisão do melhor tratamento, que atualmente é o cirúrgico (SCHWARTZ, 1998).

Aspectos histológicos semelhantes entre as células gigantes multinucleadas e as outras células que compõe o TOCG de humanos e animais foram descritos (FERRERAS et al., 2005).

O TOCG é uma neoplasia rara em animais domésticos (PALMER, 1993; WALSH & RHODES, 1995; THOMPSON & POOL, 2002), e quando diagnosticada costuma ser



encontrada em epífises de ossos longos e tubulares, podendo se estender até os tecidos moles adjacentes (DENIS,1997). Há um relato em arara vermelha, com localização em diáfise e metáfise proximal da escápula (AMANN et al., 2007). Poucos são os casos relatados em gatos, e quando descritos são localizados no fêmur (HOWARD & KENYON, 1967 citado por NEGRIN et al., 2006)), ulna (POPP & SIMPSON, 1976 citado por BENNETT & DUFF, 1983), rádio (CROCKER, 1919 citado por WALSH & RHODES, 1995) e tíbia (MCCLELLAND, 1941 citado por FERRERAS et al., 2005).

A gradação histológica do TOCG, empregada por alguns patologistas humanos, baseia-se principalmente no grau de pleomorfismo e quantidade de figuras de mitose das células mononucleares e células alongadas do estroma, classificando em tumor benigno de grau I, II e III, sendo que o III normalmente comporta-se como um tumor maligno e pode metastatizar. Porém esta classificação ainda não teve significância prognóstica confirmada, nem mesmo na medicina humana (LAUSTEN et al.,1996; LOECHEL et. al, 1998). A variação histológica não pode ser correlacionada com um prognóstico específico (WITHROW & MacEWEN, 1996), diante de uma apresentação maligna ou benigna do tumor (SCHWARTZ, 1998). Provavelmente este comportamento deve-se a propensão deste tumor em provocar recidivas locais agressivas que podem desenvolver metástases pulmonares (CAI et al., 2007). As recidivas locais e as metástases podem estar diretamente associadas com a destruição óssea provocada pelas células gigantes reativas deste tumor segundo ZHENG et al. (1994).

Duas teorias sobre a origem do TOCG têm sido propostas. A primeira descreve este tumor como sendo de origem neoplásica, inflamatória ou traumática (COLEY & BRADLEY, 1949, JAFFE, 1994). Uma segunda teoria propõe que o TOCG origina-se do tecido conjuntivo da medula óssea (GIBBONS et al., 2000).

Outras hipóteses foram relatadas sobre o prognóstico deste tumor. Uma diz tratar-se de um tumor maligno que não se metastiza e, a mais aceita, classifica o TOCG como um tumor verdadeiro, usualmente benigno que pode ter comportamento agressivo (BULLOCK & VERNON, 1957).

Propôs-se que este tumor em humanos tem uma linhagem monócito-macrofágica e acredita-se que as células gigantes se formam por fusão de células mononucleares

(BURMESTER et al., 1983). Porém a histogênese destes tipos celulares ainda é controversa. As células gigantes podem ter origem na fusão de células mononucleares indiferenciadas do estroma, sendo estas possivelmente originárias de células da medula óssea de linhagem histiocitária (ROESSNER et al., 1984; CAI et al., 2007), ou de células precursoras de osteoclastos (LEU et al., 1989), ou de células conjuntivas da medula óssea (SAKAGURI et al., 1992), ou de linhagem monócito-macrofágica (HUANG et al., 1993) ou ainda de células mesenquimais totipotentes (MONTERO et al., 2003).

O cultivo celular, a partir de tecido do TOCG de humano, permitiu identificar células semelhantes a fibroblastos como as células neoplásicas do tumor, sendo as únicas capazes de se proliferar, enquanto os monócitos e as células gigantes seriam células reativas, estimuladas pelo estroma a se infiltrarem no tecido neoplásico (MIRRA, 1989). No entanto, ROSSEAU et al. (2004) comentam que no TOCG de humanos a expressão do anticorpo Ki-67 mostrou que a proliferação celular pode estar restrita às células mononucleares.

Buscando pesquisar citocinas envolvidas na patogênese do TOCG, ZHENG et al. (1994) investigaram o papel do  $TGF\beta$  no TOCG por meio de hibridização "in situ" e do "Northern blotting". Esses pesquisadores detectaram a expressão do  $TGF\beta_1$  nas células gigantes. Os mesmos autores observaram também que as células gigantes que expressavam receptores para o  $TGF\beta$  adquiriam a capacidade de migrar, entretanto o anticorpo anti- $TGF\beta$  inibia essa capacidade. Diante desses resultados os pesquisadores sugeriram que o  $TGF\beta$  participa no recrutamento das células gigantes para o foco tumoral, e atua de forma parácrina e autócrina.

O  $TGF\beta_1$  é um componente da matriz óssea extracelular como descrito por ZHENG et al., (1994). Este fator é secretado por monócitos, pelas células estromáticas da medula óssea é também por osteoblastos (ROBERTS & SPORN, 1990). Este atua atraindo monócitos, fibroblastos e osteoblasto e também estimula a produção de matriz extracelular (LUCAS & CAPLAN, 1988). Assim o  $TGF\beta_1$  pode estar associado com a proliferação, quimiotaxia e diferenciação das células do TOCG (McCUNE et al., 1993).

A proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), o fator estimulante de colônia de série macrofágica (M-CSF) e o fator de diferenciação de osteoclastos (ODF) foram

identificadas no TOCG, podendo por sua vez estarem envolvidas na atração das células gigantes (WUELLING et al., 2002).

Estas e outras citocinas também podem participar do recrutamento das células reativas do TOCG, porém acredita-se que o  $TGF\beta_1$  regula a ação destas, atuando como fator chave da atração de células gigantes e suas células precursoras (ZHENG et al., 1994).

Aparentemente as citocinas expressas no microambiente de tumores são importantes mediadores tanto para a resposta imune do hospedeiro como para a sobrevivência dos tumores (ORTEGEL et al., 2002). O  $TGF-\beta$  é uma importante citocina secretada, freqüentemente, pelas células tumorais, e tem como função inibir a proliferação de células B e T e a atividade citolítica das células NK (WAHL, 1994; KIM et al., 1996; REISS et al., 1999). O  $TGF-\beta$  tem sido identificado em vários tipos de tumores, atuando como um importante inibidor da resposta imune, ocasionando o crescimento do tumor, bem como o escape do mesmo à vigilância imunológica (KIM et al., 1996; REISS, 1999).

O  $TGF\beta_1$ , em neoplasias, afeta a diferenciação e proliferação das células tumorais. Este fator possui efeito sobre a proliferação de células que expressam receptores de estrógeno ( $ER^+$ ). O tratamento de células em cultura com o  $TGF\beta_1$  mostrou atividade antiproliferativa em células  $ER^+$ , redução da ação estimulatória do estradiol (causando redução de 30% na proliferação celular), decréscimo da expressão de receptores de estrógeno em 50% após 24 h de exposição ao  $TGF\beta_1$ , e também redução de 50% da síntese do DNA induzida por estrógeno (CZECZUGA-SEMENIUK, 2004).

Em humanos, o TOCG tem maior incidência em mulheres na terceira ou quarta década de vida, quando ocorrem alterações hormonais fisiológicas da menopausa. Este fato, e a evidente expressão do receptor de estrógeno em osteoclastos derivados do osso normal levaram a proposições da existência de receptores de estrógeno no TOCG (PENSLER et al., 1990). Neste sentido, OLIVEIRA et al. (2002) buscaram a expressão de receptor de estrógeno e progesterona em casos de TOCG humanos e verificaram que as células tumorais exibiam receptores para os dois hormônios. Estudos comparativos aos casos humanos, que pesquisaram a expressão de receptor de estrógeno no TOCG, não mostraram reatividade em gatos (FERRERAS et al., 2005).

O TOCG ainda não teve sua histogênese totalmente determinada. HUANG et al. (1993), empregaram os anticorpos CD13 e CD68 (marcadores de células de linhagem macrófaga) no TOCG e observaram que as células gigantes apresentaram reatividade a ambos, sugerindo serem de linhagem monócito-macrófaga.

