

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**OSTEOSSARCOMA EM CÃES: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA  
E AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS E DE  
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**TAINÃ NORMANTON GUIM**

**PORTO ALEGRE**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**OSTEOSSARCOMA EM CÃES: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA  
E AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS E DE  
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**Autor:** Tainã Normanton Guim

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Patologia.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

CIP - Catalogação na Publicação

Normanton Guim, Tainã  
Osteossarcoma em cães: caracterização  
clínico-patológica e avaliação de fatores prognósticos  
histopatológicos e de imuno-histoquímica / Tainã  
Normanton Guim. -- 2019.  
59 f.  
Orientadora: Luciana Sonne.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. Oncologia. 2. Tumores ósseos. 3. Osteopontina.  
4. Fator prognóstico. I. Sonne, Luciana, orient. II.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

TAINÃ NORMANTON GUIM

**OSTEOSSARCOMA EM CÃES: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA  
E AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS E DE  
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**Aprovado em 27 de março de 2019.**

APROVADA POR:

---

Prof. Dra. Luciana Sonne  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof. Dra. Cristina Gevehr Fernandes  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini  
Membro da Comissão

---

Dra. Aline Silva Gouvea  
Membro da Comissão

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente:

À minha filha *Helena*

Ao meu marido *Bernardo*

Aos meus pais *Pedro e Alexandra*

Aos meus irmãos *Thomas e Thaís*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me guiar e conceder saúde para alcançar meus objetivos.

À minha querida filha Helena por tornar meus dias mais felizes.

Ao meu marido Bernardo pelo incentivo, companheirismo, paciência e amor.

Aos meus pais Pedro e Alexandra pelo cuidado, dedicação e incentivo aos estudos.

Aos meus irmãos Thomas e Thaís pelo apoio e amizade.

À minha orientadora Luciana Sonne pela oportunidade, aprendizado e auxílio neste trabalho. Aos professores Saulo e David por todo ensinamento e disponibilidade em ajudar.

Aos estagiários, residentes, mestrandos, doutorandos, pós-doutorados e funcionários do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, pela convivência, amizade e disponibilidade em ajudar.

Agradecimento em especial aos amigos e colegas Cíntia de Lorenzo, Matheus Bianchi, Lauren Mello, Welden Panziera, Bianca Cecco, Susy Hermes, Cláudio Laisse, Marcele Bettim Bandinelli, Bárbara Krebs, Camila da Rosa Vieira, Luan Henker, Aline Gouvea, Bernardo Schmitt e Thomas Guim pela colaboração no projeto e auxílio na confecção da tese.

Ao Hospital de Clínica Veterinária (HCV) e ao Núcleo de Apoio Estatístico (NAE) da UFRGS, em especial a professora Jandyra e ao técnico Gilberto, por toda a colaboração neste trabalho.

A Universidade Federal do Pampa pelo incentivo a capacitação.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar um ensino público, gratuito e de qualidade.

## RESUMO

Neoplasias em animais domésticos são afecções crescentes em medicina veterinária, especialmente devido ao aumento da longevidade destes animais e aos melhores métodos de diagnóstico. Em cães, os tumores ósseos são relativamente comuns e o osteossarcoma, representa 85% das neoplasias ósseas diagnosticadas nesta espécie. Este trabalho teve como objetivo descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos do osteossarcoma canino de 2006 a 2018 e avaliar fatores prognósticos associados ao neoplasma. Os materiais e métodos aplicados e resultados obtidos foram apresentados em dois artigos científicos. O primeiro artigo descreve os aspectos epidemiológicos e patológicos de 36 casos de osteossarcoma extraesquelético em cães. No período analisado, 2006 a 2016, o osteossarcoma acometeu os tecidos moles em 16,7% dos casos. As fêmeas, com média de 10,4 anos de idade e peso médio de 19,5 kg foram mais acometidas. Não houve predisposição racial. Os principais locais foram: glândula mamária (80,6%), tecido subcutâneo (5,6%) e fígado (5,6%). Na histologia, os osteossarcomas osteoblásticos (61,1%) de grau II e III foram os mais frequentes. Metástases nodais ocorreram em 21,4% dos casos na mama. Metástases distantes ocorreram nos pulmões (57,1%), fígado (14,3%), baço (14,3%) e em múltiplos sítios (14,3%). Metástases pulmonares foram mais frequentes em cadelas com osteossarcoma de glândula mamária. O segundo artigo descreve os aspectos clínico-patológicos de 153 casos de osteossarcoma apendicular em cães, dos quais os dados de sobrevida de 22 caninos submetidos a intervenções cirúrgicas e à quimioterapia foram confrontados estatisticamente com os dados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos para correlação prognóstica. No período analisado, 2008 a 2018, o osteossarcoma acometeu o tecido ósseo em 83% dos casos e deste, 82% envolviam o esqueleto apendicular. A média de idade foi de nove anos e o peso médio de 33,4 kg. Não houve predileção sexual. A raça pura mais acometida foi o Rottweiler (42%). Os principais locais acometidos foram: úmero proximal (95%), fêmur distal (70%), rádio distal (96%) e tibia proximal (56%). Na histologia, o subtipo osteoblástico foi o mais frequente (57%). Metástases nodais ocorreram em 14% dos casos. Metástases distantes ocorreram em 75% dos casos, nos quais o pulmão (43%) foi o principal órgão acometido. Quanto à análise de fatores prognósticos, o peso, idade, sexo, membro e osso afetado, classificação histológica, contagem mitótica e grau histológico não influenciaram na sobrevida ( $p > 0,05$ ). Neoplasmas na extremidade proximal dos membros tiveram uma tendência a um pior prognóstico ( $p=0,06$ ). Para estes casos, a taxa de sobrevida em um ano foi de 14,3%, enquanto que na extremidade distal a taxa foi de 46,7%. Não houve diferença significativa em relação à sobrevida quando utilizadas as técnicas de amputação ou preservação do membro, desde que associadas à quimioterapia ( $p=0,20$ ). A sobrevida para estes casos variou de 73 a 1185 dias e a média foi de 394 dias. Todos os casos apresentaram marcação citoplasmática para osteopontina, porém a intensidade e o percentual de células neoplásicas marcadas não influenciaram na sobrevida ( $p > 0,05$ ). Em 80% dos casos com metástases deste estudo houve marcação acentuada para osteopontina.

