

MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DO OSTEOSSARCOMA

Bárbara Meireles¹ & Beatriz Goldschmidt¹

RESUMO

1. Departamento de primatologia, Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, Rio de Janeiro.

Data Recebimento: 23/06/2015
Aceito para a publicação: 01/10/2015

Autor para correspondência:
Bárbara Meireles
E-mail: barbaremeireles90@hotmail.com

Os osteossarcomas são tumores ósseos malignos, com padrões histológicos diversificados e etiologia desconhecida. O diagnóstico pode ser baseado na história clínica, exame físico, exames de imagem e confirmado por histopatologia. A remoção cirúrgica é essencial, devendo ser complementado por quimioterapia e/ou radioterapia. Entre os modelos animais, o cão é o que possui apresentação clínica, biológica, complicações e resultados com maior semelhança ao osteossarcoma humano. Outras espécies animais menos acometidas, também têm sido usadas como modelo para aprofundar os conhecimentos sobre o desenvolvimento e tratamento destes tumores. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão sobre o assunto, estabelecendo um paralelo entre os modelos animais acometidos por esta neoplasia, descrevendo as abordagens clínicas e evolução nos protocolos de tratamentos.

Palavras-chave: Osteossarcoma. Neoplasia. Modelos animais.

1. INTRODUÇÃO

A neoplasia é uma proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro. De acordo com o comportamento biológico, as neoplasias podem ser agrupadas em benignas ou malignas e sua classificação considera a origem embrionária do tecido de que deriva o tumor¹. O osteossarcoma é o tumor ósseo maligno primário mais comum. Demonstra um comportamento agressivo tanto localmente, quanto sistemicamente, devido ao desenvolvimento de metástases².

Os tumores ósseos primários são frequentemente observados em pequenos animais³, tendo sido bastante estudados em cães⁴. Existem também relatos em outras espécies, como primatas não humanos^{5,6,7}, roedores^{8,9}, coelho¹⁰, gatos^{11,12}, aves^{13,14,15} e répteis¹⁶.

As características clínico-patológicas deste tumor no cão se assemelham ao humano, tornando-o

um inestimável modelo comparativo¹⁷. Tem sido observado que em cães e gatos os machos apresentam maior risco de desenvolver a doença do que as fêmeas^{18,19}. Entretanto, em um levantamento de 52 casos de osteossarcoma apendicular em cães atendidos na Universidade de São Paulo no período de 1990 à 2001, foi relatado um maior acometimento de fêmeas adultas sendo os pulmões o local com maior incidência de metástases²⁰. Por outro lado, no esqueleto axial tem sido relatado mais casos em fêmeas do que machos^{21,22}.

A utilização de modelos animais para o câncer humano tem evoluído na tentativa de estudar a biologia do tumor e desenvolver novas abordagens para o tratamento. Enquanto os roedores se destacam como o grupo de animais mais utilizado, há um crescente emprego do uso de cães, por apresentarem êxito nas pesquisas comparativas de determinados tipos de câncer humano, tais como o osteossarcoma^{23,24}. A breve gestação dos roedores faz com que o estudo em diversas gerações seja relativamente rápido e barato em comparação com outros mamíferos. Uma das características

limitantes é a ocorrência espontânea dos tumores em seres humanos e a necessidade de indução nos modelos de ratos e camundongos²⁵. Dos modelos animais, o cão é o que possui apresentação com maior semelhança ao osteossarcoma humano. Além da histologia do tumor primário e o padrão de propagação de metástases, existe analogia na capacidade de resposta a drogas, tais como a cisplatina e as antraciclinas. Isto faz do cão um modelo para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento do osteossarcoma, levando instituições individuais e estudos multicêntricos a desenvolverem os ensaios clínicos com osteossarcoma preferencialmente nesta espécie^{24,26}.

