

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO PARA O DIAGNÓSTICO
DE OSTEOSARCOMA EM CÃES**

STEPHANE CÁSSIA OLIVEIRA ROSA VEXENAT

**BOTUCATU - SP
DEZEMBRO – 2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO PARA O DIAGNÓSTICO
DE OSTEOSSARCOMA EM CÃES**

STEPHANE CÁSSIA OLIVEIRA ROSA VEXENAT

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista Júlio
de Mesquita Filho, Campus Botucatu,
para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof. Dra Noeme Sousa Rocha

Co-Orientador: Prof. Dr Alexandre Hataka

BOTUCATU - SP
DEZEMBRO - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vexenat, Stephane Cássia Oliveira Rosa.

Sensibilidade da citoinclusão para o diagnóstico de osteossarcoma em cães / Stephane Cássia Oliveira Rosa Vexenat. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Alexandre Hataka

Capes: 50501062

1. Osteossarcoma. 2. Citopatologia. 3. Histopatologia. 4. Imunohistoquímica. 5. Cão - Doenças. 6. Tumores em animais.

Palavras-chave: Citoinclusão; Citopatologia; Histopatologia; Imunoistoquímica; Osteossarcoma.

Autora: Stephane Cássia de Oliveira Rosa Vexenat

**Título: SENSIBILIDADE DA CITOINCLUSÃO PARA O DIAGNÓSTICO
DE OSTEOSSARCOMA EM CÃES**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Campus Botucatu

Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Campus Botucatu

Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Campus Botucatu

Profa. Dra. Ana Paula Batista Masseno
Membro
Doutora em Patologia Animal
FAEF – Garça – SP

Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio
Membro
Professora em Faculdades Integradas de Ourinhos
FIO – Ourinhos - SP

Data da defesa: 12/12/2016

Ao único e verdadeiro Deus, Jesus Cristo, por estar sempre ao meu lado,
suprindo todas minhas necessidades!

À minha filha Luna e ao meu marido João Marcos por fazer parte da minha vida,
pelo amor, incentivo, paciência e cumplicidade...

Ao meu pai e minha mãe, minha guerreira! Pelo incentivo e por acreditar no meu
sonho. Te amo, Mãe!

À minha família, amor verdadeiro, por todo apoio que deram na minha vida e
carreira acadêmica...

Aos meus avós: Aureliano Duberli e Juana (in memorian), parte da minha
vida...

Ao meu filho, Billy Totó (in memorian) amor eterno!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS, único e verdadeiro! Obrigada, Jesus Cristo, por tudo! Tu és fiel!

À Universidade Estadual Paulista (FMVZ Unesp-Botucatu) à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Veterinária.

Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa Rocha pela orientação neste doutoramento. Pelos ensinamentos, paciência, carisma e sua grande sabedoria em todos os momentos, permitindo meu crescimento profissional e, pela amizade e respeito mútuo.

Ao Prof. Dr. Alexandre Hataka pela parceria, amizade, auxílio no delineamento experimental e nas avaliações histopatológicas e citológicas onde pude adquirir novos conhecimentos. Também pelos incentivos nos momentos de dificuldades, pela competência e experiência compartilhada, e claro, pela coorientação.

Ao professor Júlio Lopes Sequeira (FMVZ Unesp-Botucatu), pelo empenho sempre querer ajudar, respeito, conselhos, parceria, sugestões e amizade!

A todos os professores, funcionários, residentes e colegas de pós graduação do departamento de Clínica Veterinária (Setor de Patologia), pela ajuda quando solicitada e por tornar o dia a dia mais agradável.

Aos proprietários dos animais que permitiram o uso do material dos seus cães envolvidos no estudo e a todos que direta ou indiretamente proporcionaram a realização desta investigação, o meu sincero agradecimento.

Aos pós-graduandos Carlos Eduardo F. Alves, Priscila, Diogo Zannoni que colaboraram muito com o meu experimento e dissertação.

A todos os meus amigos da familinha que formei aqui durante estes anos! Em especial: Gabriel Monteiro, Yamê Fabres, Isabelle, Loreta, Bianca, Fê, Gi, Milena, Nina, Jair e Carlos Eduardo!

Aos Botucatuenses e moradores de Botucatu que também fizeram parte da minha familinha durante essa temporada: Bruno Perchon, Acqua, Luizão, Rep. BGD, Rosinha, Marcela, Mirelle, João, Gláucia, Seu Victor (Horta Comunitária)! A saudade será eterna!!!

Às minhas amigas maravilhosas que amo tanto! Maria Izabel Cruxen e Simone Akonteh pela amizade, carinho, e parceria durante esses mais de 10 anos de cumplicidade!

À minha família toda! Minhas irmãs Alessandra, Isabella, Andréa e Carina. Meus sobrinhos mais lindos do mundo: Daniel Alexandre, Gabriel Vexenat, Maria Clara, Daví,

Alexia, Laura e Clarinha. Agradeço também a todos os meus tios, primos, sogros (as), cunhados (as), e amigos que me deram apoio durante todo este momento. Em especial minha prima Lydia Cecy, minhas tias Liliana e Júnia por ter me dado todo este apoio durante o parto prematuro da minha pequena Luna!

À minha tia Elizabeth por ter contribuído em minha faculdade de Medicina Veterinária.

Ao meu companheiro, marido: João Marcos, parceria, carinho e amor incondicional, quase 10 anos dedicados a nós.

À minha filha Luna Teixeira R. Vexenat! Que durante meu doutorado, surgiu na minha vida como um relâmpago e ilumina a minha vida como o Sol e a Lua! Todo este empenho dedico à você, e este amor que nos cerca, cresce e crescerá cada dia mais!

Ao meu filho: Billy Totó (In memorian), meus queridinhos filhinhos caninos Pit Nelson, Lila Marcelina e Kayinha...

Aos meus pais, Julio Alejandro e Ana de Cássia, pela minha vida e pelo exemplo de vida, dignidade, honestidade, amor, superação e força, principalmente nas horas que eu mais precisei.

Em especial minha mãe, Ana de Cássia! Que é minha base, espelho, minha fortaleza, motivo de orgulho, perseverança, dedicação que tanto fez e faz por mim e, a todas minhas irmãs e netos, com sua insistência em proporcionar sempre ensino, educação e de vencer desafios! Como eu te amo minha mamãe!

Palavras não conseguiriam expressar todo o meu amor e agradecimento, mas mesmo assim, tenho que dizer que devo a vocês tudo o que eu sou. Amo muito vocês!

**“Tu criaste o íntimo do meu ser
e me teceste no ventre de minha mãe. Eu te louvo porque me fizeste
de modo especial e admirável.
Tuas obras são maravilhosas!**

**Digo isso com convicção. Meus ossos não estavam escondidos de ti
Quando em secreto fui formado e entretecido como nas profundezas da terra. Os
teus olhos viram o meu embrião;
todos os dias determinados para mim
foram escritos no teu livro
antes de qualquer deles existir”.**

Salmos 139:13-16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação Tumoral de OSA.....	10
Tabela 2: Relação de idade, raça, sexo e localização de lesões em cães submetidos à Citologia Aspirativa por agulha fina, Cell Block (Citoinclusão) e Histopatologia no setor de Patologia do HV Unesp - Botucatu.	33
Tabela 3: Relação da classificação neoplásica do OSA em cães, comparativo entre citologia aspirativa, citoinclusão e histologia.	34
Tabela 4: Tabela de contingência comparando os resultados citológicos por esfregaço com os histopatológicos a partir de formações ósseas, evidenciando-se o número de verdadeiros positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiros negativos.....	38
Tabela 5: Tabela de contingência comparando os resultados citológicos por citoinclusão com os histopatológicos a partir de formações ósseas evidenciando-se o número de verdadeiros positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiros negativos.....	38
Tabela 6: Tabela de contingência comparando os resultados citológicos por esfregaço + citoinclusão com os exames histopatológicos a partir de formações ósseas, evidenciando-se o número de verdadeiros positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiros negativos.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A: OSA em região de úmero esquerdo em cão aumento de volume e deformidade no local.	5
Figura 2: Citoaspirador de Valleri, conectado à seringa de 10 mL e agulha 30x8.....	27
Figura 3: Contenção e aspiração com o auxílio do citoaspirador de nódulo aderido em mandíbula de cão.	28
Figura 4: A: Punção aspirativa de neoplasia em região distal de úmero direito. B: Seringa com conteúdo neoplásico após a aspiração e fixação do material.	29
Figura 5: A: Seringa contendo material aspirado de OSA, B: Material obtido pela PAAF, retirado da seringa, após a fixação em álcool 95% e formalina tamponada. Nota-se importante o uso de uma pequena esponja para evitar a perda de material.	29
Figura 6: Cadela Pit Bull. OSA em região escapulo-umeral	34
Figura 7: Imagens mostrando os resultados dos exames citopatológicos, citoinclusão, histopatológicos e imunohistoquímica de casos de OSA canino. A citopatologia (A) apresenta células mesenquimais malignas com características morfológicas de osteoblastos neoplásicos, matriz óssea adjacente, células multinucleadas, ranhuras na cromatina e micronúcleo. – Giemsa, obj. 400X. B e C - OSA osteoblástico. Alta celularidade de osteoblastos malignos apresentando preservação do padrão arquitetural da neoplasia, assim como características morfológicas de osteoblastos neoplásicos, matriz óssea adjacente, células multinucleadas, ranhuras na cromatina e micronúcleo. HE, obj. 100X e 400X. D e E - OSA osteoblástico. Alta celularidade de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Há grande proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada – HE, obj. 100X e 400X. F - Imunoistoquímica positiva para anticorpo Osteopontina em citoinclusão de OSA canino. IHQ, obj. 400X.....	36
Figura 8: Imagens mostrando os resultados dos exames citopatológicos, citoinclusão, histopatológicos e imunohistoquímica de casos de OSA	

canino. A citopatologia (A) apresenta células mesenquimais malignas com características morfológicas de OSA fibroblastico, matriz óssea adjacente e células fusiformes. Giemsa, obj. 400X. B e C - OSA fibroblastico. Alta celularidade nos clusters celulares, contendo células malignas apresentando preservação do padrão arquitetural da neoplasia, assim como características morfológicas de osteoblastos neoplásicos, matriz óssea adjacente e células fusiformes. HE, obj. 100X e 400X. D e E - OSA fibroblastico. Alta celularidade de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Há grande proliferação de células fusiformes malignas e produção de matriz óssea não mineralizada – HE, obj. 100X e 400X. F - Imunoistoquímica positiva para anticorpo osteopontina em citoinclusão de OSA canino. IHQ, obj. 400X. 37

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1	xvi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Histogênese do osso	3
2. Osteossarcoma (OSA)	4
3. Características histológicas e imunoistoquímica:	7
4. Citologia Por Agulha Fina	6
4.1 Citoinclusão	7
OBJETIVOS	12
1. Geral	12
2. Específico	12
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2	19
RESUMO	20
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	22
1. MATERIAL E MÉTODOS	27
1.1 Citopatologia Aspirativa – Técnica	27
1.2. Técnica de citoinclusão	28
1.3. Avaliação citológica	30
1.4 Processamento Histopatológico de Amostra – Histologia	30
1.5 Classificação histopatológica	30
1.6 Processamento da Amostra – Imunoistoquímica	30
1.7 Leitura e interpretação da amostra	31

2.	ANALISE ESTATÍSTICA	32
3.	RESULTADOS	33
4.	DISCUSSÃO	39
5.	CONCLUSÃO	44
	REFERENCIAS	45

VEXENAT, S.C.O.R. **Sensibilidade da citoinclusão para o diagnóstico de Osteossarcoma em cães.** Botucatu, 2016, 59p. Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O Osteossarcoma (OSA) refere-se ao tumor ósseo mais comum em cães. A citoinclusão compreende o ato de inserir amostras citológicas em blocos de parafina, auxiliando na qualidade do diagnóstico citológico e obtendo espécimes de reserva para serem utilizadas em outras técnicas, incluindo imunoistoquímica. Com o intuito de avaliar a sensibilidade, especificidade e descrição da técnica de citoinclusão no diagnóstico de OSA de ossos longos de cães, 11 cães de oito a 13 anos com diagnóstico de OSA foram submetidos a exames citológicos, histopatológicos e, técnica da citoinclusão. Para a citoinclusão, foi feita a punção do tumor, fixação com 1mL de álcool a 95%, deixado em repouso por cinco minutos na própria seringa e, aspirou-se aproximadamente 9 mL de formol a 10% e manteve-se fixado por mais 24 horas, mantendo a seringa posicionada para cima para decantação das células. Como imunomarcador, utilizou-se a osteopontina. Em razão da maior preservação arquitetural, a avaliação a partir das amostras de citoinclusão, verificou-se parte de relações arquiteturais mais bem estabelecidas do que em amostras de esfregaços, auxiliando na caracterização do processo. Houve concordância da citoinclusão com a histopatologia e marcação imunoistoquímica de osteopontina positiva com alta sensibilidade e especificidade. É possível afirmar, que a técnica de citoinclusão é eficaz, segura para pesquisa de marcadores prognósticos de tumores ósseos em menor espaço de tempo e baixo custo podendo ser utilizada em clínicas e hospitais veterinários, em rotina, obtendo um material possível de ser arquivado, permitindo o uso de outras técnicas como a imunoistoquímica.

Palavras Chave: Osteossarcoma, Citoinclusão, Imunoistoquímica, Histopatológico, Citopatologia.