**Palavras-chave:** oncologia, tumores ósseos, osteopontina, fator prognóstico.

## ABSTRACT

Neoplasms in domestic animals are increasing in veterinary medicine, especially due to the increased longevity of these animals and the best diagnostic methods. In dogs, bone tumors are relatively common and osteosarcoma accounts for 85% of the bone neoplasms diagnosed in this species. The objective of this study was to describe the epidemiological, clinical and pathological aspects of canine osteosarcoma from 2006 to 2018 and to evaluate prognostic factors associated with neoplasm. The materials and methods applied and results obtained were presented in two scientific papers. The first article describes the epidemiological and pathological aspects of 36 cases of extra-skeletal osteosarcoma in dogs. In the analyzed period, from 2006 to 2016, osteosarcoma affected the soft tissues in 16.7% of cases. Females, with a mean age of 10.4 years, mean weight of 19.5 kg were the most affected. There was no racial predisposition. The main sites were: mammary gland (80.6%), followed by subcutaneous tissue (5.6%) and liver (5.6%). In histology, osteoblastic osteosarcomas (61.1%) of grade II and III were the most frequent. Nodal metastases were present in 21.4% of the cases that occurred in the breast. Distant metastases occurred in the lungs (57.1%), liver (14.3%), spleen (14.3%) and multiple sites (14.3%). Pulmonary metastases were more frequent in bitches with osteosarcoma of the mammary gland. The second article describes the clinical-pathological aspects of 153 cases of appendicular osteosarcoma in dogs, of which the survival data of 22 canine submitted to surgery and chemotherapy were statistically compared with the clinical, histopathological and immunohistochemical data for prognostic correlation. In the analyzed period, from 2008 to 2018, the osteosarcoma affected the bone tissue in 83% of the cases and of this, 82% involved the appendicular skeleton. The mean age was 9 years and the mean weight was 33.4 kg. There was no sexual predilection. The pure breed most affected was the Rottweiler (42%). The main sites were: proximal humerus (95%), distal femur (70%), distal radius (96%) and proximal tibia (56%). In histology, osteoblastic osteosarcomas were more frequent (57%). Nodal metastases occurred in 14% of cases. Distant metastases occurred in 75% of cases, in which the lung (43%) was the main organ affected. Regarding the analysis of prognostic factors, weight, age, sex, affected limb and bone, histological classification, mitotic count and histological grade did not influence survival ( $p > 0.05$ ). Neoplasms located at the proximal extremities of the limbs tend to have a poor prognosis ( $p = 0.06$ ). For these cases, the survival rate at one year was 14.3%, while at the distal end the rate was 46.7%. There was no significant difference in survival when using amputation or limb preservation techniques, since they were associated with chemotherapy ( $p = 0.20$ ). The survival of these dogs ranged from 73 to 1185 days, with a mean of 394 days. All cases presented cytoplasmic marking for osteopontin, but the intensity and percentage of marked neoplastic cell did not influence the survival ( $p > 0.05$ ). In 80% of the cases with metastases from this study there was marked marking for osteopontin.

**Keywords:** oncology, bone tumors, osteopontin, prognostic factor.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sistema de graduação histológica para osteossarcoma em cães (LOUKOPOULOS;ROBINSON, 2007).....	18
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1 Osteossarcoma .....	12
2.1.1 Caracterização clínica .....	12
2.1.2 Caracterização patológica .....	14
2.1.2.1 Classificação histológica .....	14
2.1.2.2 Graduação histológica .....	17
2.1.3 Caracterização imuno-histoquímica .....	19
2.1.3.1 Osteopontina .....	19
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	21
3.1 Artigo 1 .....	22
3.2 Artigo 2 .....	34
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias em animais domésticos são um importante grupo de afecções crescente em medicina veterinária, especialmente devido ao aumento da longevidade destes animais e aos melhores métodos de diagnóstico (EHRHART; RYAN; FAN, 2013). Em cães, os neoplasmas ósseos são relativamente comuns, dos quais os principais são o osteossarcoma, condrossarcoma, fibrossarcoma e hemangiossarcoma (THOMPSON; DITTMER, 2017). Estudos estimam que o osteossarcoma canino corresponda a 85% das neoplasias ósseas diagnosticadas na espécie (BRODEY; RISER, 1969).

O neoplasma acomete principalmente o tecido ósseo, embora também possa ser raramente encontrado em tecidos moles, os quais são denominados de osteossarcoma esquelético e extraesquelético respectivamente (THOMPSON; DITTMER, 2017). O osteossarcoma esquelético pode ocorrer no esqueleto apendicular ou axial enquanto que os osteossarcomas extraesqueléticos ocorre em qualquer tecido mole ou órgão visceral sem que haja qualquer envolvimento do tecido ósseo ou de periósteo adjacente (THOMPSON; DITTMER, 2017). As informações relacionadas ao osteossarcoma extraesquelético são limitadas e pouco difundidas, pois há poucos relatos do neoplasma na literatura (PATNAIK, 1990; KUNTZ *et al.*, 1998; LANGENBACH *et al.*, 1998).

As metástases são comuns em pacientes caninos com osteossarcoma (THOMPSON; DITTMER, 2017). Uma alternativa para impedir a disseminação da neoplasia, melhorar a qualidade e aumentar o tempo de sobrevida do canino é obtida pela utilização de medidas terapêuticas, tais como quimioterapia associada às técnicas cirúrgicas de amputação ou preservação do membro, radioterapia e imunoterapia associada à quimioterapia (MORELLO; MARTANO; BURACCO, 2011).

Fatores prognósticos são definidos como características clínicas e biológicas dos indivíduos, assim como aspectos patológicos do neoplasma que permitem estimar a evolução clínica e o tempo de sobrevida do paciente (ITALIANO, 2011). O conhecimento destes fatores é importante para o direcionamento terapêutico adequado e específico (BOERMAN *et al.*, 2012).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi descrever as características epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas do osteossarcoma esquelético e extraesquelético em cães no período de 2006 a 2018, assim como avaliar os fatores

prognósticos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos e o tempo de sobrevida pós-cirúrgico associados aos osteossarcomas apendiculares.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os tumores ósseos são relativamente comuns em cães e incomuns ou raros em outros animais domésticos (THOMPSON; DITTMER, 2017). Eles podem originar-se de qualquer componente, incluindo osso, cartilagem, gordura, fibroblastos, vasos sanguíneos e nervos e são classificados conforme o tecido que mais se assemelham (THOMPSON; DITTMER, 2017). Em cães, 98% dos tumores ósseos são malignos e são representados principalmente pelo osteossarcoma, condrossarcoma, fibrossarcoma, hemangiossarcoma (DALECK *et al.*, 2016). Dentre estes, o osteossarcoma é o neoplasma de maior importância para a espécie canina (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; DALECK *et al.*, 2016).