Etiologia

A etiologia desse tipo de neoplasia se mantém desconhecida²⁷, pois a genômica estrutural e a variedade de rearranjos cromossômicos nas células cancerosas impedem a associação com o exato desenvolvimento do tumor, sendo o osteossarcoma caracterizado por uma extensa e heterogênea complexidade genética²⁸. Modificações genéticas e hormonais são listadas como possíveis causas desse tipo de neoplasia. Alteração em genes supressores de tumores, como retinoblastoma e p53 são relacionadas a muitos casos de osteossarcoma. O gene p53 codifica uma fosfoproteína nuclear que atua como um supressor de tumor²⁹, promovendo a reparação do DNA ou a indução da morte celular programada (apoptose) em caso de danos genéticos expressivos^{30,31}. A ausência do gene p53 funcional pode impedir mecanismos que detenham a proliferação de células defeituosas. Alterações no gene p53 foram relatadas em tumores caninos, incluindo o osteossarcoma. Hormônio do crescimento (Gh) possui efeito estimulante para o crescimento de linhagens de células de osteossarcomas humanos e canino³². Foi sugerido que a associação do tumor com a área metafisária provoque alteração do crescimento ósseo resultando na transformação neoplásica³³. De ocorrência menos comum no esqueleto axial, o tumor se desenvolve principalmente em ossos longos, sendo conhecido

como osteossarcoma apendicular^{34,35}. Acomete mais frequentemente o úmero, rádio, ulna, tibia, fêmur²⁸ tendo sido descrito também em crânio e esqueleto axial. Os membros torácicos são mais acometidos que os pélvicos^{36,37}. No cão, o tipo extra-esquelético constitui 1% de todos os casos³⁸. Um osteossarcoma primário de origem testicular foi descrito em cão criptorquida³⁹. Diversas causas são consideradas como fatores que contribuam para o seu aparecimento. Essas causas incluem: radiações ionizantes, produtos químicos, corpos estranhos (implantes metálicos e ósseos), viroses, transformações de tumores benignos em malignos, entre outros⁴⁰. A reparação de fraturas com a utilização de pinos em gatos foi também relacionado ao desenvolvimento de osteossarcomas^{41, 42}.

Classificação

Quando o osteossarcoma apresenta etiologia desconhecida, é classificado como primário. Em algumas situações pode estar relacionado a fatores predisponentes, tais como na doença de Paget, displasia fibrosa, exposição externa à radiação ionizante ou ingestão de substâncias radioativas, sendo denominados então osteossarcomas secundários⁴³. Histopatologicamente, o osteossarcoma é um tumor heterogêneo⁴⁴, podendo ser classificado com base em sua celularidade, pleomorfismo nuclear e grau de atividade mitótica. Podem ser subdivididos em osteoblásticos, condroblásticos, fibroblásticos e telangiectásicos^{45,20}. Formas de células gigantes também podem ocorrer⁴⁶, sendo estas multinucleadas pela fusão de macrófagos. No tipo osteoblástico predomina a produção de traves osteóides mineralizadas, circundadas por osteoblastos atípicos. No condroblástico prevalece tecido cartilaginoso com matriz hialina ou aspecto mixóide, com osteogênese escassa. No fibroblástico sobressaem células fusiformes, fibroblastos atípicos, com escasso osteóide e no telangiectásico predominam capilares ou lacunas sanguíneas irregulares, com traves osteóides neoplásicas. O indiferenciado é caracterizado por pequenas células indiferen-

ciadas com raras traves osteóides⁴⁷. De acordo com o sistema de Broder, o nível numérico (1 a 4) indica o grau de malignidade, sendo 4 o grau mais grave⁴³.

Quanto à origem os osteossarcomas podem ser classificados como centrais, periosteais, justacorticais ou extra-esqueléticos^{48,49}.

Sinais Clínicos

Os sinais clínicos geralmente são de rápida evolução e são percebidos facilmente⁵⁰. Os sinais clínicos primários mais freqüentes em cães e gatos com osteossarcoma do esqueleto apendicular são dor e claudicação, levando a limitação do movimento^{51,52}. Atrofia muscular, perda de peso e fraturas também podem estar presentes⁵³.