VEXENAT, S.C.O.R. **Sensibility of Cell block for the diagnosis of Osteosarcoma in dogs.** Botucatu, 2016, 59p. PhD - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, State University of São Paulo, "Julio de Mesquita Filho

ABSTRACT

Osteosarcoma (OSA) refers to the most common bone tumor in dogs. Cell Block involves the insertion of cytological specimens into paraffin blocks, aiding in the quality of the cytologic diagnosis and obtaining reserve specimens for use in other techniques, including immunohistochemistry. In order to evaluate the sensitivity, specificity and description of the Cell Block technique in the diagnosis of OSA of long dog bones, 11 dogs from 8 to 13 years old with OSA diagnosis were submitted to cytological, histopathological and Cell Block tests. For Cell Block, the tumor was punctured, fixated with 1mL of alcohol at 95%, allowed to stand for five minutes in the syringe itself, and approximately 9 mL of 10% formalin was aspirated and held for a further 24 Hours, keeping the syringe positioned upward for decantation of the cells. As an immunodiner, osteopontin was used. Due to the greater architectural preservation, the evaluation from the Cell Block samples, was verified part of architectural relations more well established than in swab samples, helping in the characterization of the process. There was concordance of the Cell Block with the histopathology and immunohistochemical labeling of positive osteopontin with high sensitivity and specificity. It is possible to affirm that the technique of Cell Block is effective, safe for research of prognostic markers of bone tumors in less time and at low cost, being able to be used in routine veterinary clinics and hospitals, obtaining a possible material to be archived, allowing The use of other techniques such as immunohistochemistry.

Keywords: Osteosarcoma, Cell Block, Immunoistochemistry, Histopathology, Cytopathology

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OSA) refere-se ao tumor ósseo mais comum em cães, geralmente com foco primário em ossos longos, podendo acometer também outras espécies como humanos (MORRIS & DOBSON, 2007; KARNIK et al., 2012;). É um tumor altamente agressivo e localmente invasivo, tornando-se progressivamente mais doloroso à medida que vai crescendo, promovendo destruição óssea, disseminando-se pela corrente sanguínea, tendo como órgão alvo o pulmão (OLIVEIRA e SILVEIRA., 2008; KRAJARNG et al., 2012). A doença nessa condição é metastática, possuindo deteriorização rápida e morte.

Ao longo dos anos, o número de casos vem aumentando exponencialmente (MAXIE, 2007). Para justificar os dados epidemiológicos as pesquisas apontam para predisposição genética e fator ambiental, que podem atuar individualmente ou em associação. As tais informações são baseadas em literatura especializada (ROWELL et al., 2011; LANGDON, 2012).

Pesquisadores buscam estratégias para identificar, desde agentes responsáveis, métodos de diagnósticos até protocolo terapêutico mais eficiente, para as espécies de cães. Em resposta à preocupação pública, visto que é o tumor ósseo maligno primário mais comum, que dissemina via corrente sanguínea para os pulmões, desencadeando expressiva deterioração clínica e morte (MUELLER, FUCHS e KASER-HOTZ, 2007).

Algumas semelhanças aparentes entre o comportamento de tumores ósseos nos cães e no homem favorecem a utilização desses animais como modelos experimentais para o estudo de vários aspectos das etapas da carcinogênese nessas duas espécies (ROWELL et al., 2011). Embora os roedores se destaquem como o grupo de animais mais utilizado, há um aumento no uso de cães nas pesquisas comparativas de determinados tipos de câncer humano (LANGDON, 2012). A escassez de dados na literatura sobre métodos alternativos para o diagnóstico rápido nos animais, contrasta com inúmeras alternativas nos tumores de mesma natureza no homem (WITHROW et al., 1991; DERNELL et al., 2007).

Diversos estudos sobre o OSA dos cães demonstram que, independente de raça, sexo e porte, as chances de cura se reduzem quando o diagnóstico é tardio (McNEILL et al., 2007; KRAJARNG et al., 2012). Feito já nas fases mais avançadas do processo. Ainda, a seleção inadequada da técnica para a colheita de amostra e inexperiência do profissional (BAKER e LUMSDEN, 1999; DERNELL et al., 2007).

Um dado de extrema importância é que as lesões em humanos acometem crianças e adultos jovens, porém na espécie canina os OSAs são incomuns em animais jovens (KRAJARNG et al., 2012; OUYANG et al., 2013).

Para a Medicina, bem como para a Veterinária é importante salientar que existem diversas barreiras que acabam limitando o sucesso de alguns procedimentos, dentre eles o tratamento, devido a diferentes fatores que influenciam, como por exemplo, a localização do tumor, suscetibilidade individual dos pacientes, as diversas causas e mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do tumor, e principalmente se possui focos de metástase (COSTA et al., 2001).

Diante do exposto é possível vislumbrar que dentro do elenco de métodos alternativos oferecidos para o diagnóstico de OSA primário de cães no Brasil e fora de nosso país, não dispõem de capacidade operacional para realizar a técnica da citoinclusão, a partir da punção aspirativa por agulha fina para o tal diagnóstico, nem tão pouco conhecimento científico para interpretá-lo.

Portanto, investigar melhor essa entidade é de significativa importância para a Oncologia Veterinária, não tão somente devido à incidência que exige diagnóstico rápido e tratamento efetivo, determinando a sobrevivência do animal, mas também em relação à necessidade de informações sobre o comportamento biológico do tumor que norteia o seu prognóstico. Assim, a importância do estudo: Sensibilidade da citoinclusão para o diagnóstico de OSA em cães e, portanto, favorecendo a criação de massa crítica nacional e internacional no assunto com os seus futuros resultados.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Histogênese do osso

O osso é predominantemente composto por um tecido de sustentação, contém células especializadas, matriz extracelular composta de fibras protéicas e substância fundamental sólida, resistente devido à deposição de sais de cálcio (ARANA-CHAVES et al, 1995). O tecido ósseo geralmente é separado dos tecidos adjacentes por um perióstio (membrana), de consistência fibrosa. O perióstio que reveste a superfície óssea é composto de uma camada externa fibrosa constituída principalmente de fibras colágenas e fibroblastos. Já a camada interna osteogênica consiste em algumas fibras colágenas e osteoblastos (LOPES e SIQUEIRA JR., 2015). Quando o osso circunda outro tecido, sua superfície interna é revestida por um endóstio (CRUZ., 2014).

O osso pode ser denso (compacto) ou esponjoso (trabecular) (MACKIE, 2003). A cavidade medular é revestida por um endóstio composto por células osteoprogenitoras (células osteogênicas), osteoblastos e osteoclastos ocasionais (ROSS, 2006).

As células osteoprogenitoras na medula óssea dão origem aos osteoblastos e possuem forma achatada. Localizam-se na superfície das trabéculas, nos canais de Havers (MACKIE., 2003).

Os osteoblastos são células cúbicas a cilíndricas responsáveis pela produção da matriz, formando trabéculas ósseas. À medida que a matriz óssea é sintetizada, os osteoblastos, envolvidos por ela, passam a ser chamados osteócitos. Essas células têm como função manter a viabilidade do tecido ósseo (TATE et al., 2004).

Os osteócitos são células discóides, achatadas, que se localizam em lacunas, sendo responsáveis pela integridade do osso (COWIN., 2002). Possuem longos prolongamentos que se alojam em finos canais ou túneis denominados de canaliculos de ósteon que possibilita a troca de produtos do catabolismo celular por nutrientes e oxigênio (CHERIAN et al., 2003). Também são capazes de responder aos níveis de cálcio no sangue, bem como a calcitonina e ao paratormônio, liberados pela tireóide e paratireóide, respectivamente, sendo assim, responsáveis pela homeostase, a curto prazo, do cálcio e do fosfato do organismo (CULLINAME, 2002).

As trabéculas ósseas formadas, se fundem umas nas outras, formando o osso esponjoso, que será remodelado para a formação do osso compacto. Pode ocorrer o aparecimento dos osteoclastos: Células grandes e multinucleadas, derivadas dos

monócitos, encontradas em depressões rasas na superfície trabecular e que atuam na reabsorção óssea (SODEK e MCKEE., 2000).

Na remodelação óssea, ocorre o recrutamento das células precursoras de osteoclasto para o osso. Presentes em tecidos hematopoéticos (medula óssea), respondem a sinais físicos e hormonais, e, concentram-se sobre determinada região da superfície óssea que será reabsorvida, fundindo-se e transformando-se em osteoclastos multinucleados (KOBAYASHI e KRONENBERG., 2005).

Para ocorrer a diferenciação das células progenitoras em osteoclastos, ocorrerá um mecanismo que envolve a interação célula a célula com células osteoblásticas (SUDA et al., 1997). Em seguida à diferenciação, a superfície óssea é preparada ocorrendo a remoção da camada de osteóide não-mineralizado pelos osteoblastos de revestimento que produzem enzimas proteolíticas: Metaloproteinases, collagenases e gelatinases. Com isso, facilita o acesso dos osteoclastos ao osso subjacente (MEIKLE et al., 1992).

O osso primário (osso recém-formado) possui um arranjo de fibras colágenas sem orientações precisas, presentes somente em ossos mais maduros. A interação entre osteoblastos e osteoclastos possibilita a substituição do osso imaturo pelo osso secundário (maduro) (AMADEI et al., 2006).

Os osteoclastos por sua vez irão absorver o complexo cartilagem-calcificada / osso calcificado (aumentando o colar subperiósteo em comprimento e espessura), deixando um amplo espaço que levará a formação da cavidade medular (SODEK e MCKEE., 2000).

2. Osteossarcoma (OSA)

Definido como tumor mesenquimal primário maligno cujas células cancerosas produzem matriz óssea, o OSA é o tumor mais comum nos ossos, respondendo por 20% de cânceres ósseos primários em humanos (KUMAR et al., 2005).

Em cães, cerca de 80% dos casos de neoplasias ósseas são predominantemente o OSA (MULLINS et al., 2004; WOLFESBERGER et al., 2006; SILVEIRA et al, 2008), sendo justamente essa semelhança biológica um modelo clínico para o estudo desse câncer em seres humanos (DERNELL et al., 2007; KHANNA et al., 2001; MUELLER, FUCHS e KASER-HOTZ, 2007).

Os cães de porte grande e gigantes, machos, a partir da meia idade, principalmente das raças Greyhound, Cão dos Pirineus, São Bernardo, Dogue Alemão, Setter Irlandês, Doberman, Pastor Alemão, Rottweiler, Golden Retriever, Irish Setter, Boxer, Labrador e

Mastiff são os mais acometidos segundo a literatura (DALECK et al., 2006; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; ANGSTADT et al., 2011). Animais sem raça definida também são acometidos pela doença (RAZOLEN e TEIXEIRA, 2013). Cães com peso superior a 35 kg, sendo que a maioria de todos os casos ocorrem em caninos com peso superior a 15 kg. A idade média de ocorrência é de oito anos, porém também existem relatos em cães jovens com menos de dois anos de idade.

Segundo Oliveira e Silveira (2008), os membros torácicos são mais acometidos como mostra a Figura 1, sendo que a maioria dos tumores acometem ossos longos (região distal do rádio e metáfises proximal de úmero) e, ao redor do joelho (metáfise distal de fêmur e proximal da tíbia) (OLIVEIRA e SILVEIRA, 2008; OSBORNE e KHANNA, 2012).



Figura 1: OSA em região de úmero esquerdo em cão. Nota-se aumento de volume e deformidade no local. (Fonte arquivo pessoal).

Alguns casos de fraturas não tratadas, principalmente as que passaram por processos de retardo na consolidação ou não união óssea, estão mais descritas na literatura com o aparecimento de OSA apendicular (WITHROW e VAIL, 2012). Mais de 15% dos pacientes que apresentam a sintomatologia clínica, possuem metástase pulmonar e, também podem estar acometidos com micrometástases (JAFFE, 2009). O OSA possui infiltração local agressiva dos tecidos adjacentes e rápida disseminação hematogêna (OLIVEIRA e SILVEIRA, 2008).

As principais manifestações clínicas em cães são: Dor local, aumento de volume e limitação dos movimentos podendo ser descobertos pela ocorrência de fraturas ósseas patológicas ou em radiografia de rotina (WITTIG., 2002).

Em geral, o OSA é uma neoplasia rapidamente progressiva e pode levar a mortalidade precoce, sendo que 90% dos pacientes caninos podem apresentar metástases microscópicas (FLORES et al., 2012) que não são detectadas nos diagnósticos por imagem durante a rotina, sendo a principal causa de morbidade, similar a humanos (DERNELL et al., 2007).

O diagnóstico baseia-se na história clínica, exame físico detalhado e exames de imagem, além do exame citopatológico, biópsia e posterior exame histopatológico (DALECK et al., 2006; RYSEFF & BOHN, 2012).

Caracterizado por um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que afetam a formação de osso ou tecido mesenquimal, o OSA possui uma diversidade de aspectos histológicos e morfológicos (SOARES et al., 2005).

3. Citologia Por Agulha Fina

A citologia é um método confiável e de diagnóstico minimamente invasivo cada vez mais usado na Medicina Veterinária com uma ferramenta diagnóstica (FIELDER e MAHAFFEY., 2009).

O exame citopatológico fornece informações muito úteis para o estabelecimento de diagnóstico e determinação de prognóstico, dando início a um plano terapêutico de forma precoce. Ele se caracteriza por um procedimento rápido e de baixo custo para o clínico veterinário, sendo a maioria dos casos diagnosticados com precisão. Atualmente a citopatologia é uma modalidade rotineira na identificação e no acompanhamento de determinadas doenças, muito importante também para processos neoplásicos (ROCHA, 2008).