### 2.1 Osteossarcoma

#### 2.1.1 Caracterização clínica

Osteossarcoma é um neoplasma ósseo comumente observado em cães e representa 85% do diagnóstico de todas as neoplasias ósseas nesta espécie (BRODEY; RISER, 1969). Em um estudo realizado nos Estados Unidos a estimativa de ocorrência do osteossarcoma é de 8.000 novos casos em cães ao ano (WITHROW *et al.*, 1991). No Reino Unido a incidência do neoplasma é de 57 casos para cada 100.000 cães (DOBSON *et al.*, 2002).

Os cães com o neoplasma são frequentemente acometidos pelo osteossarcoma apendicular que se desenvolve em ossos longos e corresponde a 77% dos casos, enquanto que o osteossarcoma que se desenvolve no esqueleto axial correspondem a 23% dos casos (BRODEY; RISER, 1969).

Os osteossarcomas de esqueleto apendicular são os mais bem documentados na literatura e acometem os membros torácicos e pélvicos (STRAW; WITHROW; POWERS, 1990; BOERMAN *et al.*, 2012). Os cães acometidos pelo osteossarcoma geralmente são de raças grandes ou gigantes, de meia idade a idosos e comumente desenvolvem o neoplasma no rádio distal, úmero proximal, fêmur distal e tíbia distal ou proximal, predominantemente em metáfises (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; DALECK *et al.*, 2016). Uma hipótese para este perfil de pacientes está relacionada com

a sobrecarga de peso sobre esses ossos e ainda, por possuírem fises de fechamento tardio, estão mais sujeitos a pequenos e múltiplos traumas capazes de promover uma indução mitogênica (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; DALECK *et al.*, 2016). Os pacientes com o neoplasma cursam com aumento de volume, edema local ou generalizado, claudicação, dor e atrofia muscular (MORELLO; MARTANO; BURACCO, 2011; EHRHART; RYAN; FAN, 2013). A dor está associada à expansão do tumor na cavidade medular e a ação dos osteoclastos que causam microfraturas e promovem a ruptura do periósteo na superfície cortical (EHRHART; RYAN; FAN, 2013).

Os osteossarcomas de esqueleto axial acometem os ossos da cabeça, da coluna vertebral e do tórax (LIEBICH *et al.*, 2016; THOMPSON; DITTMER, 2017). A identificação do osteossarcoma nesta localização é mais difícil, pois os sinais clínicos variam conforme o osso acometido (EHRHART; RYAN; FAN, 2013). Os animais podem apresentar disfagia em sítios orais, exoftalmia em sítios orbitais, deformidade facial, descargas nasais e espirros quando localizados na cavidade nasal e hiperestesia com ou sem sinais neurológicos em sítios vertebrais seguidos por compressão da medula espinhal (EHRHART; RYAN; FAN, 2013).

Os osteossarcomas extraesqueléticos podem acometer qualquer tecido mole ou órgão visceral desde que não haja envolvimento do tecido ósseo ou do periósteo adjacente ao neoplasma (THOMPSON; DITTMER, 2017). Em cães, o neoplasma tem sido descrito acometendo fígado, baço, pele, subcutâneo, vagina, mesentério, intestino, omento, glândulas mamárias, testículos, glândulas salivares, adrenais, tireoides, pulmões, olhos, rins além de outros sítios menos frequentemente relatados (PATNAIK, 1990; THOMSEN; MYERS, 1990; KUNTZ *et al.*, 1998; LANGENBACH *et al.*, 1998). Os sinais clínicos variam conforme o local de desenvolvimento do neoplasma (PATNAIK, 1990; LANGENBACH *et al.*, 1998).

Os sinais respiratórios, quando presentes, podem estar associados com a forma metastática da doença (DALECK *et al.*, 2016). Isso ocorre porque o neoplasma apresenta um comportamento biológico extremamente agressivo e as metástases são frequentemente observadas nos pulmões (EHRHART; RYAN; FAN, 2013). Os osteossarcomas do esqueleto apendicular e axial apresentam prevalências de metástases e médias de sobrevida similares (DICKERSON *et al.*, 2001), exceto para os neoplasmas localizados na mandíbula (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; DALECK *et al.*, 2016). Cães acometidos pelo osteossarcoma de mandíbula tratados apenas com cirurgia

apresentaram uma taxa de sobrevida de 71% em um ano, que é superior à taxa de sobrevida em um ano para cães com osteossarcoma apendicular tratados apenas com cirurgia (STRAW *et al.*, 1996). Os osteossarcomas que afetam a cabeça, mandíbula, maxila e crânio, são localmente destrutivos e invasivos, porém desenvolvem metástases com uma frequência menor do que os osteossarcomas apendiculares (BECKWITH *et al.*, 2011; EHRHART; RYAN; FAN, 2013; DALECK *et al.*, 2016). Para os osteossarcomas extraesqueléticos, estudos anteriores demonstraram que a presença de metástases foi um achado comum em pacientes caninos com osteossarcoma de glândula mamária mas incomuns em cães com neoplasma em outros tecidos moles. Neste último grupo, a recidiva tumoral foi a principal causa de óbito (LANGENBACH *et al.*, 1998).

Na literatura há muitas modalidades terapêuticas para o osteossarcoma canino que incluem cirurgia de amputação ou preservação associada à quimioterapia, radioterapia e imunoterapia associada à quimioterapia (MORELLO; MARTANO; BURACCO, 2011; SZEWCZYK; LECHOWSKI; ZABIELSKA, 2015; GOUVÊA *et al.*, 2016). Embora haja a busca constante de novas modalidades terapêuticas, a ocorrência de metástases ainda limita o sucesso desses procedimentos e a remissão completa continua sendo um desafio para os profissionais que atuam na área de oncologia (DALECK *et al.*, 2016).

## **2.1.2 Caracterização patológica**

### **2.1.2.1 Classificação histológica**

Na histologia os osteossarcomas são caracterizados pela proliferação de células mesenquimais malignas com diferenciação osteoblástica em meio a matriz osteoide ou osso imaturo. No entanto, devido à natureza multipotencial das células neoplásicas, outros componentes como cartilagem e colágeno podem estar presentes nas secções histológicas (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Em animais domésticos, a classificação histológica do osteossarcoma é baseada no sistema de classificação de tumores primários e lesões tumorais não neoplásicas do tecido ósseo que estabelece critérios como: morfologia celular, composição da matriz e localização anatômica (SLAYTER *et al.*, 1994; THOMPSON; POOL, 2002). Mais recentemente, uma classificação histológica modificada de Slayter *et al.* (1994) foi proposta por autores (THOMPSON; DITTMER, 2017). Neste sistema, além do

osteossarcoma central, ou seja, que se origina da cavidade medular e do osteossarcoma de superfície, que se origina do periósteo, os autores também incluíram o osteossarcoma de origem extraesquelética que, apesar de reconhecido e descrito por Thompson e Pool (2002), não havia sido mencionado na tabela de classificação histológica.