Diagnóstico

O exame radiográfico é um método bastante utilizado para diagnóstico das patologias ósseas, sendo útil para avaliar a extensão do comprometimento ósseo e estabelecer distinção entre as neoplasias ósseas e outras afecções de características não neoplásicas^{50,52,53}. Entretanto, o método definitivo de diagnóstico é a biópsia seguida de exames histopatológicos, onde haverá a classificação, o reconhecimento do tipo de tumor e o planejamento do tratamento^{40,53}. A ultrassonografia proporciona maiores informações acerca da arquitetura óssea. A Tomografia Computadorizada permite a excelente discriminação dos contrastes entre diferentes tipos de tecidos. A densidade física do tumor pode ser comparada com os tecidos normais, proporcionando informações de abrangência ou grau de invasibilidade. As imagens obtidas por ressonância magnética caracterizam-se pela capacidade de contraste ainda superior à tomografia computadorizada⁵⁴. A cintilografia também é um método eficiente e altamente sensível para a detecção das lesões ósseas, no que se refere à precocidade das informações obtidas⁵⁵. Este método pode preceder em até 6 meses a detecção

destas lesões em relação à radiologia e é eficiente para a avaliação de metástases ósseas⁴⁵.

O diagnóstico diferencial do osteossarcoma deve ser realizado para descartar outros tumores ósseos primários, tumores metastáticos, miosites, osteomielites bacterianas e micoses sistêmicas^{47,56}.

Metástases

Os osteossarcomas são potencialmente metastáticos, e as metástases ocorrem precocemente. O órgão preferencialmente afetado é o pulmão^{36,57} embora já tenham sido diagnosticadas metástases no fígado, rim, tecido ósseo, baço, miocárdio, gânglios linfáticos, diafragma, mediastino, medula, intestinos^{58,59} e derme⁵⁷.

Somente em 10% dos casos em cães fica evidente a presença de metástase pulmonar no curso inicial da doença^{18,52,53}. Quando o osteossarcoma se encontra no esqueleto axial (mais especificamente mandibular e maxilar) o potencial metastático parece ser menor do que nos casos de osteossarcoma apendicular⁶⁰.

Tratamento

Por possuir um elevado índice metastático, o tratamento convencional do osteossarcoma inclui opções como a combinação de ressecção cirúrgica e quimioterapia⁶¹. No esqueleto apendicular envolve a amputação do membro ou ressecção do tumor combinado com a cirurgia poupadora de membro, quimioterapia e radioterapia^{62,63}.

A quimioterapia é utilizada para diminuir a incidência das metástases. A resposta de cada animal ao tratamento quimioterápico é variável^{57,62}. Quando administrado no pré-operatório, a quimioterapia e/ou radioterapia é de grande benefício atuando na redução da dimensão do tumor primário levando a menor extensão do procedimento cirúrgico e melhores possibilidades de preservação da função do membro⁶⁴. Os principais compostos quimioterápicos utilizados em cães são a cispla-

tina (50-70 mg/m²), associada a doxorubicina (30 mg/m²) e/ou carboplatina (300 mg/m²) via intravenosa. Cisplatina, associada ou não com doxorubicina, é aplicada a cada duas semanas, num total de 4 a 6 aplicações e a carboplatina associada à Cisplatina e Doxorubicina deve ser aplicada a cada três semanas^{64, 51}.

Mesmo se a cura total não puder ser alcançada, existem outros benefícios adquiridos pelo uso do quimioterápico, como controlar afecções generalizadas e rapidamente progressivas, não tratáveis pela cirurgia ou radioterapia; reduzindo a disseminação de metástases beneficiando os pacientes ao proporcionar alívio sintomático^{65,66}.