Os macrófagos são muitas vezes atraídos para o foco tumoral por citocinas, como o MCP1, por exemplo. Estas células se infiltram no tumor e estão envolvidas na angiogênese tumoral, entre outros processos (KLIMP et al., 2002). Existem alguns anticorpos marcadores de linhagem monócito-macrófaga, um deles é o marcador de macrófago MAC387. Este anticorpo já foi utilizado para identificar macrófagos ativados em tumores malignos, como carcinomas, em que estas células estão presentes em grande número (PALTRINIERI et al., 2004).

Em humanos, pesquisadores empregaram os anticorpos anti-vimentina e anti-citoceratina, obtendo reatividade somente com o anticorpo anti-vimentina, sugerindo então que tratava-se de um tumor de origem mesenquimal (MIN & GILLIES, 1996).

Em animais, poucos são os estudos sobre o TOCG. Os existentes são relatos feitos a partir de estudos imunoistoquímicos e de ultraestrutura. Aqueles que empregam a imunoistoquímica se referem a investigação da origem tumoral pelo uso dos anticorpos anti-vimentina e anti-citoceratina e, da mesma forma que o tumor humano, a origem mesenquimal foi sugerida, pois apresentou reatividade unicamente à vimentina (TRIGO et al., 1983; JÖSTEN, 1995; JÖSTEN & RUDOLPH, 1997; IMAI et al., 1998).

A ultraestrutura mostrou marcada presença de retículo endoplasmático rugoso nas células gigantes do TOCG, sugerindo tratar-se de um tumor com grande atividade secretora (JÖSTEN & RUDOLPH, 1997; IMAI et al., 1998; FERRERAS et al., 2005).

As informações obtidas nas pesquisas realizadas no TOCG em animais são insuficientes para se estabelecer comparações com o tumor humano, já que há poucos casos desta neoplasia descritos em Medicina Veterinária, com exíguas informações e apenas prováveis indicações dos aspectos clínicos e patológicos, dificultando assim o tratamento e o prognóstico para os animais domésticos (THOMPSON & POOL, 2002).

Apesar do TOCG de humanos e de gatos serem histologicamente semelhantes, sua origem, em particular das células gigantes, a da expressão de citocinas e de receptores de estrógeno nos tumores de gatos são pouco conhecidas e controversas.

Conhecimentos adicionais podem contribuir para que futuros estudos com o TOCG de gatos possam servir de base para o mesmo tumor em humanos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

Foram utilizados três espécimes de biopsias de gatos domésticos, sendo provenientes de duas fêmeas e um macho, sem raça definida. Os espécimes foram processados, conforme rotina de processamento histológico, com desidratação em diluições crescentes de álcoois e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica, cortados em micrótomo e corados por hematoxilina-eosina. Esses espécimes assim processados e corados receberam diagnóstico histopatológico de TOCG e estavam arquivados no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

Para este estudo, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo numa espessura de 3 a 4  $\mu\text{m}$ , dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com um fino filme de Poly-L-Lisina (Cód. P4832 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO EUA), diluída a 0,01% para manter o corte aderido à lâmina.

No momento do uso, as lâminas com os cortes foram mantidos em estufa a 60°C por 1 hora e então submetidas a desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcoois e, a seguir, empregadas nas reações de imunistoquímica.

### **4.2 Reação de Imunoistoquímica**

#### **4.2.1. Anticorpos**

Para o estudo do TOCG foram empregados os anticorpos monoclonais anti-imentina, clone 3B4 (Dako S/A, Denmark), para confirmar a origem celular ; um

marcador de macrófagos, MAC387 (Dako S/A, Denmark), para a avaliação da linhagem celular; receptor de estrógeno, clone 15D (Dako S/A, Denmark), para a identificação de células sensíveis ao estrógeno; o anticorpo policlonal de coelho anti-TGF $\beta_1$  (Santa Cruz Biotechnology), para a detecção do TGF $\beta_1$ . Os anticorpos anti-vimentina e MAC387, empregados neste estudo, tiveram suas reatividades avaliadas em tecido de gatos domésticos por PALTRINIERI et al. (2004), o anticorpo receptor de estrógeno por FERRERAS et al. (2005) e o anticorpo anti-TGF $\beta_1$  por FOITZIK et al. (2000).

O método imunoistoquímico utilizado foi o complexo Streptoavidina-biotina (Cod. PK-6100 - VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratórios, Burlingame, CA, EUA), desenvolvido por Hsu et al. (1981). Os anticorpos empregados, com os clones, diluições e procedência estão expostos na tabela 1.

**Tabela 1** - Anticorpos empregados nas reações imunoistoquímicas do tumor ósseo de células gigantes de gatos, em cortes parafinados, com as respectivas diluições, clones e procedências.

<b>Anticorpos</b>	<b>Clones</b>	<b>Diluições</b>	<b>Especificidade</b>
Anti-Vimentin*	Vim 3B4	1/100	camundongo anti-humano
Estrogen Receptor*	1D5	1/30	camundongo anti-humano
Mieloide/Histiocitário*	MAC-387	1/100	camundongo anti-humano
TGF- $\beta$ **	SC-146	1/100	coelho anti-humano

\* DAKO A/S, Denmark

\*\* Santa Cruz Biotechnology

#### 4.2.2. Técnica da Reação

Resumidamente, os cortes foram desparafinizados, reidratados e, então incubados por vinte minutos em uma solução a 0,5% de peróxido de hidrogênio, em metanol absoluto, para o bloqueio da peroxidase endógena. Na seqüência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, em banho-maria por 40 minutos, a 97°C. Nesse processo, os cortes foram imersos em solução diluída de recuperação antigênica

(Retrieve-all Solution 10x concentrate - catálogo nº 1914 - Signet.), de acordo com as recomendações do fabricante. Após esta etapa, os cortes foram lavados por 3 vezes em solução tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M (pH 7,2), por 5 minutos cada e, a seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum-free –catálogo nº X0909 – DAKO Corp.). Ato contínuo, os cortes foram recobertos com o anticorpo primário na diluição ótima (Tabela 1) e, então, incubados a 4°C por 18 horas. Depois foram novamente lavados em PBS, como já descrito, e incubados com o anticorpo secundário biotilado, (Kit USA – Ultra Streptavidin Detection System – EasyPath -Erviagas) por 30 min, à temperatura ambiente. Em seguida, feita nova lavagem com PBS para remoção do excesso de anticorpo, procedendo-se então a incubação com o complexo streptoavidina-biotina, por 30 min (Kit USA – Ultra Streptavidin Detection System – EasyPath - Erviagas), à temperatura ambiente, para detecção do produto da reação. As lâminas foram novamente lavadas e a reação revelada pelo substrato cromogênico DAKO liquid DAB (cat. N.º K3466– DAKO Corp.).

A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem das preparações em água destilada e feita a contracoloração com hematoxilina de Harris (1-2 minutos). As lâminas passaram pela bateria de álcoois e xilóis e foram montadas com bálsamo do Canadá e observadas em microscópio de luz. Para a contagem de células marcadas utilizou-se a lente objetiva com aumento de 40 vezes e um retículo quadriculado acoplado à lente ocular.

Para se quantificar a frequência da imunomarcação foram aleatoriamente selecionados cinco campos por corte e, em cada campo foi contado um total de 100 células, entre as marcadas e não-marcadas. Desses campos foram extraídas porcentagens de células marcadas em relação ao total. Foram extraídas as médias e desvios padrões das porcentagens obtidas para cada tipo celular nos três casos.

As expressões dos anticorpos no TOCG foram avaliadas pelo número de células marcadas (Tabela 2), conforme proposto por DORÉ et al. (2003) e HELLER et al. (2005).

Como controles positivos das reações foram empregados espécimes de pulmão (controle para o anticorpo MAC 387 e anti-TGFβ<sub>1</sub>) e de útero (controle para o anticorpo



receptor de estrógeno e anti-vimentina) de gatos domésticos, submetidos ao mesmo protocolo de conservação e preparo histológico. Como controles negativo foram empregados todos os elementos da reação nos espécimes estudados, exceto o anticorpo primário.