Os osteossarcomas de origem central representam aproximadamente 85% dos tumores ósseos malignos em cães. Eles são classificados em subtipos histológicos, osteoblásticos (produtivo e não produtivo), condroblásticos, fibroblásticos, pouco diferenciados, telangiectásicos e rico em células gigantes (SLAYTER *et al.*, 1994). A importância deste sistema reside na correlação entre subtipo histológico, prognóstico e susceptibilidade à terapia (THOMPSON; DITTMER, 2017). Em um estudo que avaliou 144 osteossarcomas em cães, o subtipo fibroblástico apresentou um melhor prognóstico em relação aos demais subtipos (MISDORP; HART, 1979), enquanto que o osteossarcoma do subtipo telangiectásico apresentou um prognóstico desfavorável (HAMMER *et al.*, 1995). De forma distinta, o subtipo histológico não apresentou relevância prognóstica significativa e o curso clínico da doença não diferiu entre os subtipos histológicos (NAGAMINE *et al.*, 2015).

Uma dificuldade em classificar os osteossarcomas por subtipos histológicos reside na variabilidade morfológica das células neoplásicas e da matriz observada nas seções histológicas de uma mesma amostra e, além disso, um padrão subdominante pode apresentar características de maior malignidade. Entretanto, a subclassificação em uma das seis categorias deve ser determinada pelo padrão predominante em amostras representativas do tumor, mas se não houver um padrão predominante, o neoplasma deve ser classificado como um subtipo combinado (THOMPSON; DITTMER, 2017). Em amostras pequenas e pouco representativas o principal objetivo é obter o diagnóstico de osteossarcoma e não determinar o seu subtipo histológico (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Os osteossarcomas que se originam da superfície do osso, também chamados de justacorticais, são classificados em parosteais e periosteais (THOMPSON; DITTMER, 2017). O osteossarcoma parosteal tem sua origem na porção mais externa do periósteo chamada de camada protetora externa fibrosa (*stratum fibrosum*) e o osteossarcoma de origem periosteal tem sua origem na porção mais interna do periósteo chamada celular interna osteogênica (*stratum osteogenicum* ou *stratum cambium*), no qual se encontram as células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos e participam ativamente da formação do osso (LIEBICH *et al.*, 2016; THOMPSON; DITTMER,



2017). Em seres humanos, o osteossarcoma periosteal apresenta um melhor prognóstico em relação ao osteossarcoma de origem central, mas pior prognóstico em relação ao osteossarcoma parosteal (THOMPSON; DITTMER, 2017). Em animais domésticos os osteossarcomas de superfície são incomuns a raros. Há poucos casos de osteossarcoma com origem periosteal relatados na literatura (ZARUBY; WILLIAMS; LOVERING, 1993; COOK *et al.*, 1995) e um maior número de relatos com origem parosteal (GRIFFITH *et al.*, 1984; BROGDON *et al.*, 1989; THOMAS; DANIEL; MCGAVIN, 1997).

Os osteossarcomas de origem extraesquelética são raros e representam aproximadamente 1% de todos os diagnósticos de osteossarcoma (PATNAIK, 1990). O neoplasma acomete os tecidos moles sem que haja envolvimento ósseo primário (THOMPSON; DITTMER, 2017). Na literatura não há um consenso em relação a classificação histológica dos osteossarcomas extraesqueléticos. Há estudos que extrapolam a classificação histológica por subtipos histológicos para classificar os osteossarcomas de origem extraesquelética (PATNAIK, 1990; KUNTZ *et al.*, 1998; GÂRJOABĂ *et al.*, 2009; WOLDEMESKEL; GRICE, 2011). Por outro lado, alguns autores não utilizaram este método de classificação histológica, embora tenham identificado a presença de elementos osteoblásticos, condroblásticos, fibroblásticos além de células gigantes multinucleadas, necessários para a classificação por subtipos (LANGENBACH *et al.*, 1998; HEATH; RANKIN; DUBIELZIG, 2003; MUNDAY *et al.*, 2004; KALLIANPUR *et al.*, 2013; THOMPSON; DITTMER, 2017). Pouco se sabe sobre a importância da classificação histológica por subtipos no curso clínico de animais com osteossarcoma extraesquelético. Em um estudo retrospectivo de 14 cães com osteossarcoma extraesquelético, a sobrevivência dos animais não diferiu em relação aos subtipos histológicos (KUNTZ *et al.*, 1998). Em relação aos osteossarcomas de glândula mamária e tireoide não há uma concordância quanto a sua inserção na categoria extraesquelética (PATNAIK, 1990; KUNTZ *et al.*, 1998; LANGENBACH *et al.*, 1998; THOMPSON; DITTMER, 2017).

### 2.1.2.2 Graduação histológica

Na literatura há vários sistemas para determinar o grau histológico do osteossarcoma em cães, mas nenhum é universalmente aceito (SCHOTT *et al.*, 2018). Embora os estudos tenham demonstrado uma associação entre o tempo de sobrevida e o grau histológico, nenhum sistema tem sido amplamente utilizado por patologistas veterinários (THOMPSON; DITTMER, 2017). Este fato foi atribuído à acentuada variação histológica do osteossarcoma em diferentes regiões de um mesmo tumor, além disso, muitas amostras recebidas para análise histopatológica são pouco representativas quando comparadas a totalidade da lesão (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Estudos anteriores propuseram um sistema de graduação para osteossarcoma canino baseado nas características histológicas do neoplasma (KIRPENSTEIJN *et al.*, 2002). Neste estudo, os osteossarcomas foram graduados em I, II e III a partir de escores atribuídos ao pleomorfismo celular, a intensidade de necrose, a densidade de células tumorais, a quantidade de matriz em meio ao neoplasma e a contagem mitótica em três campos aleatórios de maior aumento (400X). Adicionalmente, a presença de êmbolos neoplásicos e/ou metástases nodais pelos autores foi um critério importante para a inclusão dos osteossarcomas no grau III. Este sistema avaliou 166 amostras de cães com osteossarcoma primário em múltiplos locais anatômicos e constataram que cães com osteossarcoma de grau III (alto grau) apresentaram uma sobrevida global e um intervalo livre da doença significativamente menor quando comparados com animais portadores de osteossarcomas de grau I e II. Além disso, somente a contagem de figuras de mitoses e a identificação de êmbolos neoplásicos se relacionaram com um aumento no risco de metástases (KIRPENSTEIJN *et al.*, 2002).