Relata-se o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, opióides e gabapentina visando à analgesia como um dos principais tratamentos paliativos em animais acometidos⁶⁷.

Novos tratamentos têm sido propostos utilizando modelos animais, entre eles, a caracterização de um subconjunto distinto das células dendríticas do baço de ratos, CD4, que induz uma rápida morte celular. Estes *killer* CD4 utilizados para produção de vacinas podem se ligar diretamente a imunidade inata e combater o osteossarcoma nos ratos⁶⁸. Uma outra forma de tratamento estudada, usando ratos como modelo, utilizou células de osteossarcoma contendo o gene B7-1 (um gene que expressa imunoglobulinas de superfície) para produção de uma vacina, que em combinação com o quimioterápico metotrexato reduziu o número de focos metastáticos pulmonares. A vacina B7-1 pode reduzir a dose necessária de agentes quimioterapêuticos e assim evitar os efeitos colaterais e atraso no início da quimioterapia. Os ratos que receberam a terapia combinada inclusive se mostraram livres de tumores residuais⁶⁹.

Os compostos cumarínicos Psoralen e Isopsoralen (da medicina tradicional chinesa) quando obtidos por técnicas cromatográficas e de purificação apresentaram efeito inibitório do crescimento de osteossarcoma em ratos, induzindo a apoptose de células tumorais e diminuindo as reações adversas⁷⁰. O agente O-(cloroetil-carbamoil) fumaçilol (AGM-1470), demonstrou eficiência contra o crescimento do tumor primário e de metástase

pulmonar em ratos, utilizando como modelo uma linha de osteossarcoma com um alto potencial metastático⁷¹.

Prognóstico

Valores elevados de fosfatase alcalina sérica podem ser associados com um prognóstico desfavorável em cães com osteossarcoma⁵³. Animais com os níveis normais de fosfatase alcalina óssea e total antes do tratamento possuem uma taxa de sobrevida maior do que os animais que possuem essa taxa elevada⁷². Nos casos em que esses valores continuam elevados após 40 dias da remoção cirúrgica da lesão primária, existe uma elevada chance de desenvolvimento de metástases. A presença de metástase detectada no momento do diagnóstico do osteossarcoma é um fator de prognóstico desfavorável sendo o tratamento menos efetivo⁵⁸. Quando localizados na porção proximal do úmero ou em cães com peso superior a 40Kg é associado a menor taxa de sobrevida⁷³. O peso, a idade e a localização do tumor são fatores considerados relevantes para análise de metástases e índices de mortalidade associados ao osteossarcoma⁷⁴. O osteossarcoma apendicular de origem periosteal é considerado de alto grau de malignidade, mais invasivo e potencialmente metastático, diferindo em prognóstico daqueles com origem medular⁷⁵.

Ponto de vista: a importância dos animais de laboratório

O osteossarcoma é um tumor maligno ósseo primário com uma elevada incidência em crianças e adolescentes⁷⁶. Vários aspectos na busca de uma melhor abordagem clínica do osteossarcoma vêm ao encontro da necessidade de diminuir a incidência das metástases, aumentar o tempo de sobrevida e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes. Torna-se essencial, também, a ação multidisciplinar envolvendo clínicos, anatomopatologistas, radiologistas e cirurgiões, trabalhando

em conjunto para a obtenção de melhores resultados quanto ao diagnóstico, prognóstico e tratamento do osteossarcoma. Como o osteossarcoma é uma patologia com prognóstico desfavorável,

modelos animais utilizados para este estudo tem sido uma alternativa útil para aprofundar os conhecimentos sobre a neoplasia e desenvolver técnicas mais aperfeiçoadas de tratamento.