A citopatologia e a histopatologia continuam sendo procedimentos diagnósticos complementares, mas refletem uma opção entre o baixo grau de invasão para colheita de amostra e, aumento da quantidade de informação disponível para avaliar a arquitetura tecidual pela histopatologia (FIELDER e MAHAFFEY., 2009).

Suspeita-se que o músculo, sendo um tecido mole, seja um tecido mais eficaz do que o osso para análise citológica, mas de fato, as doenças ósseas fornecem amostras citológicas diagnósticas maiores que as doenças musculares atuando como um auxílio valioso no diagnóstico de algumas afecções importantes que afetam esse sistema (NANDA et al., 1994).

Em OSA canino, embora o exame histopatológico permaneça como padrão para diagnóstico, a citologia aspirativa com agulha fina pode propiciar o diagnóstico definitivo como meio menos invasivo e relativamente barato (BAKER e LUMSDEN, 1999).

A PAAF (punção aspirativa por agulha fina) do OSA geralmente é feita utilizando-se uma agulha de aspiração de medula óssea. Na maioria dos casos, uma PAAF percutânea cega pode ser realizada somente com contenção manual (SANTOS., 2009).

As células do OSA são geralmente redondas ou ovais, têm bordas citoplasmáticas definidas, citoplasma azul-brilhante granular e núcleos excêntricos com ou sem nucléolos, células multinucleadas gigantes são comuns e há frequentemente, material amorfo róseo (osteóide) no fundo da lâmina ou no citoplasma dos osteoblastos (OLIVEIRA e SILVEIRA., 2008).

4. 4.1 Citoinclusão

O *Cell Block* (CB) ou citoinclusão compreende o ato de inserir amostras citológicas em blocos de parafina, afim de auxiliar na qualidade do diagnóstico citológico e também de se obter espécimes de reserva para serem utilizados nas técnicas diagnósticas complementares, como a imunoistoquímica e imunocitoquímica (VARSEGI e SHIGHAM, 2009).

Para aumentar o rendimento das amostras de citologia, a técnica de citoinclusão foi originalmente proposta para processar amostras de microscopia eletrônica (KULKARNI ET AL., 2000; SANCHEZ e SELVAGGI, 2006).

A citoinclusão, em humanos, é uma das mais antigas técnicas utilizadas para a avaliação de líquidos cavitários (WOJCIK e SELVAGI., 1991). Também rotineiramente usada para avaliação em lavagem brônquica (KAKODKAR et al., 2016), efusões pleurais, linfoma (KASE et al., 2016), massas abdominais (VINAYAKAMURTHY et al., 2016) dentre outros diversos órgãos como em ovários, testículos, glândulas salivares (NATHAN et al., 2000).

Na Medicina Veterinária, ainda é uma abordagem pouco explorada e possui vantagens como custo reduzido (comparando com o exame histopatológico), baixa invasividade, e resultado rápido. Ela permite a identificação de padrões histológicos, diminuindo o número de casos com diagnóstico indefinido (BRIFFOD et al., 2000). Devido à falta de informações suficientes ao exame citológico, e o risco de falso negativo ou diagnóstico indeterminado, a citoinclusão é uma boa alternativa preservando a arquitetura da célula como comparada (HANDA et al., 2005, ZANONI ET AL., 2013, 2009).

Potencialmente, aperfeiçoa a amostra citológica possibilitando a emblocagem da amostra em parafina com posterior processamento, à semelhança de uma amostra histológica, viabilizando o emprego de técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas complementares (MASSERDOTTI, 2006; SHIVAKUMARSWAMY et al., 2012). O material é fácil de ser estocado permitindo a utilização de um painel amplo de anticorpos (VINAYAKAMURTHY et al., 2016).

Vários fixadores para histologia já foram testados e utilizados para a confecção de citoinclusão (PAIVA et al., 2014). O sucesso do método é determinado pela experiência do profissional, na obtenção de material com celularidade suficiente (MAYALL et al., 2000).

A comparação entre as técnicas de citoinclusão é quase inviável, em virtude da grande variabilidade de técnicas testadas e utilizadas na confecção de citoinclusões, gerando grandes dificuldades na padronização de um método universal para essa modalidade de processamento e armazenamento de material destinado ao exame citológico (NIGRO et al., 2007; SHIVAKUMARSWAMY et al., 2012).

Com isso, a técnica de citoinclusão aumenta a chance de obter um resultado positivo, facilitando a rotina e demonstrando um diagnóstico correto (THAPAR et al., 2009).

Para o desenvolvimento e a padronização da técnica de citoinclusão, deve-se priorizar a manutenção da arquitetura tecidual e morfologia celular, menor tempo de confecção das amostras evitando perda da qualidade (NATHAN et al., 2000; KULKARNI et al., 2008; PAIVA et al., 2014).

Nathan et al. (2000) cita que a técnica de citoinclusão além de ser um método diagnóstico de custo reduzido, baixa invasividade e resultado mais rápido, proporciona amostra suficiente para definir o diagnóstico e prognóstico, além de viabilizar a abordagem cirúrgica e terapêutica. Embora a própria citologia cumpra esta função, persistem restrições relativas à sensibilidade do método (SANCHEZ & SELVAGGI, 2006).

5. Características histológicas e imunoistoquímica:

A biópsia incisional permite a obtenção de uma maior quantidade de tecido e também maior precisão do resultado. A desvantagem desta técnica, seria a necessidade de procedimento cirúrgico, e risco de complicações pós-cirúrgicas podendo ocorrer infecções, hematomas, disseminação do tumor e fraturas patológicas (DALECK et al., 2002).

Considerando o tipo celular e a natureza da matriz produzida por células neoplásicas, tem-se o diagnóstico histopatológico definitivo (DALECK et al., 2006). O sistema de classificação mais utilizado é baseado na classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde em Forma Central e Forma Periférica como descreve a Tabela 1 (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002).

Tabela 1: Classificação Tumoral de OSA

SUBTIPOS	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
Osteoblástico	Osteoblastos anaplásicos, volumosos, células fusiformes com citoplasma basofílicos e, núcleos hipercromáticos. Variações na quantidade de osteóide são subclassificados em: Produtivos (células tumorais com quantidade abundante de matriz osteóide dispostas em trabéculas - Padrão entrelaçado com células neoplásicas; Pouco produtivos (lesões ósseas líticas e discreta quantidade de osteóide tumoral permeando às células osteoblásticas atípicas).
Condroblástico	Células tumorais mesenquimatosas e produção em abundância de matriz condróide.
Fibroblástico	Predomínio de células tumorais fusiformes e, extensas áreas de matriz osteóide envolvendo aglomerados de células tumorais.
Telangectásico	Apresenta quantidade mínima de osteóide típico, presenças de canais vasculares e ausência de trabéculas de osso tumoral, células neoplásicas volumosas e pequenas.
Misto	Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular.
Periostal	Formação de nódulos de cartilagem circundados por células fusiformes com atipias e pouca matriz osteóide formada e osso tumoral, predominando padrão cartilaginoso.
Parostal	Bem diferenciado, com tecido maligno ósseo, cartilaginoso ou fibroso, podendo ocorrer os três padrões no mesmo tumor.
Do tipo células gigantes	Exibe escassa produção de matriz óssea e predomínio de grandes áreas contendo inúmeras células gigantes multinucleadas tumorais e presença de osteóide.

Fonte: MEUTEN (2002).

Os recentes avanços na imunoistoquímica e biologia molecular oferecem técnicas elaboradas para a caracterização de muitos tumores de tecidos moles, mas não são amplamente utilizados no diagnóstico de tumores ósseos. Sem dúvida, marcadores específicos acabarão por se tornarem disponíveis, mas, a classificação de um tumor como osteoblástico, condroblástico, ou fibroblástico de origem é baseada na morfologia celular e sobre a natureza da matriz produzida (CAVALCANTI et al., 2004)

A fim de proporcionar uma melhor investigação das características histogenéticas, a imunoistoquímica vem sendo muito utilizada em células tumorais como em OSA. Ela é empregada na caracterização do imunofenótipo do OSA e no diagnóstico diferencial com outros sarcomas ósseos diferenciando também de células mesenquimais indiferenciadas e células semelhantes a histiócitos (CAVALVANTI, 2007).

Os principais biomarcadores constituintes do painel de identificação do tumor são as proteínas e moléculas que apresentam marcação positiva: cálcio; métodos de mensuração da atividade da fosfatase alcalina (FA) a partir dos níveis de Ca^{2+} e, proteínas do líquido sobrenadante de amostras previamente padronizadas (LOUKOPOULOS et al., 2004). A osteopontina, osteocalcina, osteonectina, RANK-L são sinalizadores expressos por osteoblastos que regulam a mineralização da matriz óssea, (ERIKSEN, 2010).

Segundo Loukopoulos et al (2004), a osteopontina, como proteínas expressas em células de origem óssea, se apresenta como bom parâmetro para marcação do OSA. O osterix, também é importante marcador relacionado a diferenciação de osteoblastos (ERIKSEN, 2010).

Já a osteocalcina, apresenta ótima imunoexpressão para identificação de células ósseas diferenciadas em cultivos celulares (NEUPANE et al., 2008; JUHÁSOVÁ et al., 2011). Ela é uma proteína de baixo peso molecular, que se liga ao cálcio e localiza-se no tecido ósseo. Pode ocorrer deposição de anticorpos monoclonais ou policlonais anti-osteocalcina nos osteoblastos, possibilitando a utilização desta proteína como marcador de diferenciação celular no OSA canino (CAVALCANTI, 2007).

OBJETIVOS

1. Geral

- Utilizar o método da técnica de citoinclusão para o diagnóstico de OSA.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica de citoinclusão no diagnóstico de OSA de ossos longos de cães.

2. Específico

- Diagnosticar citologicamente Osteossarcoma:
A partir de esfregaços
A partir de citoinclusão
- Diagnosticar histopatologicamente osteossarcoma;
- Comparar diagnóstico citológico por esfregaços e diagnóstico histopatológico de osteossarcomas;
- Comparar diagnóstico citológico por citoinclusão e diagnóstico histopatológico de osteossarcomas;
- Comparar diagnóstico citológico e diagnóstico histopatológico de osteossarcomas;
- Realizar imunoistoquímica com amostras de citoinclusões.

REFERÊNCIAS

- AMADEI, S. U; SARMENTO,V.A.S; SILVEIRA, A.C.P; CARVALHO,Y.R; ROCHA, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol méd lab*, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ANGSTADT, A. Y.; MOTSINGER-REIF, A.; THOMAS, R.; WILLIAM C. KISSEBERTH, W. C.; COUTO, C. G.; DUVAL, D. L.; NIELSEN, D. M.; MODIANO, J. F.; BREEN, M. Characterization of Canine Osteosarcoma by Array Comparative Genomic Hybridization and RT-qPCR: Signatures of Genomic Imbalance in Canine Osteosarcoma Parallel the Human Counterpart. *Genes, Chromosomes & Cancer*. v.50, p.859–874, 2011.
- ARANA-CHAVES E, SOARES AMV, KATCHBURIAN E. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 1995;58:285-92
- BAKER, R.; LUMSDEN, J. The *musculoskeletal system*. In: Duncan, L. Color atlas of cytology of the dog and cat. 1.ed. St. Louis, MO: Mosby; 1999. p.199-207.
- BRIFFOD M, HACENE K, LE DOUSSAL V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Mod Pathol*. 13 (8): 841-50,2000
- CAVALCANTI, J.N.; AMSTALDEN, E.M.I.; GUERRA, J.L.; MAGNA, L.C. OSA em cães: estudo clínico-morfológico e correlação prognóstica. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.41, n.5, p.299- 305, 2004.
- CAVALCANTI, J.N. OSA canino: estudo histopatológico, imunoistoquímico e da atividade proliferativa. 2007. 96f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
- CHERIAN, P. P. *et al*. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem*, v. 278, p. 43146-56, 2003.
- COSTA, F.S.; TOSTES, R.A.; FARIAS, M.R.; SAMPAIO, R.L.; PEREZ, J.A. Metástase cutânea de OSA em um cão – relato de caso. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.38, n.5, 2001.
- COWIN, S. C. *Mechanosensation and fluid transport in living bone*. J Musculoskeletal Neuronal Interact, v. 2, n. 3, p. 256-60, 2002
- CRUZ, A. S. Medição da densidade óssea através de ondas eletromagnéticas e classificação por MVS. 2014.
- CULLINANE, D.M. The role of osteocyte in bone regulation: Mineral Homeostasis versus mechanoreception. *Journal Musculoskeletal Neuron Interact*, v.2 ,n.3, p.242-244,2002.

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

DALECK, C. R et al. Estudo retrospectivo de OSA primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 1, p. 125-131, 2006.

DERNELL, W. S; EHRHART, N. P; STRAW, R. C, VAIL, D. M: *Tumors of the Skeletal System*. Withrow and MacEwen's. *Small Animal Clinical Oncology* St. Louis: Saunders Elsevier, 2007, 4: 540-567.

ERIKSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. v.11, n.4, p.219–227, 2010.

FIELDER, S. E; MAHAFFEY, E. A. Sistema Musculo Esquelético. In: Cowell, R.L; TYLER, R. D; MEINKOTH, J. H; DeNicola, D.B. *Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos*. 3 ed.New York,USA, 2009. P.210

FLORES, R. J.; LI, Y.; YU, A.; SHEN, J.; RAO, P. H.; LAU, S. S.; VANNUCCI, M.; LAU, C. C.; MAN, T. K. *A systems biology approach reveals common metastatic pathways in osteosarcoma*. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/17520509/6/50>. 2012. Acesso em: 24.01.2015.

