

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 12/12/2018.

**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.

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. 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
- 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 Citologico 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