ANIMALS MODELS IN OSTEOSARCOMA STUDY

Osteosarcomas are malignant bone tumors with diverse histological patterns and unknown etiology. Diagnosis is based on clinical history, physical examination, imaging tests and confirmed by histopathology. Surgical removal is essential and must be supplemented by chemotherapy and / or radiotherapy. Among animal models, the dog is one with clinical presentation, biological, complications and results more similar to human osteosarcoma. Other animal species least affected, have also been used as a model to increase knowledge about development and treatment of these tumors. Aim of this study is to review this issue, drawing a parallel between animal models affected by this neoplasia, describing the clinical approaches and developments in treatment protocols.

Key Words: Osteosarcoma. Neoplasia. Animal models.

RESUMO

1. Kumar RV, Rao CR, Hazarika D, Mukherjee G, Gowda BM. Aspiration biopsy cytology of primary bone lesions. *Acta Cytol.* 1993; 37 (1): 83-89.
2. Vanel M, Blond L, Vanel V. Imaging of primary bone tumors in veterinary medicine: Which differences? *Eur J Radiol.* 2013; 82(12): 2129-2139.
3. Endicott M. Principles of treatment for osteosarcoma. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 2003; 18(2): 110-114.
4. Coyle VJ, Rassnick, KM., Borst, LB, et al. Biological behaviour of canine mandibular osteosarcoma. A retrospective study of 50 cases (1999-2007). *Vet Comp Onco.* 2015; 13(2):89-97.
5. Russell SW, Jenson FC, Vanderlip JE, Alexander NL. Osteosarcoma of the mandible of baboon (*Papio papio*): Morphological and viralogical (oncornavirus) studies, with a review of neoplasms previously described in baboons. *J. Comp. Path.* 1979;89(3): 349-360.
6. Yasuda H, Taniguchi Y, Shigeta Y. Peripheral neuropathy associated with osteosarcoma in a Japanese Monkey. *Exp. Anim.* 1990; 39(2), 285-289.
7. Beam SL. Combined-type Osteosarcoma in a Rhesus Macaque. *Vet Pathol.* 2005;42 (3): 374-377.
8. Trotte MNS, Menezes RC, Tortelly R. Neoplasias espontâneas em ratos Wistar de um centro de criação de animais de laboratório do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cienc. Rural.* 2008; 38 (9): 2549-2551.
9. Johnson JG, Kim K, Serio J, Paulsen D, Rademacher N, Pirie G. Mandibular osteosarcoma in a nutria (*myocastor coypus*). *J Zoo Wildl Med.* 2014; 45(3): 723-726.
10. Renfrew H, Rest JR, Holden AR. Extraskelatal fibroblastic osteosarcomain a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Small Anim.* 2001; 42: 456-458.
11. Neto JMC, Estrela-Lima AS, Ribeiro LGR, Carneiro RS, Martins Filho EF, Moraes VJ, et al. Osteossarcoma mandibular em gato: relato de Caso. *Med Vet.* 2011; 5 (4): 26-33.
12. Dimopoulou M, Kirpensteijn J, Moens H, Kik M. Histologic Prognosticators in Feline Osteosarcoma: A Comparison with Phenotypically Similar Canine Osteosarcoma. *Vet Surg.* 2008; 37 (5): 466-471.
13. S Lamb, D Reavill, J Wojcieszyn, N Sitinas. Osteosarcoma of the Tibiotarsus With Possible Pulmonary Metastasis in a Ringnecked Dove (*Streptopelia risoria*). *J Avian Med Surg.* 2014; 28(1):50-56.
14. Fordham M, Rosenthal K, Durham A, Duda L, Komáromy AM. Intraocular osteosarcoma in an