HANDA U, BAL A, MOHAN H, BHADWAJ S. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of bone lesions. *Cytopathology*. 2005;16:59 – 64.

JAFFE, N. Adjuvant chemotherapy in osteosarcoma: An odyssey of rejection and vindication. In Pediatric and Adolescent Osteosarcoma, *Cancer Treatment and Research*. Edited by: Jaffe N, Bielack SS, Bruland OS. New York: Springer: 152, 2009:

JUHÁSOVÁ, J.; JUHÁS, S.; KLÍMA, J.; STRNÁDEL, J.; HOLUBOVÁ, M.; MOTLÍK JR, J. Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment. *Physiological Reserach*. p.1-30, 2011

KAKODKAR, U.C; VADALA,R; MANDREKAR, S. Utility of Cell-Block of Bronchial Washings in Diagnosis of Lung Cancer- A Comparative Analysis with Conventional Smear Cytology. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016 Apr, Vol-10(4): OC25-OC28

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

KASE, S; NAMBA K; IWATA, D; MIZUUCHI, K; KITAICHI N; KITAICHI; TAGAWA K; OKADA-KANNO; MATSUNO, Y e ISHIDA, S. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. *Diagnostic Pathology* (2016) 11:29

KHANNA, C.; KHAN, J.; NGUYEN, P.; PREHN, J.; CAYLOR, J.; YEUNG, C.; TREPEL,J.; MELTZER, P.; HELMAN, L. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of OSA. *Cancer Research*. v.61, p.3750–3759, 2001.

KOBAYASHI, T.; KRONENBERG, H. Minireview: transcriptional regulation indevelopment bone. *Endocrinology*, v. 146, n. 3, p. 1012-7, 2005.

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

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. ROBBINS E COTRAN patologia - *Bases patológicas das doenças*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005

KULKARNI MB, PRABHUDESAI NM, DESAI SB, BORGES AM. Scrape cell-block technique for fine needle aspiration cytology smears. *Cytopathology*. 2000; 11:179 – 184

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

LOPES, H. P; SIQUEIRA JR, J. F. *Endodontia: biologia e técnica*. Elsevier Brasil, 2015.

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

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, 2003.

MCNEILL, C. J.; OVERLEY, B.; SHOFR, F. S.; KENT, M. S.; CLIFFORD, C. A.; SAMLUK, M.; HANEY, S.; WINKLE, V.; SORENMO, K. U. Characterization of the biological behavior of appendicular osteosarcoma in Rottweilers and a comparison with others breeds: a review of 258 dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*. v.5, n.2, p.90-98, 2007.

MASSERDOTTI, C. Architectural patterns in citology: Correlation with histology. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, p. 388-396, 2006.

MAXIE, M.G. *Pathology of Domestic Animals*, Volume 1. 5^a ed. Sauders-Elsevier: Oxford, 2007. p. 110-177.

MAYALL, F et al. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *Journal of clinical pathology*, v. 53, n. 6, p. 451-457, 2000.

MEIKLE, M. C. *et al.* Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci*, v. 103, p.1093-9, 1992.

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

MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em Pequenos Animais*. São Paulo: Roca. 2007. 300p.

MUELLER, F.; FUCHS, B.; KASER-HOTZ, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Research*, v. 27, n. 1A, p. 155-164, 2007.

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

NANDA, M. et al. Fine needle aspiration cytology (FNAC) in malignant bone tumours. *Indian journal of pathology & microbiology*, v. 37, n. 3, p. 247-253, 1994.

NATHAN, NITHYANANDA A. et al. Cell Block Cytology. *American journal of clinical pathology*, v. 114, n. 4, p. 599-606, 2000.

NEUPANE, M.; CHANG, C.C.; KIUPEL, M.; YUZBASIAN-GUKAN. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, v.14, n.6, p.1007-15, 2008.

NIGRO, K.; TYNSKI, Z.; WASMAN, J. et al. Comparison of cell block preparation methods for nongynecologic thinprep specimens. *Diagnostic Cytopathol.*, v.3, p.640-643, 2007

OLIVEIRA, F; SILVEIRA, P. OSA em Cães. *Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária*. n. 10, ano, VI, jan. 2008.

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

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

PAIVA, M. B. et al. Citoinclusão de capa leucocitária e medula óssea de cães: padronização da técnica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, p. 439-444, 2014.

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

RAZOLEN, J. M.; TEIXEIRA, T. F.; Metástase de OSA em osso de cão sem raça definida – relato de caso. *Clínica Veterinária*, n. 105, jun/ag. p.58-62. Ano XVIII, 2013

ROSS, F. Patrick. Osteoclast biology and bone resorption. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, v. 6, p. 30-5, 2006.

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

- RYSEFF, J. K.; BOHN, A. A. Detection of alkaline phosphatase in canine cells previously stained with Wright–Giemsa and its utility in differentiating osteosarcoma from other mesenchymal tumors. *Veterinary Clinical Pathology*. v.41, p.391-395, 2012
- ROCHA, N.S. Exame Citológico no Diagnóstico de Lesões da Pele e Subcutâneo. *Clínica Veterinária*, n.76, p.76-80, 2008.
- SANTOS, S.O. *OSA canino: Relato de casos*. 2009. 48f. TCC (Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco
- SANCHEZ, N.; SELVAGGI, S.M. Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates diagnostic. *Cytopathology*, v.34, n.2, p. 89-92, 2006
- SHIVAKUMARSWAMY, Udasimath et al. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *Journal of Cytology*, v. 29, n. 1, p. 11, 2012.
- SILVEIRA, P.R.; DALECK, C. R.; EURIDES, D.; SILVA, L.A.F; REPETTI C. S. F.; E DE NARDI A. B. Estudo retrospectivo de OSA apendicular em cães. *Ciência Animal Brasileira*. São Paulo: UFG, v. 9, n. 2, p. 487-495, abr./jun. 2008.
- SOARES, R.C; SOARES, A.F; SOUZA, L.B; SANTOS, A.L.V; PINTO, L.P. OSA de mandíbula inicialmente mimetizando lesão do periápice dental: relato de caso. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2005;171:242-5.
- SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000, v. 24, p. 99-126, 2000
- SUDA, T. *et al.* Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res*, v. 12, n. 6, p. 869-79, 1997.
- TATE, Melissa L. Knothe et al. The osteocyte. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2004.
- THAPAR, M.; MISHRA, R.K.; SHARMA, A.; GOYAL, V. ; GOYAL V. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions. *Journal of Cytology*. v. 26, p. 60-64, 2009.
- VARSEGI, George M.; SHIDHAM, Vinod. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 29, p. e1316-e1316, 2009.
- VINAYAKAMURTHY, S; MANOLI, N; SHIVAJIRAO, P; MANJUNATH; JOTHADY,S. Role of Cell Block in Guided FNAC of 52 Abdominal Masses. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016 Mar, Vol-10(3): EC01-EC05
- WITHROW, STEPHEN J. et al. Comparative Aspects of Osteosarcoma: Dog Versus Man. *Clinical orthopaedics and related research*, v. 270, p. 159-168, 1991.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. *Small animal clinical oncology*. 5.ed. Missouri: Saunders. Elsevier, 2012.

WITTIG JC, BICKELS J, PRIEBAT D, JELINEK J, KELLAR-GRANEY K, SHMOOKLER B, et al. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *American Family Physician*. 2002;65:1123-32.

WOJCIK, E.M; SELVAGI, S.M. Comparison of smears and s in the fine needle aspiration diagnosis of recurrent gynecologic malignancies. **Acta Cytol**. 1991;35:773-6.

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

ZANONI et al., 2013, Diogo Sousa; KLEEB, Silvia Regina; XAVIER, José Guilherme. Emprego do cell block de agarose como método complementar no diagnóstico citológico de tumores mamários caninos. *Ciência Rural*, v. 43, n. 3, p. 489-495, 2013.

CAPÍTULO 2

Sensibilidade da Citoinclusão para o diagnóstico de OSA em cães

*Stephane Cássia Oliveira Rosa Vexenat¹, Alessandre Hataka¹, Noeme Sousa Rocha¹

1 Department of Clinical Veterinary Medicine, Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, Brazil; Address: Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970, Botucatu, SP, Brasil *Corresponding Author: stephanevexenat@gmail.com

RESUMO

O Osteossarcoma (OSA) refere-se ao tumor ósseo mais comum em cães. A citoinclusão compreende o ato de inserir amostras citológicas em blocos de parafina, auxiliando na qualidade do diagnóstico citológico e obtendo espécimes de reserva para serem utilizadas em outras técnicas, incluindo imunoistoquímica. Com o intuito de avaliar a sensibilidade, especificidade e descrição da técnica de citoinclusão no diagnóstico de OSA de ossos longos de cães, 11 cães de oito a 13 anos com diagnóstico de OSA foram submetidos a exames citológicos, histopatológicos e, técnica da citoinclusão. Para a citoinclusão, foi feita a punção do tumor, fixação com 1mL de álcool a 95%, deixado em repouso por cinco minutos na própria seringa e, aspirou-se aproximadamente 9 mL de formol a 10% e manteve-se fixado por mais 24 horas, mantendo a seringa posicionada para cima para decantação das células. Como imunomarcador, utilizou-se a osteopontina. Em razão da maior preservação arquitetural, a avaliação a partir das amostras de citoinclusão, verificou-se parte de relações arquiteturais mais bem estabelecidas do que em amostras de esfregaços, auxiliando na caracterização do processo. Houve concordância da citoinclusão com a histopatologia e marcação imunoistoquímica de osteopontina positiva com alta sensibilidade e especificidade. É possível afirmar, que a técnica de citoinclusão é eficaz, segura para pesquisa de marcadores prognósticos de tumores ósseos em menor espaço de tempo e baixo custo podendo ser utilizada em clínicas e hospitais veterinários, em rotina, obtendo um material possível de ser arquivado, permitindo o uso de outras técnicas como a imunoistoquímica.

Palavras Chave: Osteossarcoma, Citoinclusão, Imunoistoquímica, Histopatológico, Citopatologia.

ABSTRACT

Osteosarcoma (OSA) refers to the most common bone tumor in dogs. Cell Block involves the insertion of cytological specimens into paraffin blocks, aiding in the quality of the cytologic diagnosis and obtaining reserve specimens for use in other techniques, including immunohistochemistry. In order to evaluate the sensitivity, specificity and description of the Cell Block technique in the diagnosis of OSA of long dog bones, 11 dogs from 8 to 13 years old with OSA diagnosis were submitted to cytological, histopathological and Cell Block tests. For Cell Block, the tumor was punctured, fixated with 1mL of alcohol at 95%, allowed to stand for five minutes in the syringe itself, and approximately 9 mL of 10% formalin was aspirated and held for a further 24 Hours, keeping the syringe positioned upward for decantation of the cells. As an immunodiner, osteopontin was used. Due to the greater architectural preservation, the evaluation from the Cell Block samples, was verified part of architectural relations more well established than in swab samples, helping in the characterization of the process. There was concordance of the Cell Block with the histopathology and immunohistochemical labeling of positive osteopontin with high sensitivity and specificity. It is possible to affirm that the technique of Cell Block is effective, safe for research of prognostic markers of bone tumors in less time and at low cost, being able to be used in routine veterinary clinics and hospitals, obtaining a possible material to be archived, allowing The use of other techniques such as immunohistochemistry.

Keywords: Osteosarcoma, Cell Block, Immunoistochemistry, Histopathology, Cytopathology

INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OSA) refere-se ao tumor ósseo mais comum em cães. Geralmente com foco primário em ossos longos, podendo acometer também outras espécies como humanos (MORRIS & DOBSON, 2007; KARNIK et al., 2012). É um tumor altamente agressivo e localmente invasivo, tornando-se progressivamente mais doloroso à medida que vai crescendo promovendo destruição óssea e disseminando-se pela corrente sanguínea e tem como órgão alvo o pulmão (OLIVEIRA e SILVEIRA, 2008; KRAJARNG et al., 2012). A doença nessa condição é metastática, possuindo deterioração rápida e morte. Ao longo dos anos, o número de casos vem aumentando exponencialmente (MAXIE, 2007).

Os cães de porte grande e gigantes, principalmente das raças Greyhound, Cão dos Pirineus, São Bernardo, Dogue Alemão, Setter Irlandês, Doberman, Pastor Alemão, Rottweiler, Golden Retriever, Irish Setter, Boxer, Labrador e Mastiff são os mais acometidos segundo a literatura (DALECK et al., 2006; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; ANGSTADT et al., 2011). Acomete mais em cães machos, com idade média de oito anos, também acomete raramente cães jovens com menos de dois anos de idade. Animais sem raça definida também são muito acometidos pela doença (RAZOLEN e TEIXEIRA, 2013). Cães com peso superior a 35 kg, sendo que a maioria de todos os casos ocorrem em caninos com peso superior a 15 kg.

Segundo Oliveira e Silveira (2008), os membros torácicos são mais acometidos que os pélvicos sendo que a maioria dos tumores acometem ossos longos (região distal do rádio e metáfises proximal de úmero) e, ao redor do joelho (metáfise distal de fêmur e proximal da tíbia) (OLIVEIRA e SILVEIRA, 2008; OSBORNE e KHANNA, 2012).

Nesse caso, para justificar os dados epidemiológicos as pesquisas apontam para predisposição genética e fator ambiental, que podem atuar individualmente ou em associação. As tais informações são baseadas em farta literatura especializada (ROWELL et al., 2011; LANGDON, 2012).