As reações foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP - Campus de Jaboticabal.

**Tabela 2** - Critério adotado\* para classificar os resultados obtidos nas reações imunoistoquímicas, com as pontuações atribuídas de acordo com a porcentagem de células marcadas por campo.

Células marcadas por campo (%)	Pontuação
< 5%	0
5 – 25%	1
26 – 50%	2
51 – 75%	3
> 75%	4

DORÉ et al. (2003) e HELLER et al. (2005).

## 5. RESULTADOS

Da mesma forma que no TOCG humano, histologicamente os três casos apresentaram semelhanças, sendo constituídos por inúmeras células gigantes e células estromáticas, sendo elas as células mononucleares de formato arredondado a ovóide e as células alongadas semelhantes a fibroblastos, apresentando pleomorfismo moderado dos três tipos celulares e raras figuras mitóticas (Figura 2).

Nas reações imunoistoquímicas os tumores estudados apresentaram-se reativos aos anticorpos empregados, exceto ao anticorpo MAC387.

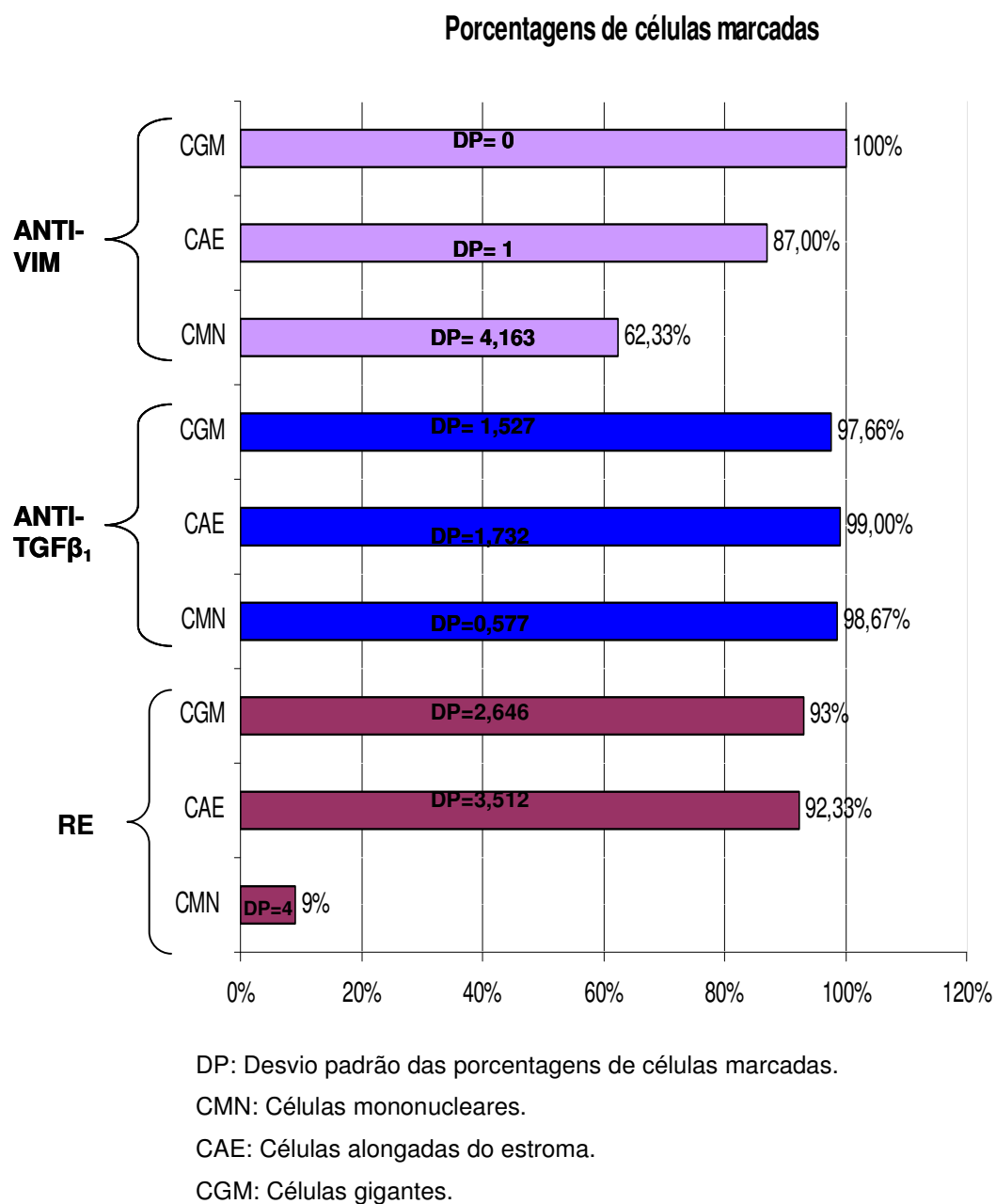
As marcações foram exclusivamente citoplasmáticas para todos os anticorpos, variando a porcentagem dos tipos de células marcadas com cada um dos anticorpos empregados.

Células gigantes, células mononucleares e as células alongadas do estroma dos TOCG se mostraram reativas ao receptor de estrógeno, com diferentes porcentagens de células marcadas. As células mononucleares receberam pontuação 1 para a porcentagem de células marcadas, as células alongadas do estroma e as células gigantes correspondeu a pontuação 4 (Figura 1, Figura 3 A e 3 B).

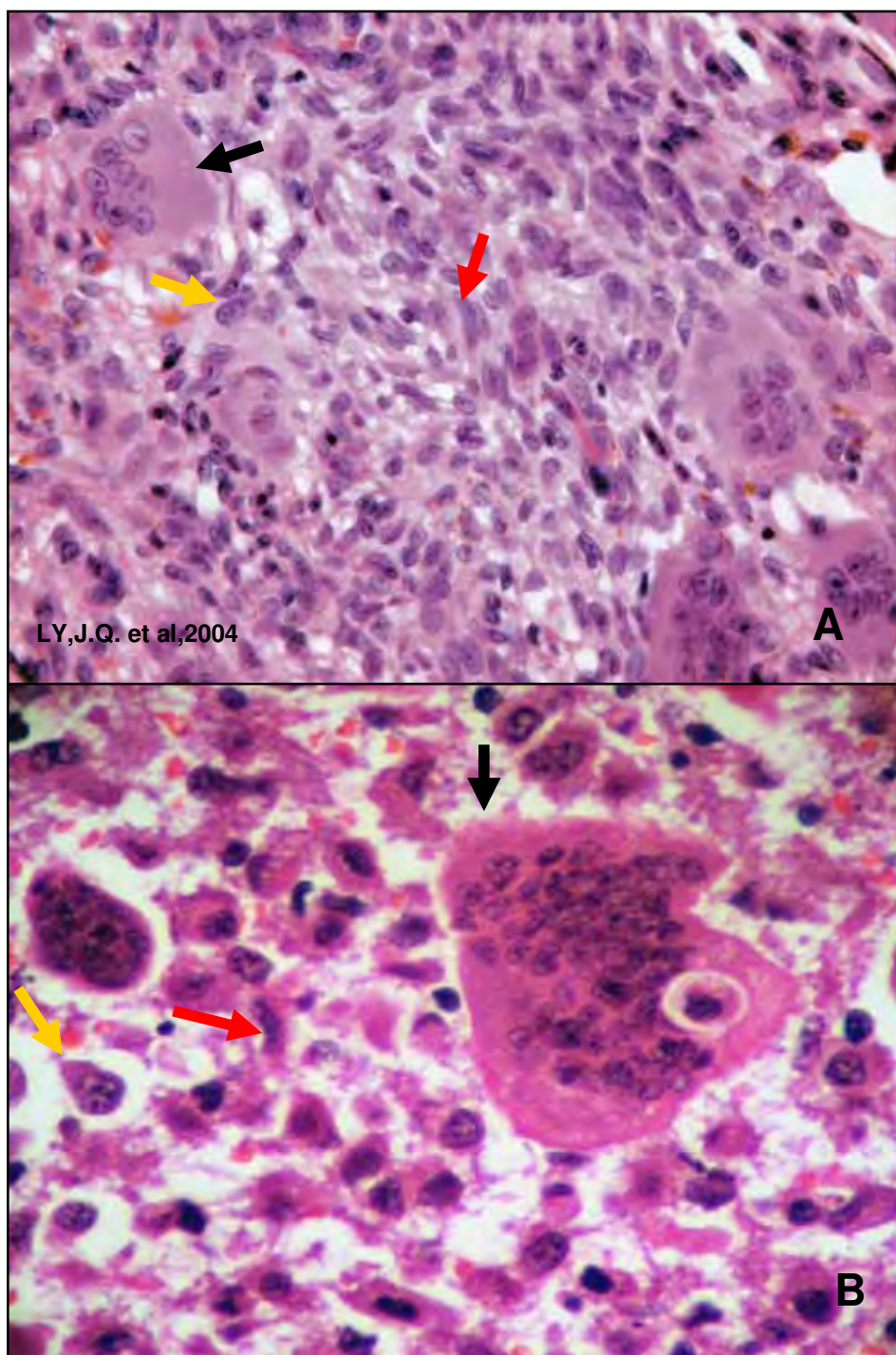
O anticorpo policlonal anti-TGF $\beta_1$  marcou os três tipos celulares estudados. Tanto as células gigantes, quanto as células mononucleares e as células alongadas do estroma apresentaram porcentagem de células marcadas correspondente a pontuação 4 (Figura 1, Figura 4 A e 4 B).