REFERÊNCIAS

- Umbrella Cockatoo (*Cacatua alba*). *Vet Ophthalmol.* 2010; 13 (1): 103-108.
15. Churgin SM, Steinberg H, Ravi M, Hartup BK. Sternal osteosarcoma in a blue crane (*Anthropoides paradiseus*). *J Zoo Wildl Med.* 2013; 44(4): 1075-1078.
16. Garner MM, Hernandez-Divers SM, Raymond JT. Reptile neoplasia: a retrospective study of case submissions to a specialty diagnostic service. *Vet Clin Exot Anim.* 2004; 7(3): 653-671.
17. Brodey RS. The Use of Naturally Occurring Cancer in Domestic Animals for Research into Human Cancer: General Considerations and a Review of Canine Skeletal Osteosarcoma. *Yale J Biol Med.* 1979; 52: 345-361.
18. Heldmann E, Anderson MA, Wagner-Mann C. Feline osteosarcoma: 145 cases (1990-1995). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;36 (6): 518-521.
19. Northrup NC, Selting KA, Rassnick KM, Kristal O, O'Brien MG, Dank G, et al. Outcomes of cats with oral tumors treated with mandibulectomy: 42 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2006;42(5): 350-360.
20. Cavalcanti JN, Amstalden EMI, Guerra JL, Magna LC. Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2004; 41(5): 299-305.
21. Heyman S.J., Diefenderfer D.L., Goldschmidt M.H. & Newton C.D. Canine axial skeletal osteosarcoma: a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Vet Surg.* 1992; 21(4): 304-310.
22. Daleck C.R., Canola J.C., Stefanos S.A., Schocken P.F.L. & De Nardi A.B. Estudo retrospectivo de osteosarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2006; 43(1): 125-131.
23. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med.* 2011;17(3): 380-388.
24. Langdon SP. Animal Modeling of Cancer Pathology and Studying Tumor Response to Therapy. *Curr Drug Targets.* 2012; 13(12):1535-1547.
25. Osborne TS, Khanna CA. Review of the Association between Osteosarcoma Metastasis and Protein Translation. *J Comp Pathol.* 2012; 146 (2-3): 132-142.
26. Stein TJ, Holmes KE, Muthuswamy A, Thompson V, Huelsmeyer MK. Characterization of β -catenin expression in canine osteosarcoma. *Vet Comp Oncol.* 2011; 9 (1): 65-73.
27. Mendonca FS, Doria RGS, Freitas SH, Pires MAM, Camargo LM, Evencio Neto J. Osteosarcoma vertebral em cão - relato de caso. *Clínica Veterinária.* 2008; 76: 48-52.
28. Sadikovic B, Yoshimoto M, Al-Romaih K, Maire G, Zielenska M, Squire JA. "In vitro analysis of integrated global high-resolution DNA methylation profiling with genomic imbalance and gene expression in osteosarcoma. *Plos One.* 2008; 3(7): e2834.
29. Carson DA, Lois A. Cancer progression and p53. *Lancet.* 1995;346 (8981):1009-1011.
30. Furihata M, Sonobe H, Ohtsuki Y. The aberrant p53 protein (Review). *Int J Oncol.* 1995; 6 (6):1209-1226.
31. Luo J, Su F, Chen D. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 2000;408 (6810):377-381.
32. Bersano PRO. Expressão imunoistoquímica da ciclooxigenase-2 (Cox2) e quantificação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do osteosarcoma canino. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 2006; 98.
33. Daleck CR, Fonseca CS, Canola JC. Osteosarcoma canino. *Rev. Educ. Contin.* 2002; 5:233-242.
34. Berg J, Lamb CR, O'Callaghan MW. Bone scintigraphy in the initial evaluation of dogs with primary bone tumors. *J Am Vet Assoc.* 1990;196(6):917-20.
35. Spodnick GJ, Berg J, Rand WM. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1992;200 (7): 995-999.
36. Mauldin GN, Matus RE, Withrow SJ. Canine osteosarcoma: treatment by amputation versus amputation and adjuvant chemotherapy using doxorubicin and cisplatin. *J. Vet. Intern. Med.* 1988; 2(4): 177-180.
37. Withrow SJ, Powers BE, Straw RC. Comparative aspects of osteosarcoma: Dog versus man. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 270: 159-168.
38. Stimson EL. Extraskelatal osteosarcoma in the duodenum of cat. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2000; 36 (4): 332-336.
39. Araújo ACP, Gaiga LH, Seitz AL, Dreimeier D. Osteosarcoma extra-esquelético primário testicular em cão criptorquida. *Acta Sci Vet.* 2006; 34(2): 197-200.
40. Daleck CR. Osteosarcoma canino. *Clin Vet.* 1996; 1(5): 26-27.
41. Fry PD, Jukes HF. Fracture associated sarcoma in the cat. *J Small Anim Pract.* 1995;36(3):124-126.
42. Kessler M, Tassani-prell M. Osteosarcoma in cats: epidemiological, clinical and radiological findings in 78 animals. *Tierarztl Prax.* 1997; 25(3):275-283.
43. Greenspan A. radiologia ortopédica: uma abordagem prática (4º ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006; 1017.
44. Pimenta VSC, Brito GS, Silva DR, Braga KMS, Prado YCL.