Diversos estudos sobre o OSA dos cães demonstram que independente de raça, sexo e porte, as chances de cura se reduzem quando o diagnóstico é tardio (McNEILL et al., 2007; KRAJARNG et al., 2012), qual seja, feito já nas fases mais avançadas do processo associada a seleção inadequada da técnica para a colheita de amostra e inexperiência do profissional (BAKER e LUMSDEN, 1999; DERNELL et al., 2007).

Um dado de extrema importância é que as lesões em humanos acometem crianças e adultos jovens, porém na espécie canina os OSAs são incomuns em animais jovens (KRAJARNG et al., 2012; OUYANG et al., 2013).

Para a Medicina, bem como para a Veterinária é importante salientar que existem diversas barreiras que acabam limitando o sucesso de alguns procedimentos, dentre eles o tratamento, devido a diferentes fatores que influenciam, como por exemplo, a localização do tumor, suscetibilidade individual dos pacientes, as diversas causas e mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do tumor, e principalmente se possui focos de metástase (COSTA et al., 2001).

A escassez de dados na literatura sobre métodos alternativos para o diagnóstico rápido nos animais, contrasta com inúmeras alternativas nos tumores de mesma natureza no homem (WITHROW et al., 1991; DERNELL et al., 2007).

O diagnóstico baseia-se na história clínica, exame físico detalhado e exames de imagem, além do exame citológico, biópsia e posterior exame histopatológico (DALECK et al., 2006; RYSEFF & BOHN, 2012).

A citologia é um método confiável e de diagnóstico minimamente invasivo e cada vez mais usado na Medicina Veterinária com uma ferramenta diagnóstica que tem se expandindo com o passar dos anos. (FIELDER e MAHAFFEY., 2009).

O exame citológico fornece informações muito úteis para o estabelecimento de um diagnóstico destacando o grau de pleomorfismo entre os osteoclastos. Pode determinar o prognóstico, dando início ao protocolo terapêutico de forma precoce. Ele se caracteriza por um procedimento rápido e de baixo custo para o clínico veterinário, sendo a maioria dos casos diagnosticados com precisão, assim atualmente a citologia é uma técnica rotineira de identificação e no acompanhamento de determinadas doenças, muito importante também para processos neoplásicos (ROCHA, 2008).

A biópsia incisional permite a obtenção de uma maior quantidade de tecido e também maior precisão do resultado. A desvantagem desta técnica, seria a necessidade de procedimento cirúrgico, e risco de complicações pós-cirúrgicas podendo ocorrer infecções, hematomas, disseminação do tumor e fraturas patológicas (DALECK et al., 2002).

Considerando o tipo celular e a natureza da matriz produzida por células neoplásicas, tem-se o diagnóstico histopatológico definitivo (DALECK et al., 2006). O sistema de classificação mais utilizado é baseado na classificação proposta pela

Organização Mundial de Saúde em Forma Central e Forma Periférica (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002).

Afim de proporcionar uma melhor investigação das características histogenéticas, a imunoistoquímica vem sendo muito utilizada em células tumorais como em OSA. Ela é empregada na caracterização do imunofenótipo do OSA e no diagnóstico diferencial com outros sarcomas ósseos diferenciando também de células mesenquimais indiferenciadas e células semelhantes a histiócitos (CAVALVANTI, 2007).

Atualmente, técnicas moleculares podem ser realizadas diretamente nos esfregaços citológicos (SCHMITT E BARROCA., 2012). Os principais biomarcadores constituintes do painel de identificação do tumor são as proteínas e moléculas que apresentam marcação positiva são: cálcio, métodos de mensuração da atividade da fosfatase alcalina (FA) a partir dos níveis de Ca^{2+} e, proteínas do líquido sobrenadante de amostras previamente padronizadas (LOUKOPOULOS et al., 2004). A osteopontina, osteocalcina, osteonectina, RANK-L são sinalizadores expressos por osteoblastos que regulam a mineralização da matriz óssea, (ERIKSEN, 2010).

Segundo Loukopoulos et al (2004), a osteopontina, como proteínas expressas em células de origem óssea, se apresenta como bom parâmetro para marcação do OSA. É um sinalizador expresso por osteoblasto que regula a mineralização da matriz óssea (ERIKSEN, 2010). Na imunocitoquímica, várias variáveis podem afetar os resultados das preparações citológicas. Por isso, devem ser cuidadosamente levados em conta para obter resultados precisos e confiáveis.

O *Cell Block* (CB) ou citoinclusão, compreende o ato de inserir amostras citológicas em blocos de parafina, afim de auxiliar na qualidade do diagnóstico citológico e também de se obter espécimes de reserva para serem utilizados nas técnicas diagnósticas complementares, como a imunoistoquímica e imunocitoquímica (VARSEGI e SHIGHAM, 2009).

Na Medicina Veterinária, ainda é uma abordagem pouco explorada e possui vantagens como custo reduzido (comparando com o exame histopatológico), baixa invasividade, e resultado rápido. Ela permite a identificação de padrões histológicos, diminuindo o número de casos com diagnóstico indefinido (BRIFFOD et al., 2000). Devido à falta de informações suficientes e risco de falso negativo ou diagnóstico indeterminado pela citologia. A citoinclusão é uma boa alternativa por preservar a arquitetura da célula como comparada ao exame citológico e permitir outras análises futuras (HANDA et al., 2005, ZANONI ET AL., 2013).

Potencialmente aperfeiçoa a amostra citológica possibilitando a emblocagem da amostra em parafina com posterior processamento, à semelhança de uma amostra histológica, viabilizando o emprego de técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas complementares (MASSERDOTTI, 2006; SHIVAKUMARSWAMY et al., 2012). O material é fácil de ser estocado permitindo a utilização de um painel amplo de anticorpos (VINAYAKAMURTHY et al., 2016).

A comparação entre as técnicas de citoinclusão é quase inviável, em virtude da grande variabilidade de técnicas testadas e utilizadas na confecção de cito inclusões, gerando grandes dificuldades na padronização de um método universal para essa modalidade de processamento e armazenamento de material destinado ao exame citológico (NIGRO et al., 2007; SHIVAKUMARSWAMY et al., 2012).

Nathan et al. (2000) cita que a técnica de citoinclusão além de ser um método diagnóstico de custo reduzido, baixa invasividade e resultado mais rápido, proporciona amostra suficiente para definir o diagnóstico e prognóstico, além de viabilizar a abordagem cirúrgica e terapêutica. Embora a própria citologia cumpra esta função, persistem restrições relativas à sensibilidade do método (SANCHEZ & SELVAGGI, 2006).

Pesquisadores buscam estratégias para identificar desde agentes responsáveis e métodos de diagnósticos até protocolos terapêuticos mais eficientes, para as espécies de cães. Em resposta à preocupação pública, visto que é o tumor ósseo maligno primário mais comum, que dissemina via corrente sanguínea para os pulmões, desencadeando expressiva deterioração clínica e morte (MUELLER, FUCHS e KASER-HOTZ, 2007).

Diante do exposto é possível vislumbrar que dentro do elenco de métodos alternativos para o diagnóstico de OSA primário de cães oferecidos no Brasil e fora de nosso país, não dispõem de capacidade operacional para realizar a técnica da citoinclusão, a partir da punção aspirativa por agulha fina para o tal diagnóstico, nem tão pouco conhecimento científico para interpretá-lo.

Portanto, investigar melhor essa entidade é de significativa importância para a oncologia veterinária, não tão somente devido à incidência que exige diagnóstico rápido e tratamento efetivo, determinando a sobrevida do animal, mas também em relação à necessidade de informações sobre o comportamento biológico do tumor que norteia o seu prognóstico. Assim, a importância do estudo: Sensibilidade da citoinclusão para o diagnóstico de OSA em cães, será de avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica

de citoinclusão no diagnóstico de OSA de ossos longos de cães, fornecendo um material possível de ser arquivado, permitindo o uso de outras técnicas como a imunoistoquímica.

1. MATERIAL E MÉTODOS

Para a condução do experimento foram selecionados OSAs primários em caninos diagnosticados no Hospital Veterinário pelo serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP campus de Botucatu e, clínicas particulares. Estes animais passaram pelo atendimento clínico, radiológico, cirúrgico e patológico, sendo o diagnóstico presumível dado pelos achados citológicos e confirmado pelo histopatológico. Procedeu-se investigação de citoinclusão em tumores de animais acometidos por OSA (Figura 2) e, dos fragmentos obtidos das peças cirúrgicas pós-amputação ou óbito dos respectivos membros dos cães acometidos pelo OSA.

Foram colhidas 23 amostras de animais portadores de OSA, contudo, por motivos de óbito, não retorno do paciente, somente 11 animais foram incluídos no estudo. Procedeu-se o processamento de amostras citológicas e teciduais, realizando-se esfregaços, citoinclusão e cortes histológicos.

O estudo teve parecer favorável da Comissão de ética no uso de animais FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, protocolo 48/2015 (anexo 1).

1.1 Citopatologia Aspirativa – Técnica

Para a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis 30x8 mm, seringas descartáveis de 10 mL, citoaspirador de Valeri (FIGURA 2), lâminas histológicas 26x76 mm com extremidades lisas e foscas, recipientes porta lâminas e lápis para identificar as lâminas.



Figura 2: Citoaspirador de Valleri, associado à seringa de 10 mL e agulha 30x8.

Após montar o sistema citoaspirador, seringa e agulha o exame foi realizado da seguinte forma: antissepsia da pele com álcool-iodado (mesmo em peça), introduzindo a agulha na lesão (Figura 3), realizando pressão negativa puxando-se todo o gatilho do citoaspirador promovendo a tração máxima do êmbolo da seringa. Com isso, a formação de vácuo no sistema possibilitou a aspiração do material celular para o interior da agulha.

Em seguida a agulha foi movimentada em várias direções em forma de “leque” sem retirá-la do nódulo, evitando que o ar penetrasse e mantendo a pressão negativa. Feito isso, a agulha pôde ser então removida do nódulo.



Figura 3: A- Introdução e aspiração com o auxílio do citoaspirador de nódulo em região de cotovelo de cão e realização de pressão negativa puxando-se todo o gatilho do citoaspirador promovendo a tração máxima do êmbolo da seringa.

Com a finalidade de formar um pequeno botão celular em lâmina de microscopia, depositou-se o material em um único local, a fim de se obter um esfregaço de boa qualidade (THRALL, 2000).

Para a realização dos esfregaços, o material da lâmina foi rapidamente distendido colocando-se uma lâmina de vidro lisa de forma perpendicular sobre o material depositado na primeira e com um movimento único e rápido uma lâmina foi deslocada sobre a outra em sentidos opostos.

Após a realização dos esfregaços, as lâminas destinadas à coloração de Giemsa permaneceram à temperatura ambiente por cinco minutos e, em seguida, fixadas em metanol 100% por no mínimo cinco minutos para depois serem coradas.

1.2. Técnica de citoinclusão

Assim como na citologia aspirativa, utilizando o mesmo material (citoaspirador, seringa de 10mL, e agulha 30x8) e mesma técnica, após a aspiração na massa, com o

êmbolo em repouso, foi aspirado 1mL de álcool 95% e deixado em repouso por cinco minutos para fixação do material. Após esse período, na mesma seringa do aspirado, com o objetivo de preservação máxima da viabilidade das células obtidas no procedimento, aspirou-se aproximadamente 9 mL de Formol 10% foi aspirado e fixado por mais 24 horas, mantendo a seringa posicionada para cima para decantação das células, como mostra a Figura 4.

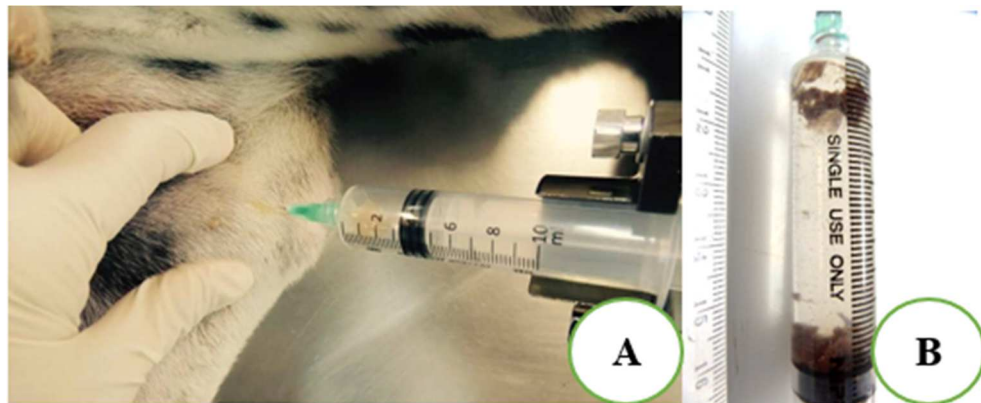


Figura 4: A: Punção aspirativa de Neoplasia em região distal de úmero direito. B: Seringa obtendo material aspirado imerso na solução fixadora.

Após 24 horas, retirou-se a agulha afim de expulsar o material colhido e inseridos em cassetes histológicos sendo neste estudo, necessário o uso de esponjas histológicas nos cassetes, evitando a perda de material (Figura 5).