O anticorpo monoclonal anti-vimentina mostrou reatividade com as células gigantes, as células alongadas do estroma e as células mononucleares. Os dois primeiros tipos celulares receberam pontuação 4 e o último pontuação 3, em relação a porcentagem de células marcadas (Figura 1, Figura 5 A e 5 B).

O anticorpo MAC 387 apresentou reatividade somente com os macrófagos pulmonares de gato doméstico (Figura 6 A e 6 B).

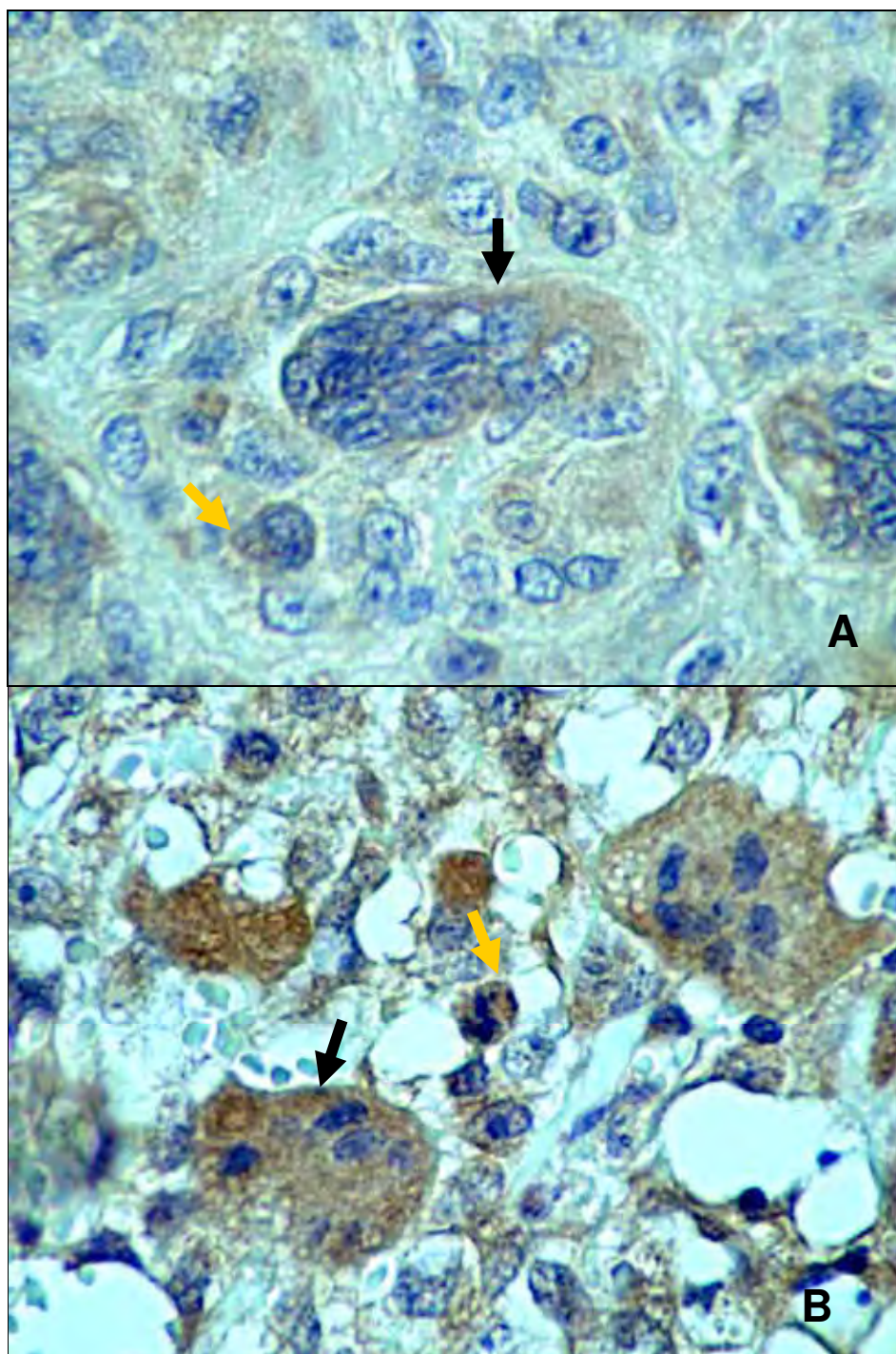


**Figura 1.** Representação da expressão, em percentual, do anticorpo receptor de estrógeno (RE), anti-TGFβ<sub>1</sub> e o anti-vimentina (ANTI-VIM) nos diferentes tipos de células do tumor ósseo de células gigantes de gatos domésticos, pela reação de imunistoquímica. Método ABC.