Outro sistema de graduação, também baseado nas características histológicas do neoplasma, foi proposto e avaliado em 51 cães com osteossarcomas na mandíbula (STRAW *et al.*, 1996) e 140 cães com osteossarcomas em múltiplos locais (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007). Os últimos autores graduaram os osteossarcomas de I a III a partir de escores atribuídos ao pleomorfismo nuclear, a intensidade de necrose e a contagem de figuras de mitose em 10 campos aleatórios de maior aumento (400X) (Tabela 1). Estes observaram que os osteossarcomas metastáticos apresentaram graus histológicos mais elevados quando comparados com os osteossarcomas que não desenvolveram metástases, além disso, os osteossarcomas localizados no esqueleto apendicular apresentaram graus histológicos significativamente maiores em relação aos osteossarcomas localizados no esqueleto axial (ossos do crânio)

e os osteossarcomas de alto grau foram classificados mais frequentemente como osteoblástico pouco produtivo do que como fibroblástico (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007), que na literatura é considerado um subtipo histológico de melhor prognóstico (MISDORP; HART, 1979).

**Tabela 1.** Sistema de graduação histológica para osteossarcoma em cães (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007).

<b>Valores das Características Histológicas</b>		
<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>	<b>Valor</b>
Pleomorfismo nuclear	Ausente	0
	Discreto	1
	Moderado	2
	Acentuado	3
Mitoses (10 campos 400X)	1-10	1
	11-20	2
	21-30	3
	>30	4
Necrose (%)	Ausente	0
	<15	1
	15-50	2
	>50	3

<b>Determinação do Grau Histológico</b>	
<b>Grau histológico</b>	<b>Pontuação histológica</b>
I	1-5
II	6-7
III	8-10

O uso do grau histológico para osteossarcomas seria mais bem empregado e restrito a tumores localizados em membros amputados, na qual a lesão pode ser amostrada de forma mais detalhada, fornecendo ao oncologista clínico uma indicação prognóstica mais precisa ou uma possível resposta frente à quimioterapia (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Estudos recentes lançam dúvidas em relação ao uso rotineiro do sistema de graduação histológica como ferramenta prognóstica para cães com osteossarcoma apendicular submetidos à amputação e quimioterapia e ressalta a necessidade de melhores ferramentas capazes de prever o curso clínico destes animais (SCHOTT *et al.*, 2018). Neste estudo, 3 avaliadores graduaram 85 amostras de osteossarcoma apendicular canino e compararam os dois sistemas de graduação histológica disponíveis

na literatura (KIRPENSTEIJN *et al.*, 2002; LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007). O grau histológico, pelos 2 sistemas e atribuídos por qualquer avaliador, não correlacionou-se com a sobrevida ou com o tempo médio para o desenvolvimento de metástases. Adicionalmente, o sistema de Loukopoulos e Robinson (2007) apresentou uma maior concordância entre os patologistas do que o sistema de Kirpensteijn *et al.* (2002). Segundo os autores, o sistema de Kirpensteijn *et al.* (2002) não forneceu instruções específicas sobre o uso do cronograma de classificação para determinar o grau final, sendo assim, os 3 avaliadores usaram métodos ligeiramente distintos para obter o grau final por esse sistema.

### **2.1.3 Caracterização imuno-histoquímica**

O uso da imuno-histoquímica em amostras de osteossarcoma tem como finalidade auxiliar no diagnóstico e obter um prognóstico dos pacientes caninos e humanos com o neoplasma (SELVARAJAH; KIRPENSTEIJN, 2010; OZMEN; HALIGUR; IPEK, 2015; MARDANPOUR; RAHBAR; MARDANPOUR, 2016; WEHRLE-MARTINEZ *et al.*, 2016).

Marcadores imuno-histoquímicos específicos para o tecido ósseo são restritos, os quais são reconhecidos principalmente a osteocalcina e a osteonectina como marcador diagnóstico e a osteopontina como marcador prognóstico (SULZBACHER *et al.*, 2002; OZMEN; HALIGUR; IPEK, 2015; WEHRLE-MARTINEZ *et al.*, 2016). No entanto, há outros marcadores capazes de predizer o comportamento biológico do osteossarcoma, tais como p53, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cicloxigenase -2 (COX-2), metaloproteinases, glicoproteína P (P-gp), proteína relacionada a multidrogas resistentes (MRP1), Ki67, HER2 e proteína ligante do esqueleto (Ezrin) (SELVARAJAH; KIRPENSTEIJN, 2010; MARDANPOUR; RAHBAR; MARDANPOUR, 2016).

#### **2.1.3.1 Osteopontina**

A osteopontina é uma fosfoproteína segregada que tem sido reconhecida como um importante marcador prognóstico (RITTLING; CHAMBERS, 2004; KRUGER *et al.*, 2014). No tecido ósseo, a osteopontina é a principal proteína não colágena da matriz óssea e a expressão do gene que a codifica é regulado em fases específicas de diferenciação osteoblástica (MERRY *et al.*, 1993; DODDS *et al.*, 1995). Embora

presente no tecido ósseo, a osteopontina é expressa em outros tecidos corporais na qual assume a função de facilitar a interação entre a célula e a matriz extracelular (SHEVDE; SAMANT, 2014).

Os níveis de expressão da osteopontina estão elevados em muitas neoplasias e a sua presença correlaciona-se com invasão, progressão e metástases tumorais (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; KRUGER *et al.*, 2014; SHEVDE; SAMANT, 2014). A fosfoproteína interage com vários receptores de superfície celular, induzindo a diversas vias de transdução de sinais (WEBER, 2011). Um exemplo disso é que a osteopontina interage com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é uma potente proteína angiogênica (SULZBACHER *et al.*, 2002). Há ainda outros mecanismos moleculares capazes de promover a disseminação metastática mediada pela osteopontina tais como: resistência a morte celular (apoptose), sinalização proliferativa, evasão de células imunológicas, adesão e migração de células tumorais, fuga dos supressores do crescimento, inflamação tumoral, proteólise e remodelação da matriz extracelular (RITTLING; CHAMBERS, 2004; WAI; KUO, 2008; SHEVDE; SAMANT, 2014).

A expressão da osteopontina tem sido estudada em neoplasias em múltiplos locais em humanos tais como: mama, ovário, endométrio, rins, esôfago, estômago, cavidade oral, pâncreas, fígado, pulmão, tireoide, osso e neoplasias na região da cabeça e pescoço (KRUGER *et al.*, 2014). Em medicina veterinária, são escassos os estudos que abordem o uso da osteopontina em espécimes tumorais (OZMEN; HALIGUR; IPEK, 2015).