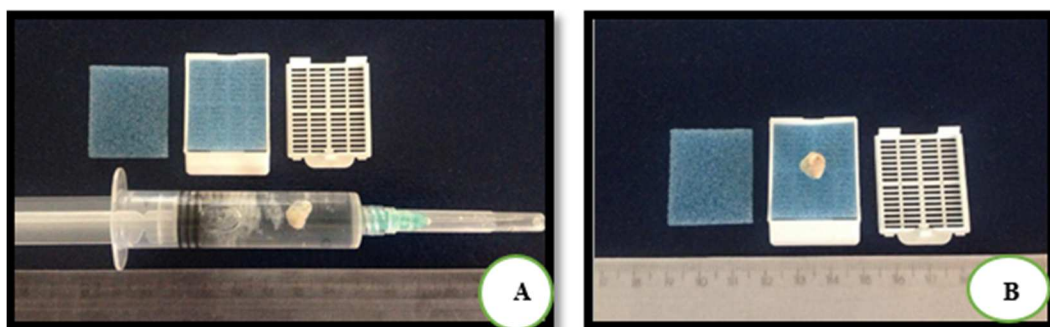


Figura 5: A: Seringa contendo material aspirado de OSA, B: Material obtido pela PAAF, retirado da seringa, após a fixação em álcool 95% e formalina tamponada. Nota-se importante o uso de uma pequena esponja para evitar a perda de material.

O material obtido foi submetido a banhos crescentes de álcool, seguindo para os banhos de xilol e parafina, todos com duração máxima de 20 minutos. As amostras foram incluídas em parafina e realizaram-se cortes de quatro micrômetros, que foram corados

pelo método de hematoxilina e eosina (HE), e realizada a técnica de imunoensaio para a citoinclusão.

1.3. Avaliação citológica

O número de lâminas por caso foi variável. Em cada lâmina avaliou-se: celularidade, relação núcleo/citoplasma, variações do tamanho nuclear, padrão de distribuição da cromatina, número de nucléolos e morfologia nucleolar, mitoses atípicas, coesão e padrão de organização espacial entre as células.

1.4 Processamento Histopatológico Amostra – Histologia

Após o exame macroscópico, fragmentos do tumor foram fixados em formalina tamponada a 10%, descalcificados em ácido nítrico 10% e processados pelas técnicas histológicas usuais de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Em seguida, cortados com espessura máxima de 4 micrômetros, e corados pela Hematoxilina-Eosina para estudo em microscopia de luz.

1.5 Classificação histopatológica

Os cortes de tecido ósseo neoplásico, corados pela hematoxilina-eosina foram examinados ao microscópio óptico, permitindo a caracterização do processo mórbido. O processo foi classificado de acordo com o sistema descrito por Meuten (2002), baseando-se na avaliação de ao menos dois observadores.

1.6 Processamento da Amostra – Imunohistoquímica

Para a realização da imunoistoquímica, foram utilizados blocos de parafina, provenientes da Citoinclusão, cortados em micrótomo com espessura de 3µm e distendidos em lâminas histológicas preparadas com 3-aminopropyltrimethoxy silane (Sigma A3648) objetivando promover maior aderência dos cortes nas lâminas de vidro, evitando assim, a perda do material durante o processamento imunoistoquímico.

Para a técnica, utilizou-se como anticorpo a osteopontina marcador de células tumorais de origem osteoblástica (ERIKSEN, 2010). Estas marcações são de grande importância para a confirmação da presença do osteoblasto na lamina (LOUKOPOULOS et al., 2004; ERIKSEN, 2010; NEUPANE et al., 2008).

Realizada a recuperação antigênica em citrato com pH 6,0 na panela de pressão (Pascal), bloqueio da peroxidase endógena foi realizada em H₂O₂ a 3% diluído em

metanol. O bloqueio de proteínas foi realizada com 6 % de leite Molico®. Todas as incubações do anticorpo primário foram realizadas à temperatura 4 ° C durante a noite . Osteocalcina com a diluição a 01:50 de anticorpos de trabalho. HRP anticorpo Segundo (enVision).DAB - 5 minutos.

1.7 Leitura e interpretação da amostra:

Com o auxílio do microscópio óptico, as lâminas foram avaliadas nas objetivas de 40 vezes. Na citologia e citoinclusão, a identificação de quantidade suficiente de células com morfologia preservada foi o critério utilizado para a amostra ser considerada viável. O diagnóstico histopatológico é definitivo e considera a natureza da matriz produzida pelas células neoplásicas e o tipo celular, sendo o diagnóstico definitivo de OSA dado com a presença da produção de osteóide ou ainda de osso neoformado pelas células mesenquimais malignas (THOMPSON e POOL, 2002).

A imunoistoquímica, devido às características de deposição de anticorpos monoclonais ou policlonais anti-osteopontina nos osteoblastos, possibilita que a osteopontina seja um importante instrumento de ajuda no diagnóstico imunoistoquímico das neoplasias ósseas (TAKADA et al., 1992).

2. ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados utilizando-se tabelas de contingência 2x2 (BERQUÓ, 2001), calculando-se a sensibilidade e a especificidade dos métodos, sendo:

Sensibilidade: Detectar os verdadeiramente positivos

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{verdadeiros positivos (VP)}}{\text{verdadeiros positivos (VP)} + \text{falsos negativos (FN)}} \times 100$$

Especificidade: Detectar os verdadeiramente negativos

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{verdadeiros negativos (VN)}}{\text{falsos positivos (FP)} + \text{verdadeiros negativos (VN)}} \times 100$$

No presente estudo, foi definido como positivo o osteossarcoma e como negativo, lesões neoplásicas de outra origem ou mesmo inflamatória, utilizando-se como parâmetro o diagnóstico histopatológico. Na imuno-histoquímica, empregou-se a avaliação descritiva da imunoreatividade.

3. RESULTADOS

De 11 animais que foram incluídos no estudo, procederam-se o processamento de amostras citológicas e teciduais, realizando-se esfregaços, citoinclusão e cortes histológicos. As amostras de OSAs primários provenientes de cães de diferentes raças, idades, localizações são descritas na (Tabela 2).

Tabela 2: Relação de idade, raça, sexo e localização de lesões em cães submetidos à Citologia Aspirativa por agulha fina, Cell Block (Citoinclusão) e Histopatologia no setor de Patologia do HV Unesp - Botucatu.

ANIMAIS	SEXO	IDADE	RAÇA	LOCALIZAÇÃO
A1	Fêmea	11	Pitt Bull(médio)	Região escapular (Membro Torácico Direito)
A2	Fêmea	11	Golden Retriever(grande)	Região distal Fêmur Direito
A3	Fêmea	8	Dog Alemão (gigante)	Úmero proximal direito
A4	Macho	12	Akita (grande)	Região Coxo Femoral
A5	Fêmea	12	Husky (médio)	Região distal Fêmur Direito
A6	Fêmea	12	SRD (médio)	Rádio e Ulna Distal direito
A7	Macho	9	Rottweiler (grande)	Rádio e Ulna Distal direito
A8	Macho	13	Rottweiler (grande)	Metacarpo direito
A9	Macho	11	Pitt Bull (médio)	Úmero proximal direito
A10	Macho	13	Setter Inglês (grande)	Região distal Fêmur Direito
A11	Fêmea	10	Pinscher (pequeno)	Região distal Fêmur Direito

Houve acometimento de mais fêmeas (diferença 6/11 animais) em relação aos machos, porém sem diferença significativa. As idades dos animais variaram de oito a 13 anos, sendo a média de 11 anos (Tabela 1).

As lesões mostraram-se mais frequentes em região distal de Fêmur direito, acometendo 4 animais (36,37%), seguida por região de úmero proximal direito e rádio e ulna distais direitos, acometendo dois animais cada (18,18%). As amostras restantes estavam localizadas na região escapular direita, articulação coxo femoral e no metacarpo que foram acometidos em apenas um animal (9,09%) (Tabela 2 e Figura 6).



Figura 6: Cadela Pit Bull. OSA em região escapulo-umeral

Em relação ao o porte dos animais acometidos, houve predomínio de animais com porte médio e grande, dentre eles, os cães das raças Pit Bull e Rottweiler foram os mais acometidos (dois animais cada – 18,18%). Por sua vez, as outras raças foram citadas apenas uma vez. Dos animais de porte pequeno, somente uma cadela de raça pequena (Pinscher) foi acometida pela doença.

Em relação à técnica da citoinclusão, não houve dificuldade durante a colheita a ponto de ser necessário de uma sedação.

Segundo o padrão histopatológico descrito por Meuten (2002), foram encontrados nove casos de OSA osteoblástico (82%) e dois casos de OSA fibroblástico (18%), como mostra a tabela 3.

Tabela 3: Relação da classificação neoplásica do OSA em cães, comparativo entre citopatologia aspirativa, citoinclusão e histopatologia.

ANIMAIS	Citopatologia	Citoinclusão	Histopatologia
A1	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A2	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A3	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A4	OSA Fibroblástico	OSA Fibroblástico	OSA Fibroblástico
A5	OSA Fibroblástico	OSA Fibroblástico	OSA Fibroblástico
A6	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A7	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A8	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A9	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A10	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico
A11	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico	OSA Osteoblástico

OSA: Osteossarcoma

Para os OSAs osteoblásticos, houve identificação de presença de ilhas osteóide circundados por células tumorais, com um grau variável de pleomorfismo celular podendo ter a presença de células gigantes multinucleadas, células isoladas ou aglomeradas, assemelhando-se a osteoblastos, corroborando com os achados de Fielder e Mahaffey, (2009). Já para os OSAs fibroblásticos, a presença de células tumorais fusiformes, com extensas áreas de matriz osteóide envolvendo aglomerados de células tumorais é característica para definir a classificação tumoral de OSA definido por Meuten (2002).

Os resultados descritivos dos exames citopatológicos, citoinclusão, histopatológicos e imunoistoquímicos de OSA osteoblástico são demonstrados nas (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E, e 7F).

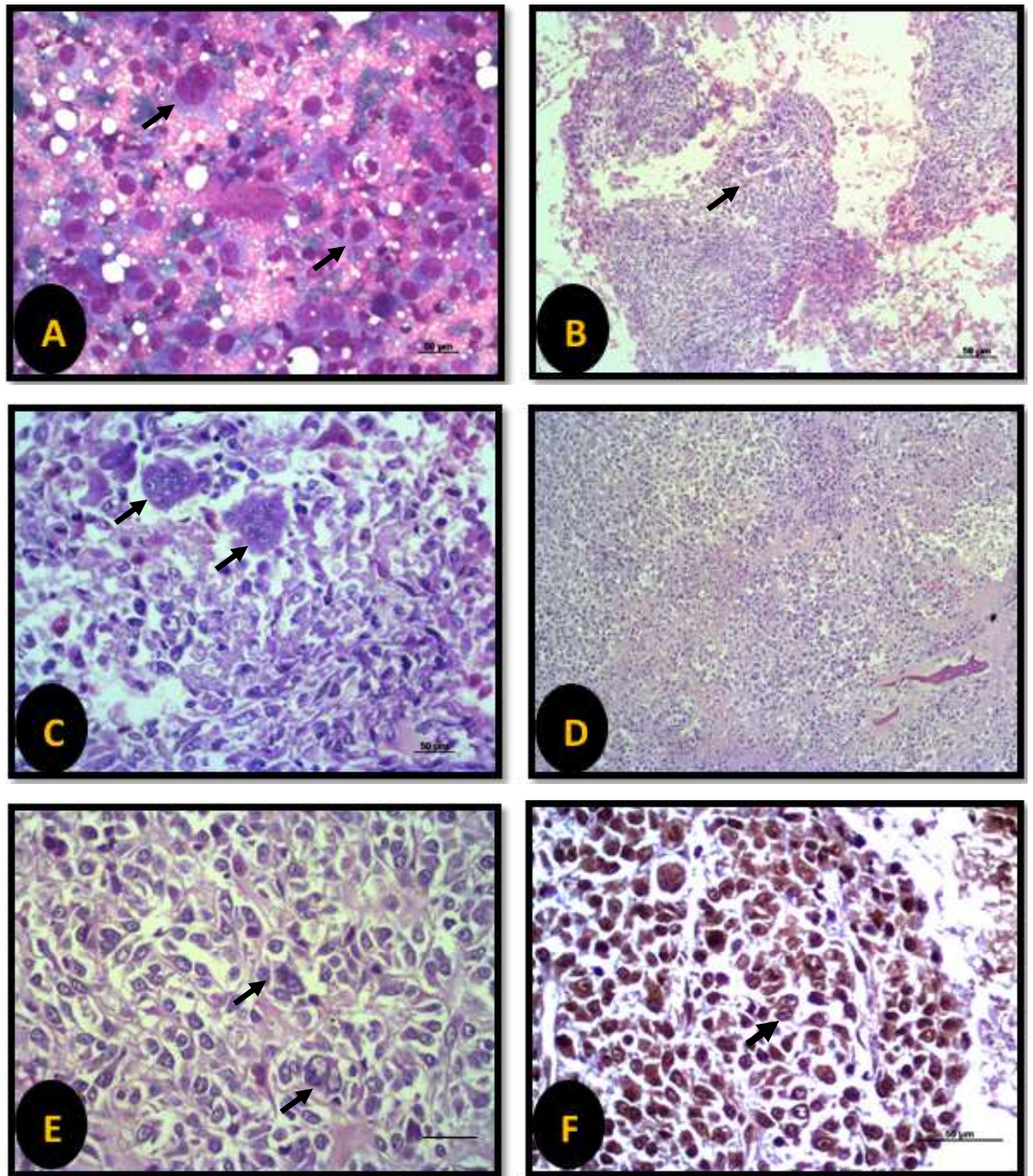


Figura 7: OSA osteoblástico. (A) Citologia Aspirativa: Células mesenquimais malignas. Características morfológicas de osteoblastos neoplásicos, matriz óssea adjacente, células multinucleadas – Giemsa, obj. 40X. (B) Cito inclusão: OSA obj. 10x. (C) Citoinclusão Alta celularidade de osteoblastos malignos. Preservação Padrão arquitetural da neoplasia, características morfológicas de osteoblastos neoplásicos, matriz óssea adjacente, células multinucleadas e micronúcleo. HE, obj. 40X. (D) Histopatológico: Alta celularidade de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existent com grande proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada – HE, obj. 10x e (E) Histopatológico: objetiva 400X. (F) Imunoistoquímica positiva para anticorpo Osteopontina em citoinclusão de osteossarcoma canino. IHQ, obj. 40X.