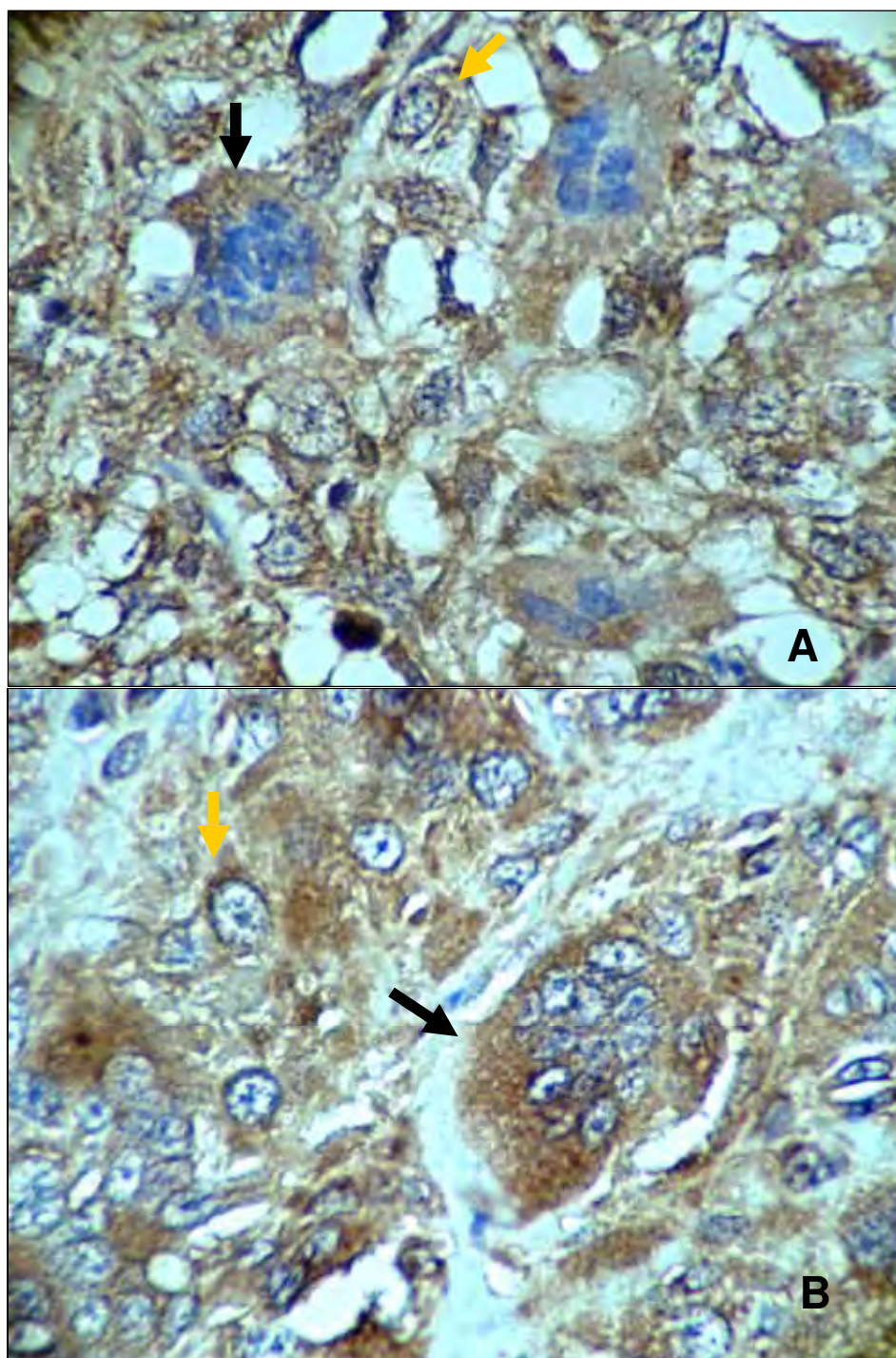


**Figura 2.** Fotomicrografias do tumor ósseo de células gigantes em humano (A) e em gato doméstico (B). Ambas, evidenciando as células multinucleadas (seta preta), células alongadas do estroma (seta vermelha) e de células mononucleares (seta amarela). Coloração Hematoxilina - Eosina. Aumento 100x em A. e 120x em B.



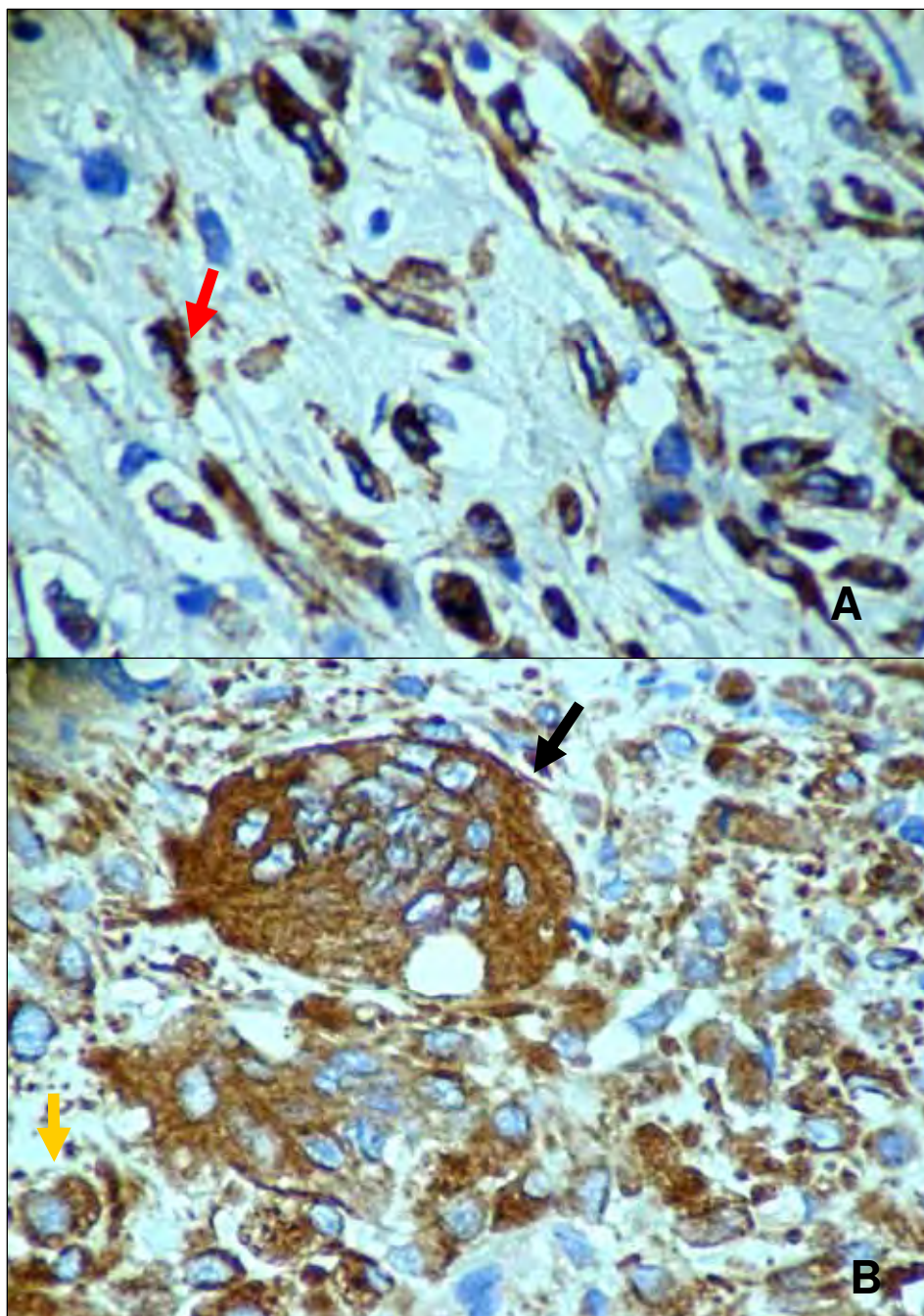


**Figura 3. A-B** Fotomicrografias do TOCG de gatos domésticos expressando receptor de estrógeno (clone-1D5), evidenciando marcação castanha no citoplasma das células gigantes (seta preta) e de células mononucleares (seta amarela). Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração Hematoxilina de Harris. Aumento 120x.