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

Os materiais e métodos aplicados, os resultados e as discussões da pesquisa serão a seguir apresentados em dois artigos científicos.

#### Artigo 1:

##### **Aspectos epidemiológicos e patológicos do osteossarcoma extraesquelético em cães**

Tainã Normanton Guim, Bianca Santana Cecco, Cláudio João Mourão Laisse, Bernardo Schmitt, Luan Cleber Henker, Camila da Rosa Vieira, David Driemeier, Saulo Petinatti Pavarini, Luciana Sonne.

O artigo foi aceito para publicação no periódico *Semina de Ciências Agrárias*.

#### Artigo 2:

##### **Osteossarcoma apendicular em cães: caracterização clínico-patológica e avaliação de fatores de prognóstico**

Tainã Normanton Guim, Matheus V. Bianchi, Cíntia De Lorenzo, Aline Silva Gouvea, Daniel Gerardi, David Driemeier, Saulo Petinatti Pavarini, Luciana Sonne.

O artigo será submetido para publicação a um periódico por identificar.

### 3.1 Artigo 1

#### SCIENTIFIC ARTICLE/ ARTIGO CIENTÍFICO

##### **Epidemiological and pathological aspects of extra-skeletal osteosarcoma in dogs**

##### **Aspectos epidemiológicos e patológicos do osteossarcoma extraesquelético em cães**

#### **Abstract**

Extra-skeletal osteosarcoma is a malignant mesenchymal neoplasm that originates from soft tissue. This tumor occurs spontaneously in dogs, but there are few cases described in the literature. The objective of this study was to describe the epidemiological and pathologic features of extra-skeletal osteosarcoma in 36 dogs. Cases diagnosed as osteosarcoma affecting dogs (n=216), during 2006 to 2016 were reviewed. Of these, 36 cases were diagnosed as extra-skeletal osteosarcoma. The mean age of affected dogs was 10.4 years, and the mean weight was 19.5kg. No breed predisposition was observed. The most frequently affected sites were the mammary glands (80.6%; 29/36), subcutaneous tissue (5.6%; 2/36), liver (5.6%; 2/36), spleen (2.8%; 1/36), omentum (2.8%; 1/36), and kidney (2.8%; 1/36). Histological examination revealed that 61.1% (22/36) of the tumors were osteoblastic, 33.3% (12/36) chondroblastic, 2.8% (1/36) fibroblastic, and 2.8% (1/36) were giant cell-rich osteosarcomas. Histological grade II and III were the most frequent. Lymph node metastases were observed in 21.4% (3/14) of the cases of mammary gland osteosarcoma. Distant metastases were observed in 23.1% (3/13) of cases by diagnostic imaging and in 71.4% (5/7) during autopsy. Metastases were observed in the lungs (57.1%; 4/7), liver (14.3%; 1/7), spleen (14.3%; 1/7), and in multiple sites (14.3%; 1/7). Pulmonary metastases were more frequently observed in cases of mammary gland osteosarcoma.

**Keywords:** mammary gland, neoplasms, sarcomas, soft tissues.

#### **Resumo**

Osteossarcoma extraesquelético é um neoplasma mesenquimal maligno que se origina de tecidos moles. O neoplasma ocorre espontaneamente em cães, mas há poucos casos descritos na literatura. Este trabalho teve como objetivo descrever os aspectos epidemiológicos e patológicos do osteossarcoma extraesquelético em 36 cães. Casos diagnosticados de osteosarcoma afetando cães (n=216), durante 2006 a 2016 foram revisados. Deste total, 36 casos tiveram diagnóstico de osteossarcoma extraesquelético. A média de idade foi de 10,4 anos, não houve predisposição

racial e o peso médio foi de 19,5kg. Os locais acometidos foram glândula mamária (80,6%; 29/36), tecido subcutâneo (5,6%; 2/36), fígado (5,6%; 2/36), baço (2,8%; 1/36), omento (2,8%; 1/36) e rim (2,8%; 1/36). Na histologia, 61,1% (22/36) eram osteoblásticos, 33,3% (12/36) eram condroblásticos, 2,8% (1/36) eram fibroblásticos e 2,8% (1/36) eram ricos em células gigantes. Os graus histológicos II e III foram os mais frequentes. Metástases nodais estavam presentes em 21,4% (3/14) dos casos que ocorreram na mama. Metástases distantes foram constatadas em 23,1% (3/13) dos casos por exames de imagem e em 71,4% (5/7) dos casos pela autópsia. Os locais de metástases foram pulmões (57,1%; 4/7), fígado (14,3%; 1/7), baço (14,3%; 1/7) e em múltiplos sítios (14,3%; 1/7). Metástases pulmonares foram mais frequentes em cadelas com osteossarcoma de glândula mamária.

**Palavras-chave:** glândula mamária, neoplasmas, sarcomas, tecidos moles.

### **Introduction**

Extra-skeletal osteosarcoma is a soft tissue neoplasm characterized by the proliferation of malignant mesenchymal cells which produce bone matrix or woven bone, with no involvement of osseous tissue or adjacent periosteum (THOMPSON; DITTMER, 2017). Such tumor is rare, and it has been mainly reported in humans, dogs and cats (PATNAIK, 1990; LEE et al., 1995; SPUGNINI et al., 2001). The main anatomic sites reported are the mammary gland, spleen, liver, skin, subcutaneous tissue, as well as organs of the gastrointestinal and urinary tracts (LANGENBACH et al., 1998).

Extra-skeletal osteosarcomas present highly malignant biological traits and frequently metastasize. The affected dogs frequently have unfavorable prognosis, and present shorter survival time when compared with dogs diagnosed with skeletal osteosarcomas, due to factors including late detection in cases of intra-abdominal tumors, as well as limited surgical procedures for certain anatomic sites (THOMPSON; DITTMER, 2017). Metastases are usually observed in the lymph nodes and liver (PATNAIK, 1990); metastases are not frequent in the lungs (THOMPSON; DITTMER, 2017). Death usually results from tumor recurrence or euthanasia at the time of diagnosis (LANGENBACH et al., 1998; THOMPSON; DITTMER, 2017).