- Classificação histopatológica dos subtipos do osteossarcoma canino central. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*. 2013; 9(17): 270-208.
45. Straw RC, Powers BE, Klausner J, Henderson RA, Morrison WB, Mccaw DL, et al. Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). *J AmAnimHosp Assoc*. 1996; v32 (3): 257-262.
46. Negrin A, Bernardini M, Diana A, Castagnaro M. Giant cell osteosarcoma in the Calvarium of a cat. *Vet. Pathol*. 2006; v43(2): 179-182.
47. Thompson KG, Pool RR. Tumors of bones. In: Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. EUA: Iowa State Press. 2002; 245-317 p.
48. Woodard JC. Sistema esquelético. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia Veterinária*. 6 ed. Barueri: Manole, 1997; 913-961 p.
49. Rayman AK, Ayala AG, Knuuti LA. Conventional osteosarcoma. In: Fletcher CFM, Unni KK, Martens F. *WHO classification of tumours - tumours of soft tissues and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. 264- 285 p.
50. Kleiner JA, Silva LEG. Bone tumors affecting small animals. *Rev. Cient. Med. Vet*. 2003; 1(3):193-200.
51. Liu S, Dorfman HD, Patnaik AK. Primary and secondary bone tumors in the cat. *J Small Anim Pract*. 1974; 15(3):141-156.
52. Ling GV, Morgan JP, Pool RR. Primary bone tumors in the dog: a combined clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. *J AmVetMed Assoc*. 1974; 165(1): 55-67.
53. Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Vet. Pathol*. 2002; 39(2):240-246.
54. Morrison WB, Vonderhaar MA, Richardson RC. Biologia da Moléstia Neoplásica. In: SLATTER. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 2ª ed. Vol. 2. São Paulo: Manole 1998; 649-650 p.
55. Powers JM, Cost C, Cederberg K, Leonard D, Leavey PJ. Bone Scintigraphy in Osteosarcoma: A Single Institution Experience. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014; 36(8):543-545.
56. Baer AV, Ehrhardt A, Baumhoer D, Mayer-Steinacker R, Schultheiss M, Abdul-Nou T, et al. Immunohistochemical and FISH analysis of MDM2 and CDK4 in a dedifferentiated extraskeletal osteosarcoma arising in the vastus lateralis muscle: Differential diagnosis and diagnostic algorithm. *Pathol. Res. Pract*. 2014; 210(10): 698-703.
57. Costa FS, Tostes RA., Farias MR, Sampaio RL, Perez JA. Metástase cutânea de osteossarcoma em um cão: relato de caso. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2001; 38(5): 240-242.
58. Spodnick GJ, Berg J, Rand WM. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1992; 200(7): 995-999.
59. Aguado E, Goyenvalle E, Guintard C. A case of polyostotic osteosarcoma with kidney metastases in a dog: Histopathology and microcomputed tomographic analysis. Un cas d'ostéosarcome polyostotique avec métastases rénales chez le chien: analyse histopathologique et *étude* en microtomographie X. *Morphologie*. 2014. 98: 187 - 192.
60. Heyman SJ. Canine axial skeletal osteosarcoma: a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Veterinary Surgery*. 1992; 21(4): 304-310.
61. Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, Lorimier LP, Fan T, et al. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Vet. Pathol*. 2005; 42: 161-165.
62. McNeill CJ, Overley B, Shofer FS, Kent MS, Clifford CA, Samluk M, et al. Characterization of the biological behavior of appendicular osteosarcoma in Rottweilers and a comparison with others breeds: a review of 258 dogs. *Vet Comp Oncol*. 2007; 5(2): 90-98.
63. Wolfe TD, Pillai SPS, Hildreth III BE, Lanigan LG, Martin CK, Werbeck JL, et al. Effect of zoledronic acid and amputation on bone invasion and lung metastasis of canine osteosarcoma in nude mice. *Clin. Exp. Metastasis*. 2011; 28(4): 377-389.
64. Rosenthal RC. Quimioterapia. In: Slatter D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 2ª ed. Vol. 2. São Paulo: Manole. 1998; 2437-2446p.
65. Farrelly J, McEntee MC. Principles and applications of radiation therapy. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2003; 18(2): 82-87.
66. Chun R, Garrett LD, Henry C, Wall M, Smith A, Azene NM. Toxicity and efficacy of cisplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of canine osteosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2005; 41(6): 382-387.
67. Mayer MN, Grier CK. Palliative radiation therapy for canine osteosarcoma. *Canadian Veterinary Journal*. 2006; 47(7): 707-709.
68. Chauvin C, Philippeau JM, Hé'mont C, Hubert FX, Wittrant Y, Lamoureux F, et al. Killer Dendritic Cells Link Innate and Adaptive Immunity against Established Osteosarcoma in Rats. *Cancer Res*. 2008; 68(22): 9433-9440.
69. Hayakawa M, Kawaguchi S, Ishii S, Murakami M, Uede T. B7-1-transfected tumor vaccine counteracts chemotherapy-induced immunosuppression and prolongs the survival of rats bearing highly metastatic osteosarcoma cells. *Int J Cancer*. 1997; 71(6):1091-1102.
70. Lu H, Zhang L, Liu D, Tang P, Song F. Isolation and purification of psoralen and isopsoralen and their efficacy and safety in the treatment of