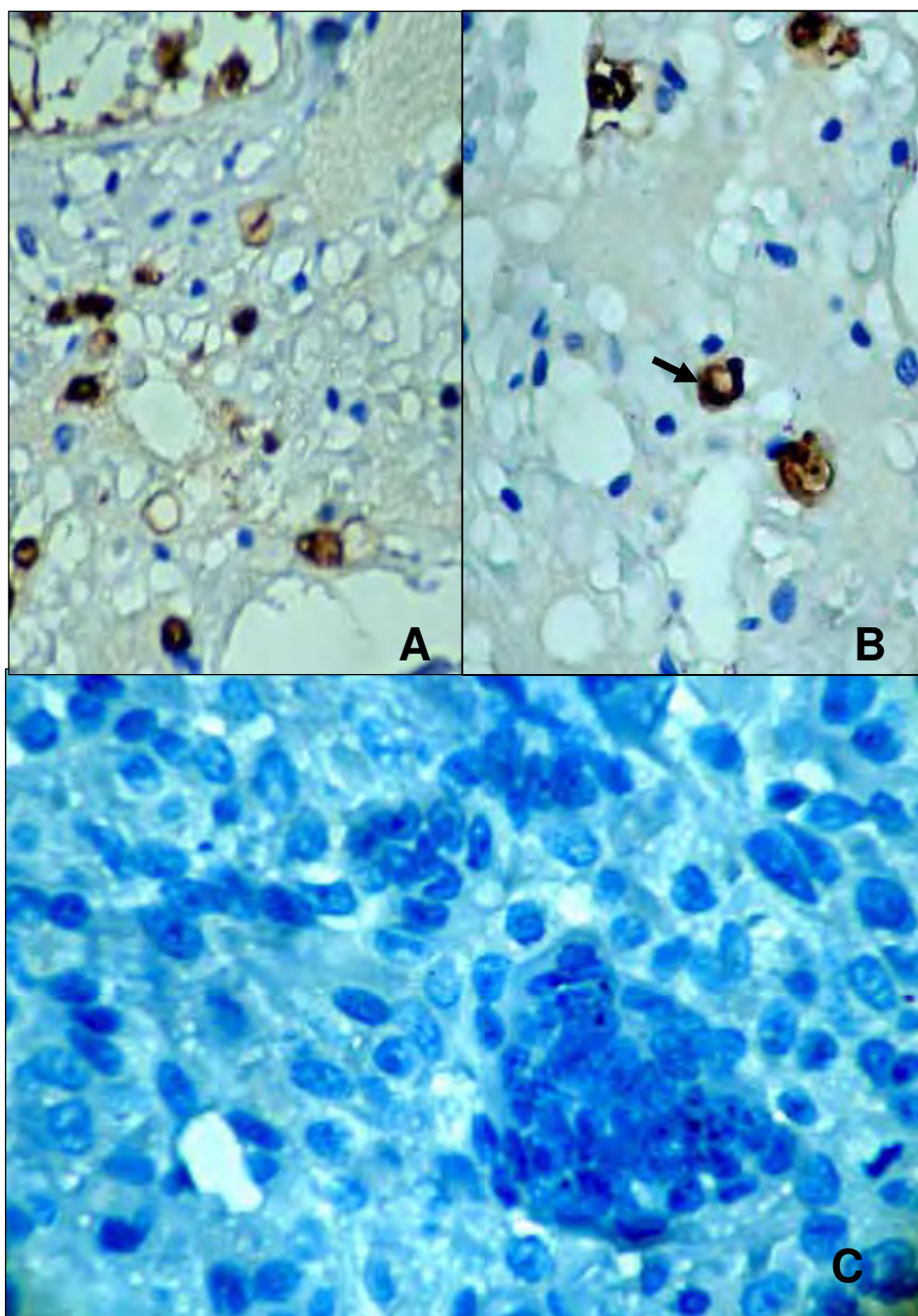


**Figura 4. A-B.** Fotomicrografias do TOCG de gatos domésticos expressando  $TGF\beta_1$ , evidenciando marcação castanha no citoplasma das células gigantes (seta preta) e de células mononucleares (seta amarela). Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração Hematoxilina de Harris. Aumento 120x.





**Figura 5. A-B.** Fotomicrografias do TOCG de gatos expressando vimentina, evidenciando marcação castanha no citoplasma das células gigantes (seta preta), de células mononucleares (seta amarela) e de células alongadas do estroma (seta vermelha). Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração Hematoxilina de Harris. Aumento 120x.



**Figura 6.** Fotomicrografia do pulmão de gato doméstico, mostrando células reativas ao anticorpo monoclonal marcador de macrófagos (MAC387) em A, o mesmo corte evidenciando neutrófilos marcados (seta) em B, e ausência de reatividade do TOCG de gatos domésticos frente ao mesmo anticorpo em C. Imunoistoquímica. Método ABC, contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Aumento 120x.



## 6. DISCUSSÃO

A semelhança histológica entre o TOCG de gatos domésticos e o correspondente tumor humano também foi observada neste estudo, concordando com o relatado por outros autores (FERRERAS et al., 2005; NEGRIN et al., 2006).

Os três tipos celulares, caracterizados como células mononucleares, células estromais semelhantes a fibroblastos e células gigantes, também estavam presentes, em proporções variáveis, nos três espécimes tumorais que compuseram este experimento, concordando com o descrito em outros TOCG de gatos domésticos (THOMPSON & POOL, 2002; FERRERAS et al., 2005; NEGRIN et al., 2006), e o correspondente humano (JAFFE, 1994; SCHWARTZ et al., 1998; CAI et al., 2007; REFAI et al., 2008).

Embora a identificação dos tipos celulares aparentemente seja simples, ainda há controvérsias sobre qual delas é a célula transformada (MIRRA, 1989; WITHROW & MACEWEN, 1996; LOECHEL et al., 1998; ROSSEAU et al., 2004) e, principalmente, qual a histogênese desse tumor (ZHENG et al., 2001; THOMPSON & POOL, 2002; REFAI et al., 2008).

O exame histológico não se mostra suficientemente esclarecedor para este fim. Métodos auxiliares, como a imunoistoquímica têm sido empregados por alguns pesquisadores no TOCG de gatos domésticos (JÖSTEN, 1995; IMAI et al., 1998; FERRERAS et al., 2005; NEGRIN et al., 2006) e humanos (HUANG et al., 1993; MIN & GILLIES, 1996; OLIVERA et al., 2002; GUOPING et al., 2007), buscando a identificação da histogênese tumoral (MIN & GILLIES, 1996; OLIVERA et al., 2002; FERRERAS et al., 2005; NEGRIN et al., 2006) e, também das células gigantes (HUANG et al., 1993; GUOPING et al., 2007), com resultados ainda controversos.

A reatividade do TOCG de gatos domésticos com a vimentina observada neste estudo, foi compartilhado por outros pesquisadores (FERRERAS et al., 2005; NEGRIN et al., 2006) o que sugere fortemente que sua origem seja mesenquimal. Todavia, a determinação da histogênese das células gigantes ainda necessita de um número maior de pesquisas. Neste estudo, as células gigantes se mostraram reativas à vimentina, ao

anticorpo anti-TGF $\beta$  e a receptores de estrógeno, porém foram absolutamente negativas ao marcador de linhagem monócito-macrofágica (MAC-387), discordando dos resultados de HUANG et al. (1993) e GUOPING et al. (2007), que observaram células gigantes do TOCG humano reativas a outros marcadores de macrófagos.

Interessante salientar, que nenhum dos outros tipos celulares reagiu ao MAC 387, embora o mesmo anticorpo tenha reagido com macrófagos de pulmão de gato doméstico empregado como controle positivo para a reação. Isto demonstra que a ausência de reatividade no TOCG de gatos domésticos, não se deve a ausência de reatividade cruzada deste anticorpo com tecidos felinos, já que outros pesquisadores o haviam empregado em tecidos de gatos domésticos anteriormente (DAY et al., 2004; PALTRINIERI et al., 2004;; TAGLINGER et al., 2007).

Analisando os resultados, é possível que a ausência de reatividade das células gigantes do TOCG, neste estudo, se deve a escolha do anticorpo, já que o MAC-387 é um marcador de linhagem mielóide histiocitária. Isto posto, parece ser possível que as células gigantes poderiam ser de linhagem macrofágica contudo, em outros estágios de maturação celular, se os achados de HUANG et al. (1993) e GUOPING et al. (2007) se confirmarem em outras pesquisas. Ressalta-se que o MAC387, de acordo com o fabricante, também mostra-se reativo com neutrófilos, como pode ser observado na figura 6 B (pulmão felino) e, da mesma forma, a não reatividade em 6 C. Estes resultados sugerem que as células gigantes também não teriam origem neutrofílica.

Da mesma forma que as células gigantes, as células alongadas do estroma reagiram com o receptor de estrógeno, como também as células mononucleares, porém apresentaram reatividade menor, neste estudo. Resultado semelhante foi descrito por OLIVERA et al. (2002) em tumores humanos, mas discordantes do reportado por FERRERAS et al. (2005), em gatos domésticos. Quando se comparam os resultados do presente estudo com os de FERRERAS et al. (2005), verifica-se que o método e o anticorpo anti-receptor de estrógeno foram os mesmos, diferindo apenas nas diluições empregadas. Enquanto FERRERAS et al. (2005) empregaram diluição de 1/50, neste trabalho a diluição foi de 1/30, já que diluições maiores não resultaram em marcações de boa qualidade. Outros detalhes da técnica, como tipo e tampão

empregados na recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas não foram descritos e, portanto, não puderam ser comparados.