Studies involving the main aspects of extra-skeletal osteosarcomas in dogs are scarce (PATNAIK, 1990; KUNTZ et al., 1998; LANGENBACH et al., 1998), and most descriptions are represented by individual case reports. Despite its rare occurrence, this tumor arises spontaneously in dogs, and presents an apparently distinct biological behavior when compared with skeletal osteosarcomas on which broader information is available. In addition, although the histopathologic features of extra-skeletal osteosarcoma have been previously reported, no standardized histological patterns were established. Therefore, the present study described the



epidemiological characteristics, gross and microscopic findings of extra-skeletal osteosarcomas in dogs.

## **Material and Methods**

A retrospective study was performed at the database of the Department of Veterinary Pathology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Autopsy and biopsy reports were reviewed, and all cases of extra-skeletal osteosarcomas diagnosed between 2006 and 2016 were compiled. Analyzed samples included cases of osteosarcomas located in soft tissues, which showed no clinical, radiographical or gross evidence or primary skeletal involvement (bone tissue or periosteum). All cases were confirmed through histopathologic examination.

Epidemiological aspects (breed, body weight, sex, age, and anatomic site), clinical, gross and microscopic findings were obtained from the autopsy and biopsy report files, as well as from the clinical records and through phone calls with the referring small animal clinicians.

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were selected to conduct the histopathologic evaluation, and tissue sections (3  $\mu$ m) were routinely stained by hematoxylin and eosin (HE) to re-evaluate the neoplasm. Cases with no available tissue sections for reevaluation were excluded from the present study. Tumors were classified according to the predominant histological pattern as osteoblastic (productive and nonproductive), chondroblastic, fibroblastic, poorly differentiated, telangiectatic, and giant cell-rich osteosarcomas (SLAYTER et al., 1994).

The osteosarcoma histological grade was established through scores given to the degree of nuclear pleomorphism, percentage of intratumoral necrosis, and mitotic index. The latter was determined in 10 randomly assigned high power fields (400X), which included the tumor center and periphery. The final scores varied from 1 to 10 and these values were then converted to histological grades I, II, and III, according to previous literature (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007).

The diagnosis of mammary gland osteosarcoma was established through the histological identification of malign bone component associated with normal glandular epithelium. A thorough examination was applied to the epithelial component to rule out mammary gland mixed tumors.

Data regarding previous malign bone neoplasia as well as mammary gland mixed tumors affecting these dogs was obtained in order to exclude the possibility of a metastatic neoplasm. The possibility of any primary bone lesion as well as metastases from other tumors was conducted through evaluation of clinical data, in addition to radiographic and autopsy

findings. In order to distinguish between the tumor primary and secondary (metastatic) site, information regarding the organ of first chronologic diagnosis and tumor size were considered.

## Results

During the period evaluated, 216 osteosarcomas were diagnosed in dogs, of which, 16.7% (36/216) were extra-skeletal osteosarcomas (Table 1). The ages of the affected dogs were available for 83.3% (30/36), and ranged from 6 to 16 years, with mean and median age of 10.4 and 10 years, respectively. Relative to breed predominance, mixed breed dogs were overrepresented (45.7%; 16/35), followed by the German Shepherd (8.6%; 3/35), Poodle (8.6%; 3/35), Labrador Retriever (5.7%; 2/35), English Cocker Spaniel (5.7%; 2/35), Dachshund (5.7%; 2/35), Pinscher (5.7%; 2/35), Rottweiler (5.7%; 2/35), Boxer (2.9%; 1/35), Bulldog (2.9%; 1/35), and Akita Inu (2.9%; 1/35). The breed of one dog was not available. Body weight data was obtained from 36.1% (13/36) of these dogs, and ranged from 2.3 to 38kg, with mean and median values of 19.5kg and 18kg, respectively. Most of the affected dogs were female (83.3%; 30/36), and males were underrepresented (16.7%; 6/36).

Primary extra-skeletal osteosarcomas occurred in the mammary gland (80.6%; 29/36), liver (5.6%; 2/36), subcutaneous tissue (5.6%; 2/36), spleen (2.8%; 1/36), kidney (2.8%; 1/36), and omentum (2.8%; 1/36). Mammary gland osteosarcomas were detected in the abdominal (42.9%; 9/21), thoracic (19%; 4/21), inguinal (9.5%; 2/21), and in multiple mammary glands concomitantly (28.6%; 6/21). In eight cases the information regarding the location of the neoplasm in the mammary gland was not available.

Grossly, extra-skeletal osteosarcomas were represented by nodules or masses, with size ranging from 2.5 to 35cm in diameter (Figure 1A – 1D). At the sectioned surface, tumors were whitish, with firm to hard consistency, and sometimes were associated with multifocal areas of necrosis and hemorrhage. Skin ulceration was observed in some cases of mammary gland osteosarcoma (43.8%; 7/16).

Microscopically, osteosarcomas were characterized by proliferation of malign mesenchymal cells, showing osteoblastic differentiation, as well as varying amounts of bone or chondroid matrix, or bone trabeculae (Figure 2A – 2D). The neoplastic cells were oval to spindle-shaped, with indistinct cell borders, scant cytoplasm, elongated nuclei, and prominent nucleoli. In some cases, multinucleated giant cells, as well as multifocal areas of mineralization were observed (Figure 2A). Nuclear pleomorphism was considered marked in 91.7% (33/36) and moderate in 8.3% (3/36) of the tumors. Neoplastic emboli within blood or lymphatic vessels were observed in 19.4% (7/36) of the cases (Figure 2C). In addition, multifocal areas of necrosis were observed in most tumors (97.2%; 35/36) and occupied 10% to 70% of the neoplastic tissue, with mean of 38%.

Regarding histological type, 61.1% (22/36) of the extra-skeletal osteosarcomas were osteoblastic, 33.3% (12/36) chondroblastic, 2.8% (1/36) fibroblastic and 2.8% (1/36) were giant cell-rich osteosarcomas. Osteoblastic osteosarcomas presented moderate to marked bone matrix among neoplastic cells; consequently, these tumors were considered productive. When the histological grade was evaluated, 47.2% (17/36) of the tumors were classified as grade III, 47.2% (17/36) as grade II, and 5.6% (2/36) as grade I.

Lymph node metastases from mammary gland osteosarcomas were histologically examined in 14 samples (13 biopsies and 1 autopsy). Lymph node metastases were detected in 21.4% (3/14) of the mammary gland osteosarcomas (Figure 1D and 2D). Distant metastases were evaluated through imaging evaluations (13/36) and autopsy findings (7/36). Distant metastases sites were identified in 23.1% (3/13) of the cases evaluated via imaging diagnostics, in 71.4% (5/7) of the cases during autopsy. Distant site metastases were observed in the lungs (57.1%; 4/7), liver (14.3%; 1/7), spleen (14.3%; 1/7), and multiple sites (14.3%; 1/7), which were represented by pancreas and lungs. Most 80% (4/5) of the pulmonary metastases were from mammary gland osteosarcoma. All cases presenting lymph node metastasis (3) were classified as grade III, as well as four out of five cases which present metastases to distant sites, which were confirmed through histopathology or autopsy findings.