osteosarcoma in nude rats. *Afr Health Sci.* 2014; 14(3): 641-647.

71. Morishita T, Mii Y, Miyauchi Y, Miura S, Honoki K, Aoki M, et al. .Efficacy of the Angiogenesis Inhibitor *O*-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (AGM-1470) on Osteosarcoma Growth and Lung Metastasis in Rats. *Jpn J Clin Oncol.* 1995; 25(2):25-31.

72. Sternberg RA, Pondenis HC, Yang X, Mitchell MA, O'brien RT, Garrett LD, et al. Association between Absolute Tumor Burden

and Serum Bone-Specific Alkaline Phosphatase in Canine Appendicular Osteosarcoma. *J Vet Intern Med.* 2013; 27(4): 955-963.

73. Bergman PJ. Clinical Techniques in Small Animal Molecular Oncology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice.* 2003; 18(2): 88-91.

74. Schmidt AF, Nielen M, Klungel OH, Hoes AW, de Boer A, Groenwold RHH, Kirpensteijnd J. Prognostic factors of early metastasis and mortality in dogs with appendicular osteosarcoma after receiving surgery:

An individual patient data meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine.* 2013; 112(3-4): 414-422.

75. Dernell WS; StrawRC, Withrow, SJ. Tumors of the skeletal system. In: MacEwen, E. *Small animal clinical oncology*, 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders.2001; 378-417p.

76. Martin JW, Squire JA, Zielenska M. A Genética do osteossarcoma. *Sarcoma.* 2012; 12: 11. Article ID 627254. doi:10.1155/2012/627254.