Tal como referido no TOCG de humanos (FECHNER et al., 1984; PENSLER et al., 1990), é possível que em gatos domésticos esse tumor também seja hormônio-dependente. Contudo, estudos complementares tornam-se necessários para averiguar essa suspeita.

Também, foi evidenciado um número expressivo dos três componentes celulares desse tumor marcados pelo anticorpo anti-TGF $\beta$ <sub>1</sub>, discordando dos resultados de ZHENG et al. (1994) e WHELLING et al. (2002) que detectaram a expressão do TGF $\beta$ <sub>1</sub> apenas nas células gigantes do tumor humano.

O TGF $\beta$  está envolvido com o processo de cicatrização e fibrose, agindo sobre os fibroblastos para que estes se proliferem e migrem formando redes de fibrina (WYNN, 2007). Sendo assim este fator pode estar atuando nos fibroblastos do TOCG contribuindo para a formação e proliferação do estroma, assim como pode estar associado com a proliferação, quimiotaxia e diferenciação das células deste tumor, como proposto por MCCUNE et al. (1993).

Acredita-se ainda que outras citocinas como a MCP-1, o M-CSF e o ODF juntamente com o TGF $\beta$  possam estar envolvidas na atração das células gigantes para o foco tumoral como sugerem WHELLING et al. (2002), porém ainda precisam ser melhor estudadas. Além disso, o TGF $\beta$  tem sido relacionado a inibição da imunidade e favorecimento do crescimento de tumores, bem como o escape destes a vigilância imunológica (KIM et al., 1996; REISS et al., 1999). Este favorecimento do crescimento tumoral e também o fato de marcadas expressões do TGF $\beta$  em alguns tumores humanos se correlacionarem com a malignidade do tumor, podem sugerir que o TGF $\beta$  seja um marcador de prognóstico, e expressões acentuadas deste fator, como ocorreu com os três tipos celulares do TOCG de gatos, neste estudo, poderiam indicar um prognóstico ruim e sugerir um comportamento maligno para os casos estudados.

O comportamento inconstante deste tumor também pode estar associado à ação conjunta do TGF $\beta$  e do estrógeno, já que também foi demonstrado que o TGF $\beta$  exerce efeito antiproliferativo em células ER<sup>+</sup> "in vitro" (CZECZUGA-SEMENIUK, 2004). O TGF $\beta$ <sub>1</sub> e o estrógeno poderiam atuar antagonicamente no controle da proliferação do

tumor, porém estudos complementares, com tumores com diferentes comportamentos, mais benignos e outros mais malignos, poderiam contribuir com informações mais seguras sobre esta hipótese.

Frente aos resultados encontrados sugere-se que o TOCG de gatos domésticos pode ser um modelo experimental para o tumor humano.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados deste experimento, nas condições metodológicas empregadas permitiram concluir que:

- O TOCG de gatos domésticos, assim como em humanos, tem origem mesenquimal e expressa receptores de estrógeno e de TGF $\beta$ <sub>1</sub>.
- As células gigantes do tumor não reagem com o clone 387, marcador de células de linhagem mielomonocítica.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup>

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. . **Imunologia Celular e Molecular** 6 ed. Rio de Janeiro: Revinter., 2004, p. 540-562.

AMANN, O.; MEIJ, B.P.; WESTERHOF, I.; KIK, M.; LUMEIJ, J. T.; SCHOEMAKER, N.J. Giant cell tumor of the bone in a scarlet macaw (*Ara macao*) **Avian Disease**, V. 51, n. 1, p. 146-149, 2007.

BENNETT, D.; DUFF, R. S. I. Giant cell tumor of the ulna in a cat **Journal Small Animal Practice**, v. 24, p. 341-345, 1983.

BULLOCK, W. K.; VERNON, J. V. L. Giant cell tumor-like lesions of bone **Pathology and Bacteriology**, v. 87, n.1, p. 32-36, 1957.

BURMESTER, G.R.; WINCHESTER, R.J., DIMITRIU-BONA, A. Delineation of four cell types comprising the giant cell tumor of bone. Expression of Ia and monocyte-macrophage lineage antigens **Journal of Clinical Investigation**, v. 71, p. 1633-1648, 1983.

CAI, G.; RAMDALL, R.; GARCIA, R.; LEVINE, P. Pulmonary metastasis of giant cell tumor of the bone diagnosed by fine-needle aspiration biopsy **Diagnostic Cytopathology**, v. 35, n.6, p. 358-362, 2007.

CHAMMAS, R. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. **Cancer Research.**, v. 59, p. 1337-1346, 1999.

COLEY B.; BRADLEY, L. **Neoplasm of bone** 2.ed. New York: Paul Hoeber, 1949, p. 113-116.

<sup>1</sup> ABNT - Normas de Referências, agosto 2003

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1090-1118.

CROCKER, W. Osteoclastoma in cat foreleg **Cornell Veterinary**, v. 9, p.141-142, 1919.

CZECZUGA-SEMENIUK, E.; ANCHIM, T.; DZIECIOL, J.; DABROWSKA, M.; WOLCZYNSKI, S. Can transforming growth factor- $\beta_1$  and retinoids modify the activity of estradiol and antiestrogens in MCF-7 breast cancer cells? **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, p.733-745, 2004.

DENIS, J. S. Bone tumors: general characteristics, benign lesions. In:\_\_. **A textbook of Medical Imaging**. 3 .ed. London: Churchill Livingstone,1997, p. 1646-1649.

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

FECHNER , R. E.; SLAUGHTER, F. H.; POPE, T. H. Extraordinary growth of giant cell reparative granulomas during pregnancy **Archives Otolaryngology**, v. 110, p. 116-119, 1984.

FERRERAS M.C.; FUERTES, M.; PEREZ, V.; BENAVIDES, J.; GARCIA-PARIENTE, C.; REYES, L.E.; GARCIA-MARIN, J.F.; Giant cell tumour of bone in a cat with extraskeletal metastasis: pathological and immunoistochemical study **Journal of Veterinary Medicine A** , v. 52, p. 225-229, 2005

FOITZIK, K.; LINDNER, G.; MUELLER-ROEVER, S.; MAURER, M.; BOTCHKAREVA, N.; BOTCHKAREV, V.; HANDJISKI, B.; METZ, M.; HIBINO, T.; SOMA, T.; G. PAOLO-DOTTO, G.; PAUS, R. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF- $\beta_1$  in vivo. **The FASEB Journal**, v.14, p.752-760,2000.

GIBBONS, K.; SINGH, A.; KURIAKOSE, M. A.; LOREE, T. R.; HARRIS, K.; RUBENFELD, A. B. S.; HICKS, W. L. Giant cell tumor of the infratemporal fossa **Skull Base Surgery**, v. 10, n. 3, p. 155-157, 2000.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; SHOFER, F. S.; SMITH, A.; SORENMØ, K. U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology** v.42, n.6, p.776-780, 2005

HOWARD, E. B., KENYON, A. J. Malignant osteoclastoma (giant cell tumor) in the cat with associated mast-cell response **Cornell Veterinary**, v. 57, p. 399-409, 1967.

HUANG, T. S.; GREEN, A. D.; BEATTIE, C. W.; DAS GUPTA, T. K. Monocyte-macrophage lineage of giant cell tumor of bone. Establishment of a multinucleated cell line **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1751-1760, 1993.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H.A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v.75, p.734-738, 1981

IMAI, T., HIBINO, N.; HAYAKAWA, K.; NAKANOWATARI, J.; FUKUTA, T.; HOSOKAWA, S.; SAGAMI, F. Giant cell tumor of bone in an aged Fischer 344 rat **Toxicology Pathology**, v. 26, p.802-805, 1998.

JAFFE, H. L. Giant cell tumor of bone: Problems of differential diagnosis **Bull Hospital Journal of Disease**, v. 5, p. 84-91, 1994.