Os resultados descritivos dos exames citopatológicos, citoinclusão, histopatológicos e imunoistoquímicos de OSA fibroblástico são demonstrados nas (Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, e 8F).

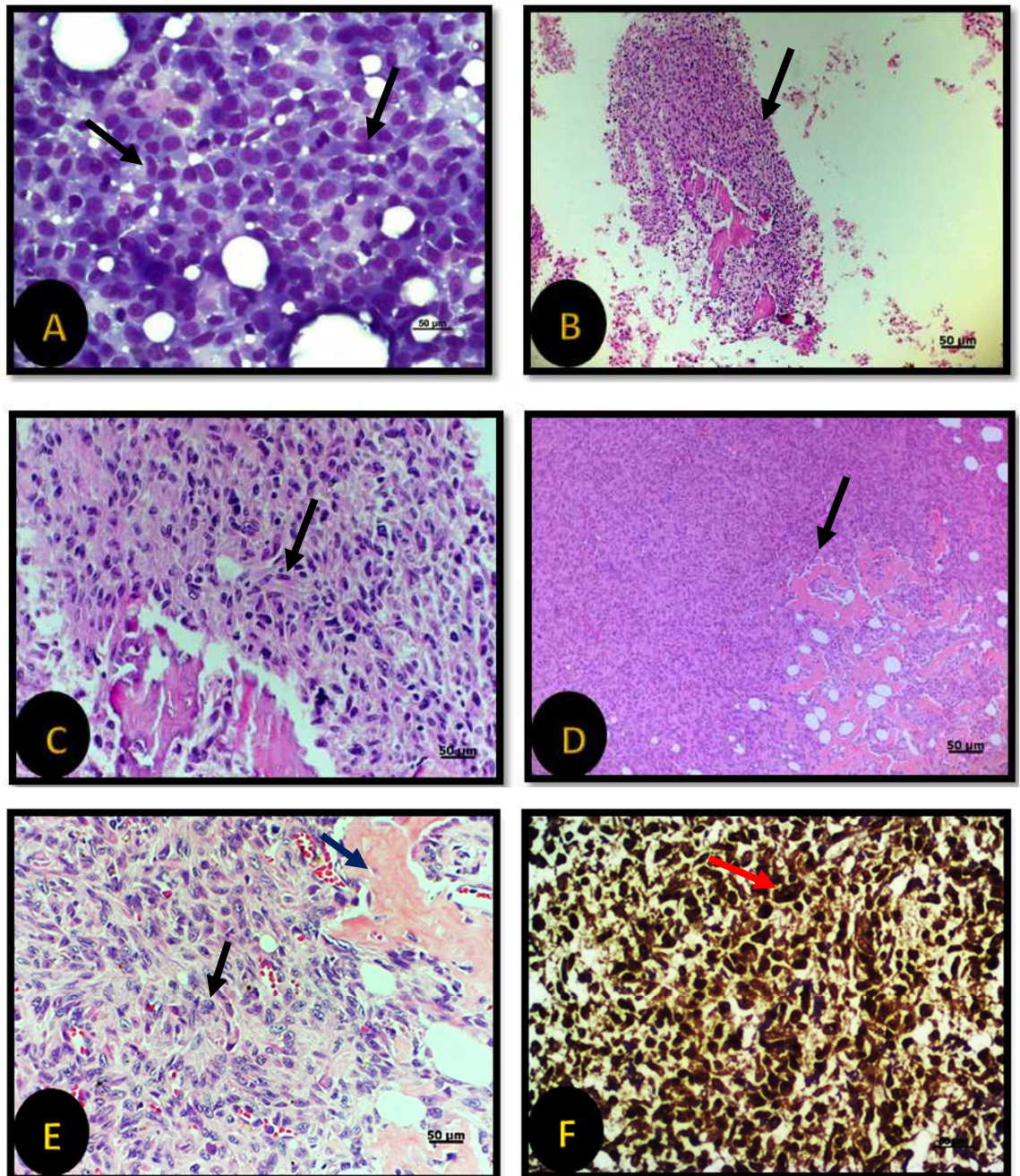


Figura 8: OSA fibroblástico. (A) Citologia Aspirativa: Células mesenquimais malignas, matriz óssea adjacente e células fusiformes. Giemsa, objetiva 40X. (B) Citoinclusão objetiva 10x e (C) Citoinclusão objetiva 40x: Alta celularidade nos clusters celulares, células malignas apresentando preservação do padrão arquitetural da neoplasia, assim como características morfológicas de osteoblastos neoplásicos, matriz óssea adjacente e células fusiformes HE. (D) Histopatológico objetiva 10X e (E) Histopatológico HE, e 40X - Alta celularidade de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Há grande proliferação de células fusiformes malignas e produção de matriz óssea não mineralizada. (F) Citoinclusão - Imunoistoquímica positiva para anticorpo Osteopontina, objetiva 40X.

A avaliação das amostras citológicas e teciduais foram realizadas procedendo-se análise estatística dos dados obtidos utilizando-se tabelas de contingência 2x2 como mostra a Tabela 4 abaixo e em seguida, a tabela 5 e 6:

Tabela 4: Tabela de contingência comparando os resultados citológicos por esfregaço com os histopatológicos a partir de formações ósseas, evidenciando-se o número de verdadeiros positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiros negativos.

Esfregaço	Histopatológico		Total
	+	-	
+	11	0	11
-	0	0	0
Total	11	0	11

Tabela 5: Tabela de contingência comparando os resultados citológicos por citoinclusão com os histopatológicos a partir de formações ósseas evidenciando-se o número de verdadeiros positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiros negativos.

Citoinclusão	Histopatológico		Total
	+	-	
+	11	0	11
-	0	0	0
Total	11	0	11

Tabela 6: Tabela de contingência comparando os resultados citológicos por esfregaço + citoinclusão com os histopatológicos a partir de formações ósseas, evidenciando-se o número de verdadeiros positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiros negativos.

Esfregaço +citoinclusão	Histopatológico		Total
	+	-	
+	11	0	11
-	0	0	0
Total	11	0	11

4. Discussão

Onze animais acometidos por OSA foram selecionados para o desenvolvimento deste estudo. Procedeu-se o processamento de amostras citológicas e teciduais, realizando-se esfregaços, citoinclusão e confirmando o diagnóstico com cortes histológicos. Segundo Ryseff e Bohn, (2012), a avaliação citológica por punção aspirativa é uma técnica menos invasiva, com diagnóstico preciso em curto intervalo de tempo, porém, a confirmação é feita por meio do exame histopatológico.

Dentre os animais supracitados na Tabela 1, pode-se observar que cadelas foram mais acometidas do que os cães sendo este resultado não significativo. Neuwald et al. (2006) cita que cães machos possuem uma maior ocorrência de OSA do que as fêmeas. Segundo Heyman et al. (1992), as raças São Bernardo, Rottweiler e Dinamarquês, são exceções e se observam maiores incidências nas fêmeas. Entretanto em outros estudos, não se observa predisposição sexual na frequência deste tumor (LANGENBACH ET AL., 1998, 2001).

A localização da lesão está entre um dos indicadores importantes para avaliação do prognóstico (CAVALCANTI, 2007). Cavalcanti et al. (2004) citam que a distribuição das lesões de acordo com a frequência se dá maior em rádio e ulna (26,8%), posteriormente em fêmur (24,8%), tíbia, escápula, úmero e por fim falanges. Segundo Nelson e Couto (2006), OSAs localizados na escápula têm prognóstico ruim, relatos de maior sobrevida ocorrem quando acometem as articulações cárpicas e társicas devido a facilidade de amputação.

A maioria dos animais possuía faixa etária de oito a 13 anos (resultado não significativo), sendo a média de 11 anos de idade. A literatura cita que a doença acomete animais idosos, de idade média de oito anos, porém também existem relatos em cães jovens (OLIVEIRA e SILVEIRA, 2008). Cães da raça, São Bernardo, Irish Setters, Rottweiler (SILVEIRA, 2005), Doberman (COOLEY et al., 2002), Pastor Alemão, Golden Retriever, Boxer, Labrador e Mastiff os mais acometidos (OLIVEIRA e SILVEIRA, 2008; ANGSTADT et al., 2011). No presente estudo, predominaram as raças Pit Bull e Rottweiler porém também foi diagnosticado em outros animais como os SRD (sem raça definida), Golden Retriever, Dog Alemão, Akita, Husky Siberiano, Setter Inglês. Bersano (2006) cita que cães com peso acima de 15 kg, ou superior a 36,5 kg, têm maior probabilidade no desenvolvimento do tumor. Cães de pequeno porte são raramente acometidos devido ao fechamento precoce das placas de crescimento (KRAJARNG et al., 2012). No presente estudo também foi acometido um cão da raça pinscher.

As células tumorais individuais variam quanto à forma redonda à fusiforme e geralmente diferem-se muito quanto ao tamanho. Frequentemente elas possuem características citológicas clássicas de malignidade, como cariomegalia, anisocariose, nucléolos grandes e múltiplos que diferem em tamanho. Podendo também possuir vacúolos claros em seu citoplasma (FIELDER e MAHAFFEY., 2009). A maioria dos animais descritos no estudo foi acometida por OSA osteoblástico.

A identificação de presença de ilhas de osteóides circundados por células tumorais para os OSAs osteoblásticos, corroboram com os achados de Fielder e Mahaffey, (2009). Já para os OSAs fibroblásticos, a presença de células tumorais fusiformes, com extensas áreas de matriz osteóide são características para definir a classificação tumoral de OSA definido por Meuten (2002).

Em Medicina Veterinária, o atraso no uso da citologia na prática clínica deveu-se, sobretudo, à ignorância da sua utilidade diagnóstica e a insegurança associada à sua interpretação. As imagens que a citologia nos proporciona (duas dimensões), permite adequado detalhamento celular, com a observação dos limites celulares e de suas junções (FERREIRA, 2008). Porém, as amostras citológicas não refletem com exatidão parâmetros arquiteturais e, raramente, uma descrição citológica elucida sobre a arquitetura da lesão, limitando-se a informações celulares isoladas (MASSERDOTTI, 2006). Na avaliação de cortes histológicos, os arranjos celulares são muito relevantes.

A disposição das células nas amostras de citoinclusão podem mimetizar o arranjo destas nos cortes histológicos, quando colhidas e preparadas apropriadamente, sendo uma alternativa a realização da técnica. A amostra citológica emblocada em parafina, costuma preservar as características arquitetônicas teciduais, dentro de uma população celular, ou mesmo explicita relações entre populações celulares distintas, neoplásicas ou não, contribuindo para o diagnóstico (ROFAGHA; SHECKET, 2002). A citoinclusão também é indicada em caso de limitação de amostragem, permitindo a emblocagem e possui como vantagem o fornecimento de um banco de dados, obtendo-se maximização de informações a partir do restrito material disponível (KULKARNI; et al, 2000). Segundo ZANONI et al., 2013 (2012), há poucos trabalhos na medicina veterinária relacionados à citoinclusão.

A avaliação das amostras citológicas por esfregaços e de amostras teciduais foram realizadas procedendo-se análise estatística dos dados obtidos utilizando-se tabelas de contingência 2x2. Também foi utilizada a tabela de contingencia 2x2 para a avaliação das amostras citológicas por citoinclusão e teciduais.

Acredita-se na importância do exame da citologia aspirativa, que no presente estudo que levou a um resultado de 100% de concordância diagnóstica nos esfregaços em relação a histopatologia, sendo fundamental para o prognóstico do animal. Quando considerados em associação, esfregaço e citoinclusão, evidenciou-se uma “facilidade” na compreensão do processo etiológico, como definir o diagnóstico e subclassificar o mesmo, identificando-se uma sensibilidade de 100%. Segundo Hegazy e Hegazy (2013), a citoinclusão foi introduzida afim de melhorar a precisão e interpretação do diagnóstico.

Vinayakamurthy et al. (2016), ao comparar a citoinclusão com exame de citologia aspirativa em 66 pacientes humanos apresentando massas abdominais, obteve sensibilidade de 91,6% e especificidade de 88,88%. Estes mesmos autores relatam que foram capazes de fornecer um diagnóstico citopatológico definitivo em todos os 66 casos aumentando a sensibilidade para 100% quando associado os exames citológico com as citoinclusões. Em nosso estudo obtivemos 100% de sensibilidade e especificidade.

Em relação ao cálculo da especificidade, o mesmo foi comprometido, pela ausência de verdadeiros negativos. Contudo, a análise descritiva dos casos, pode-se afirmar que a especificidade dos casos foram 100% para ambas as análises.

Alguns estudos afirmam que os resultados obtidos pelo método de citoinclusão são mais satisfatórios do que os obtidos com a citologia convencional, devido a uma maior eficácia para alcançar a aquisição de material adequado em estabelecer um diagnóstico citopatológico concordante com o exame histológico, pelo fato de apresentar características histológicas que podem ajudar a superar as deficiências da citologia convencional (NODA et al., 2010, ZANONI et al., 2013, 2012 e PAIVA et al 2014). Em razão da maior preservação arquitetural, a avaliação a partir das amostras de citoinclusão parte de relações arquiteturais mais bem estabelecidas do que em amostras de esfregaços, podendo auxiliar na caracterização do processo, fato corroborado pelas imagens deste estudo, mostrando uma concordância de citoinclusão com o exame histopatológico onde há preservação da arquitetura da célula e formação tecidual.

Para técnicas de citoinclusão, vários fixadores já foram utilizados e descritos em literatura como formalina tamponada (KASE et al., 2016), ácido pícrico, solução de Bouin, fixador Carnoy, fixador B-5 mercúrio, etanol (ZITO et al., 1995; NATHAN et al., 2000), gel de agarose (ZANONI ET AL., 2013., 2010). Essa variedade está diretamente relacionada à diversidade de técnicas existentes, que foram adaptadas à necessidade e especificidade de cada pesquisador (ZITO *et al.*, 1995).

Neste estudo, optou-se pela técnica da fixação com 1mL de álcool a 95% e deixado em repouso por 5 minutos para fixação do material na própria seringa e, após esse período, aspirou-se aproximadamente 9 mL de formol a 10% e manteve-se fixado por mais 24 horas, mantendo a seringa posicionada para cima para decantação das células. Esta técnica demonstrou-se mais fácil de realizar podendo ser facilmente utilizada em clínicas e hospitais veterinários, exames de rotina, de menor custo e, menor tempo para processamento de amostra. Em comparação com a técnica de gel de agarose, esta técnica tem grande vantagem por praticidade e menor custo pois dispensa o uso de centrifuga, gel de agarose, eppendorff, além de não ter problemas em confecção de amostras muito ressecadas.

Segundo Nathan et al. (2000), devido à grande variabilidade de técnicas testadas e utilizadas para a confecção de citoinclusão, a comparação entre elas torna-se inviável, gerando grandes dificuldades na padronização de um método universal para essa modalidade de processamento e armazenamento de material destinado ao exame citológico. Estes mesmos autores citam que o desenvolvimento e a padronização da técnica de citoinclusão devem atender aos seguintes requisitos: manutenção da arquitetura tecidual e morfologia celular; otimização do tempo de processamento das amostras afim de não ocorrer perda de qualidade do material; obtenção de material de reserva suficiente para a realização de testes como colorações especiais e reações de imunoistoquímica; e, por fim, desenvolvimento de método simples, de baixo custo e reproduzível.

Em relação a marcação imunoistoquímica, todas as amostras foram positivas demonstrando a eficácia do uso da osteopontina como imunomarcador nas citoinclusões. A osteopontina, é um sinalizador expresso por osteoblasto que regula a mineralização da matriz óssea (ERIKSEN, 2010). Atualmente, técnicas moleculares podem ser realizadas diretamente nos esfregaços citológicos (SCHMITT E BARROCA., 2012). Na imunocitoquímica, várias variáveis podem afetar os resultados das preparações citológicas. Por isso, devem ser cuidadosamente levados em conta para obter resultados precisos e confiáveis. Atenção especial deve ser dada ao tipo de material coletado, tipo de fixador utilizado, anticorpos selecionados e, os controles adequados. Segundo Fowler e Lachar (2008), controles positivos internos usualmente são difíceis de obter em amostras citológicas. A realização da Imunoistoquímica na citoinclusão demonstra resultados superiores quando comparada aos esfregaços citológicos (VINAYAKAMURTHY et al., 2016).

Devido a emblocagem do material, muitas secções podem ser cortadas, reduzindo a quantidade de artefatos, facilitando a confecção de outras lâminas. A alta celularidade, permite a avaliação de um grande número de antígenos, facilitando a confecção da técnica. Isto entra em consonância com os achados de Schmitt e Barroca (2012). Vinayakamurthy et al (2016) concluíram que apesar de ocorrer casos com aparecimento de manchas na lâmina da citoinclusão, estas podem conter material de diagnóstico adequado, além de aumentar ainda mais a especificidade do diagnóstico, proporcionando arquitetura celular e secções adicionais para colorações especiais e imunoistoquímica.

O uso de biomarcadores alvos da carcinogênese especificamente para o OSA em cães na oncologia veterinária, tem por principal objetivo a necessidade de personalizar tratamento dos pacientes, pois desta forma, identificamos a partir de um painel imunomarcador quais são os potenciais genes que estão ativos no tumor, conduzindo melhor a terapêutica em função dessa expressão, proporcionando melhor qualidade e expectativa de vida ao animal (SELVARAJAH e KIRPENSTEIJN, 2010). Kase et al. (2016), relatam que a citoinclusão tem muito a oferecer na utilização de imunocitoquímica.

5. CONCLUSÃO

A alta sensibilidade e especificidade encontrada para a marcação imunoistoquímica de osteopontina de OSA, associada a descrição morfológica entre o diagnóstico citomorfológico da citoinclusão e histopatológico torna-se possível afirmar, que a técnica de citoinclusão é eficaz e uma boa alternativa por preservar a arquitetura da célula como comparada ao exame citológico permitindo outras análises futuras, segura para pesquisa de marcadores prognósticos de tumores ósseos em menor espaço de tempo e baixo custo podendo ser utilizada em clínicas e hospitais veterinários, em rotina, obtendo um material possível de ser arquivado. Neste trabalho, conclui-se a eficácia da utilização do método de citoinclusão para o diagnóstico do OSA em cães.

REFERENCIAS

- ANGSTADT, A. Y.; MOTSINGER-REIF, A.; THOMAS, R.; WILLIAM C. KISSEBETH, W. C.; COUTO, C. G.; DUVAL, D. L.; NIELSEN, D. M.; MODIANO, J. F.; BREEN, M. Characterization of Canine Osteosarcoma by Array Comparative Genomic Hybridization and RT-qPCR: Signatures of Genomic Imbalance in Canine Osteosarcoma Parallel the Human Counterpart. *Genes, Chromosomes & Cancer*. v.50, p.859–874, 2011
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. *Bioestatística*. 2. ed. São Paulo: E.P.U, 2001. 350 p.
- BERSANO, P.R.O. Expressão imunoistoquímica da ciclooxigenase–2 (Cox2) e quantificação das regiões organizadas de nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do OSA canino. 2006. 120f. *Dissertação* (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa.
- BRIFFOD M, HACENE K, LE DOUSSAL V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Mod Pathol*. 13 (8): 841-50,2000
- CAVALCANTI, J.N.; AMSTALDEN, E.M.I.; GUERRA, J.L.; MAGNA, L.C. OSA em cães: estudo clínico-morfológico e correlação prognóstica. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.41, n.5, p.299- 305, 2004.
- CAVALCANTI, J.N. OSA canino: estudo histopatológico, imunoistoquímico e da atividade proliferativa. 2007. 96f. *Tese (Doutorado em Ciências Médicas)* – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
- COOLEY, D. M.; BERANEK, B. C.; SCHLITTER, D. L. et al. Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v.11, p.1434-1440, 2002.
- DALECK, C. R et al. Estudo retrospectivo de osteossarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 1, p. 125-131, 2006.
- ERIKSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. v.11, n.4, p.219–227, 2010.
- FERREIRA, L. F. G. R. B. Estudo comparativo entre análises citológica e histopatológica no diagnóstico de tumores de canídeos. 2008 100f. *Dissertação De Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária*- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica De Lisboa, Lisboa, 2008.
- FIELDER, S. E; MAHAFFEY, E. A. *Sistema Musculo Esquelético*. In: Cowell, R.L; TYLER, R. D; MEINKOTH, J. H; DeNicola, D.B. *Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos*. 3 ed.New York,USA, 2009. P.210

FOWLER, Larry J.; LACHAR, Whitney A. Application of immunohistochemistry to cytology. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 132, n. 3, p. 373-383, 2008.

HANDA, U. et al. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of bone lesions. *Cytopathology*, v. 16, n. 2, p. 59-64, 2005.

HEGAZY, R. A, HEGAZY, A. A. FNAC and Cell Block study of thyroid lesions. *Universal Journal of Medical Science*. 2013;1(1):1-8.

HEYMAN, S. J; DIEFENDERFER, D. L.; GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Canine axial skeletal osteosarcoma a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Veterinary Surgery*, v. 21, n. 4, p. 304-310, 1992.

KASE, S; NAMBA K; IWATA, D; MIZUUCHI, K; KITAICHI N; KITAICHI; TAGAWA K; OKADA-KANNO; MATSUNO, Y e ISHIDA, S. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. *Diagnostic Pathology* (2016) 11:29

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

LANGENBACH, A. et al. Extraskelatal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 34, n. 2, p. 113-120, 1998.

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

MASSERDOTTI, C. Architectural patterns in citology: Correlation with histology. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, p. 388-396, 2006.

MAXIE, M.G. *Pathology of Domestic Animals*, Volume 1. 5ª ed. Sauders-Elsevier: Oxford, 2007. p. 110-177.

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

MUELLER, F.; FUCHS, B.; KASER-HOTZ, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Research*, v. 27, n. 1A, p. 155-164, 2007.

NATHAN, N. A; NARAYAN, E., SMITH, M. M., & HORN, M. J et al. Cell Block Cytology. *American journal of clinical pathology*, v. 114, n. 4, p. 599-606, 2000.

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

NEUPANE, M.; CHANG, C.C.; KIUPEL, M.; YUZBASIAN-GUKAN. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, v.14, n.6, p.1007-15, 2008.

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

NIGRO, K.; TYNSKI, Z.; WASMAN, J. *et al.* Comparision of cell block preparation methods for nongynecologic thinprep specimens. *Diagnostic Cytopathol.*, v.3, p.640-643, 2007

NODA, Y. *et al.* Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *Journal of Gastroenterology*, v. 45, p. 868–875, 2010.

OLIVEIRA, F.; SILVEIRA, P. OSA em Cães. *Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária*. n. 10, ano, VI, jan. 2008.

OSBORNE, T. S.; KHANNA, C. A review of the association between osteosarcoma metastasis and protein translation. *Journal of comparative pathology*, v. 146, n. 2, p. 132-142, 2012.

PAIVA, M.B; GOUVEIRA, G.M.; FIORAVANTI, H.; LUVIZOTTO, M.C.R. Citoinclusão de capa leucocitária e medula óssea de cães: padronização da técnica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.2, p.439-444, 2014.

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

RAZOLEN, J. M.; TEIXEIRA, T. F.; Metástase de osteossarcoma em osso de cão sem raça definida – relato de caso. *Clínica Veterinária*, n. 105, jun/ag. p.58-62. Ano XVIII, 2013.

ROCHA, N.S. Exame Citológico no Diagnóstico de Lesões da Pele e Subcutâneo. *Clínica Veterinária*, n.76, p.76-80, 2008.

ROFAGHA, S. K.; SHECKET, M. V. Diagnostic Value, Feasibility, and Validity of Preparing Cell Blocks from Fluid-Based Gynecologic Cytology Specimens Câncer. *Cancer Cytopathology*, n. 96, p. 204–209. 2002.

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

SANCHEZ, N.; SELVAGGI, S.M. Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates diagnostic. *Cytopathology*, v.34, n.2, p. 89-92, 2006

SELVARAJAH, G.T.; KIRPENSTEIJN, J. Prognostic and predictive biomarkers of canine OSA. *The Veterinary Journal*. v.185, p.28–35, 2010.

SCHMITT, Fernando; BARROCA, Helena. Role of ancillary studies in fine-needle aspiration from selected tumors. *Cancer cytopathology*, v. 120, n. 3, p. 145-160, 2012.

SILVEIRA, P. R. Estudo retrospectivo de OSA apendicular em cães, no período de janeiro de 2001 à janeiro de 2004. Estudo. (*Dissertação – Mestrado*). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal; 2005.

SHIVAKUMARSWAMY, Udasimath et al. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *Journal of Cytology*, v. 29, n. 1, p. 11, 2012.

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.

THRALL, M.A. Cytologic examination of cutaneous and subcutaneous lumps and lesions – Cytologic examination is a quick way to make a preliminary diagnosis, which can be crucial when you're dealing with tumors. The author helps you examine cutaneous and subcutaneous lesion samples. *Veterinary Medicine*, v.3, p.224-42, 2000.

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

VARSEGI, George M.; SHIDHAM, Vinod. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 29, p. e1316-e1316, 2009.

VINAYAKAMURTHY, S; MANOLI, N; SHIVAJIRAO, P; MANJUNATH; JOTHADY, S. Role of Cell Block in Guided FNAC of Abdominal Masses. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016 Mar, Vol-10(3): EC01-EC05

ZANONI, Diogo Sousa; KLEEB, Silvia Regina; XAVIER, José Guilherme. Emprego do cell block de agarose como método complementar no diagnóstico citológico de tumores mamários caninos. *Ciência Rural*, v. 43, n. 3, p. 489-495, 2013.

ZITO, F.A.; GADALETA, C.D.; SALVATORE, C. *et al.* A modified cell block technique for fine needle aspiration cytology. *Acta Cytolog.*, v.39, p.93-99, 1995

ANEXOS

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa **"Sensibilidade da citoinclusão para o diagnóstico de osteossarcoma em cães"** Protocolo nº 48/2015 - CEUA, da Professora Noeme Sousa Rocha, a ser conduzido por **Stephane Cassia Oliveira Rosa Vexenat**, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 12 de junho de 2015.


Profª.Ass.Dra. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

OPEN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

Normas para envio do artigo: <http://www.scirp.org/journal/ojvm/>