JÖNSTEN, M.; RUDOLPH, R. Methods for the differentiation of giant cells in canine and feline neoplasia in paraffin sections **Journal of Medicine Veterinary A**, v.44, p. 159-166, 1997.



KIM, I. Y. et al. Genetic change in transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF- $\beta$ 1 in human prostate cancer cells. **Cancer Research.**, v. 56, n. 44, 1996.

KLIMP, A. H., VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer **Clinical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 143-161, 2002.

LAUSTEN, G.S.; JESEN, P.K.; SCHIODT, T.; LUND, B.; Local recurrences in a giant cell tumor of bone. Long-term follow up of 31 cases. **International Orthopedic**, v.41, p. 172-176, 1996.

LEU, T. C.; WANG, L. T. Giant cell tumours of bone: an immunohistochemical study **Pathology Res Practice**, v. 185, p. 448-453, 1989.

LOECHEL, F.; GILPIN, B.J.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M.; Human ADAM 12 is an active metalloprotease. **Journal of Biological Chemical**, v. 273, p.1693-1697, 1998

LUCAS, P. A.; CAPLAN, A. Chemotactic response of embryonic limb bud mesenchymal cells and muscle-derived fibroblast to transforming growth factor- $\beta$  **Connect Tissue Research**, v. 18, p. 1-7, 1988.

LY, J.Q.; BEALL, D. P. Giant-cell tumor of tendon sheath **Applied Radiology Online**, v. 32, n. 10, p. 320-324, 2003

MCCLELLAND, R. B. A giant-cell tumor of the tibia in a cat **Cornell Veterinary**, v. 31, p. 86-87, 1941.

MACCUNE, B. K.; PATTERSON, K.; CHANDRA, R. S.; KAPUR, S.; SPORN, M. B.; TSOKOS, M. Expression of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in small round cell tumors of childhood **American Journal of Pathology**, v. 142, p. 49-58, 1993.

MELANI, C.; PUPA, S.M.; STOPPACCIARO, A.; et al. An *in vivo* model to compare human leucocyte infiltration in carcinoma xenografts producing different chemokines. **International Journal of Cancer**., v.62, p.572-78, 1995.

MIN, K. W.; GILLIES, E. Multinucleated giant stromal tumor of the omentum: report of a case with immunohistochemical and ultrastructural investigation **Ultrastruct Pathology**, v. 20, n. 1, p. 89-99, 1996.

MIRRA, J.; Bone tumors. Clinical, radiological and pathological correlations. In:\_\_. **Bone Tumors**. 1.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989, p. 1587-1753.

MONTERO, O.; SALLE, M. T.; GUEVARA, R.; OLIVERA, P.; MALDONADO, V.; MELENDEZ-ZAJGLA, J. Gytogenetic analysis of the mononuclear cell component of giant cell tumors of bone **Cancer Genetyc Cytogenetyc**, v. 146, p. 170-172, 2003.

NEGRIN, A., BERNARDINI, A.; DIANA, A.; CASTAGNARO, M. Giant cell osteosarcoma in the calvarium of a cat **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 179-182, 2006.

OLIVEIRA, P.; PÉREZ, E.; ORTEGA, A.; TERUAL, R.; GOMES, C.; MORENO, L.F.; DUENAS, A.; DE LA GARZA, J.; MELÉNDEZ-ZAJGLA, J.; MALDONADO, V.; Estrogen receptor expression in giant cells tumors of the bone. **Human Pathology**, v. 33, p. 165-169, 2002.

ORTEGEL, J. W. et al. Modulation os tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**., v. 36, p. 17, 2002.

PALMER, N.; BONES AND JOINTS IN: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.; **Pathology of Domestic Animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993, p. 1170-1181.

PALTRINIERI, S.; RICCABONI, P.; RONDENA, M.; GIUDICE, C.; Pathologic and imunohistochemical findings in a feline aortic boby tumor. **Veterinary Pathology**, v. 41, p.195-198, 2004.

PENSLER, J.M.; RADOSEVICH, J.A.; HIGBEE, R. Osteoclasts isolated from membranous bone in children exhibit nuclear estrogen and progesterone receptors **Journal of Bone Miner Research**, v. 5, p. 797-802,1990.

POPP, J.A.; SIMPSON, C.F.; Feline malignant giant cell tumor of bone associated with C-type virus particles. **Cornell Veterinary**, v. 66, p. 528-532, 1976

REFAI, D.; DUNN, G. P.; SANTIAGO, P. Giant cell tumor of thoracic spine: case report and review of the literature **Surgical Neurology**, 2008.

REISS, M. TGF- $\beta$  and cancer. **Microbes Infection.**, v. 1, p. 1326-1327, 1999.

ROESSNER, A.; BOSSEWITZ,D. B. V.; SCHLAKE, W.; THOMESTEN, G.; GRUNDMANN, E. Biologic characterization of human bone tumours-III. Giant cell tumour of bone: a combined electron microscopical, histochemical and autoradiographical study **Pathology Research Practice**, v. 178, p. 431-440, 1984.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. The transforming growth factor- $\beta$ s in peptide growth factors and their receptors, **Journal of Biology Chemisty**, v. 1, p. 419-423, 1990.

ROSSEAU, M.A.; HANDRA-LUCA, A.; LAZENNEC, J.Y.; Metachronous multicentric giant-cell tumor of bone in the lower limb. Case report and Ki-67 immunohistochemistry study. **Journal of Pancreas (on line)**, v. 5, n. 4, p. 220-224, 2004.

SAKAGURI, Y.; KOMIYA, S.; SUZUKI, K.; INOUE, A.; MORIMATSU, M.; NAGAGASE, H. Production of matrix metalloproteinase 2 and 3 (stromelysin) by stromal cells of giant cell tumor of bone **American Journal of Pathology**, v. 141, p. 611-621, 1992

SCHWARTZ, H.S. Update on giant cell tumor of bone. **Comprehensive Therapy**, v. 24, p. 488-493, 1998.

SLAYTER, M.V.; BOOSINGER, T.R.; POOL, R.R.; DÄMMICH, K.; MISDORP, W.; LARSEN, S.; Giant cell tumor of bone. In: Slayter, M.V.; Boosinger, T.R.; Pool, R.R.; Dämmich, K.; Misdorp, W.; Larsen, S.; Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals . **Armed Forces Institute of Pathology**, p.12, 1994

TAYLOR, C.R.; COTE, R.J. **Immunofluorescence: A diagnostic tool for the surgical pathologist**. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994, 533p

THOMPSON, K.G.; POOL, R.R.; Tumors of bone In: \_\_. **Tumors in Domestic Animals**. 4.ed. Ames: Iowa State Press, 2002, p 245-317.

TRIGO, F.J.; LEATHERS, C.W.; BROBST, D.F.; A comparison of canine giant cell tumor and giant cell reparative granuloma of bone. **Veterinary Pathology**, v.20, p. 215-220, 1983

WAHL, S. M. Transforming growth factor $\beta$ : the good, the bad, and the ugly. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1587, 1994.

WALSH, B.A.; RHODES, W.H.; Giant cell tumour of bone in a cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, n. 7, p. 325-329, 1995

WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology** 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996, p. 287-315.

WUELLING, M.; ENGELS, C.; JESSE, N.; WERNER, M.; KAISER, E.; DELLING, G. Aktuelles zur Histogenese des Riesenzelltumors, **Der Pathologe**, v. 23, n. 5, p. 332-339, 2002

ZHENG, M.H.; FAN, Y.; WYSOCKI, S.J.; LAU, A.T.T.; ROBERTSON, T. BEILHARZ, M.; WOOD, J.D.; PAPADIMITRIOU, J.M. Gene expression of transforming growth factor- $\beta_1$  and its type II receptor in giant cell tumors of bone **American Journal of Pathology**, v.145, p. 1095-1104, 1994.

ZHENG, M.H.; ROBBINS, P.; XU, J.; HUANG, L.; WOOD, D.J.; PAPADIMITROU, J.M.; The histogenesis of giant cell tumor of bone: a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. **Histology Histopathology**, v. 16, p. 297-307, 2001