## **Discussion**

Extra-skeletal osteosarcoma is a rare malign mesenchymal neoplasm described in humans and domestic animals (PATNAIK, 1990; LEE et al., 1995). The percentage of the cases reported in the present study is similar to the findings reported by other authors (LANGENBACH et al., 1998). A significantly lower frequency of extra-skeletal osteosarcomas (1%) was observed by Patnaik (1990) when compared with extra-skeletal osteosarcomas documented by a previous study (LANGENBACH et al., 1998) and the present study. However, in the study published by Patnaik (1990), no thyroid and mammary gland osteosarcomas were included.

Adult and geriatric dogs were more commonly affected by extra-skeletal osteosarcomas, and the mean age was similar to previous descriptions (9.7 to 11.5 years) (PATNAIK, 1990; KUNTZ et al., 1998; LANGENBACH et al., 1998). Purebred dogs were more affected than mixed breeds; however, no significant predisposition was observed among specific dog breeds, which has also been described by other authors (PATNAIK, 1990; KUNTZ et al., 1998). Extra-skeletal osteosarcomas were diagnosed in dogs of varied body weight, and mean values were similar to previous descriptions (18kg and 23kg) (KUNTZ et al., 1998; LANGENBACH et al., 1998). Although the large and giant dog breeds are more frequently affected by appendicular osteosarcomas (EHRHART et al., 2013), such predisposition was not observed in the present

study, as well as in previous similar studies (KUNTZ et al., 1998; LANGENBACH et al., 1998). Female dogs were overrepresented in the present study, which is since mammary gland osteosarcomas were included. However, previous reports have also shown a female predisposition (PATNAIK et al., 1990; KUNTZ et al., 1998).

Similarly, to previous reports, in the present study the mammary gland was the most commonly affected anatomic site (LANGENBACH et al., 1998). Nonetheless, one study has described the spleen (6/14), followed by the mammary gland (3/14) as the most frequently affected sites (KUNTZ et al., 1998). Previous studies have shown that 17.9% (19/106) and 35% (37/106) of mammary gland osteosarcomas were diagnosed in the cranial and caudal abdominal glands (LANGENBACH et al., 1998). Likewise, in the present study, the abdominal mammary glands were overrepresented. This higher occurrence could be related to the larger size of abdominal when compared with thoracic mammary glands (LANGENBACH et al., 1998). Fewer cases of extra-skeletal osteosarcomas were diagnosed in other soft tissues, and the affected anatomic sites were compatible with previous descriptions (KUNTZ et al., 1998; LANGENBACH et al., 1998).

In the present study, a diagnosis of extra-skeletal osteosarcomas was achieved through the association of clinical, radiographic, and pathologic findings, and the diagnostic criteria were identical to previous studies (PATNAIK, 1990; KUNTZ et al., 1998). In addition, the bone scintigraphy diagnostic technique may be used when a skeletal tumor is suspected (KUNTZ et al., 1998). Although highly sensitive, bone scintigraphy is considered nonspecific (EHRHART et al., 2013); therefore, it should be used with radiographic examinations and autopsy procedures in suspected cases (KUNTZ et al., 1998).

Osteoblastic and chondroblastic osteosarcomas were the most frequent histological variants in the present study, similar findings were described (PATNAIK, 1990; KUNTZ et al., 1998). However, no consensus regarding the histologic classification of extra-skeletal osteosarcomas is available. Some previous studies have used the histological subtypes established for central osteosarcomas (PATNAIK, 1990; KUNTZ et al., 1998; GÂRJOABĂ et al., 2009; WOLDEMESKEL; GRICE, 2011), while others have only classified the tumors based on morphologic criteria (LANGENBACH et al., 1998; HEATH et al., 2003; KALLIANPUR et al., 2013; THOMPSON; DITTMER, 2017). Although, knowledge of the influence of the histologic subtype on the prognosis of affected dogs is lacking, a study evaluating 14 dogs with extra-skeletal osteosarcoma revealed no difference regarding the survival time among different histological subtypes (KUNTZ et al., 1998).

A previous study has demonstrated an association between survival time and histological grade (KIRPENSTEIJN et al., 2002); however, but grading system is not widely spread among pathologists (THOMPSON; DITTMER, 2017). There are two main histologic grading systems described for osteosarcomas in dogs (KIRPENSTEIJN et al., 2002;

LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007); nonetheless greater concordance has been observed with the use of the grading system described by Loukopoulos & Robinson (2007) (SCHOTT et al., 2018). Studies have shown that extra-skeletal osteosarcomas present histological grades varying from II to III, and that tumors at multiple sites showing high histological grade have greater metastatic potential (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007). These findings are corroborated by the present study.

Metastases to regional lymph nodes are considered rare for skeletal osteosarcomas (HILLERS et al., 2005); but when occur, a poor prognosis is normally expected (HILLERS et al., 2005; THOMPSON; DITTMER, 2017). In our study, lymph node metastases were observed in 21.4% of the mammary gland osteosarcomas, corroborating with a study that reported metastases in 28% of mammary gland osteosarcomas (LANGENBACH et al., 1998). However, lymph node metastases were observed in only 4.4% of the dogs with appendicular osteosarcoma (HILLERS et al., 2005). Consequently, it is possible to infer that mammary gland osteosarcomas have a greater metastatic potential to regional lymph nodes, when compared with osteosarcomas of the appendicular skeleton.

Pulmonary metastases are frequently observed in dogs with skeletal osteosarcoma, and neoplastic dissemination occurs hematogenously (THOMPSON; DITTMER, 2017). Although the distant anatomic locations of extra-skeletal osteosarcoma metastases are commonly described, the lungs are less frequently involved when compared with skeletal osteosarcomas (THOMPSON; DITTMER, 2017). In a previous study, distant site metastases occurred in 64% (7/11) of the dogs with extra-skeletal osteosarcoma identified by autopsy (PATNAIK, 1990), which is similar to the present findings (71.4%; 5/7). Pulmonary metastasis has been described as the main cause of death of dogs affected by mammary gland osteosarcoma (LANGENBACH et al., 1998). The present study corroborates with this finding since pulmonary metastases were more frequent in dogs with mammary gland osteosarcoma.

## **Conclusion**

Data from the present study suggest that extra-skeletal osteosarcoma affects predominantly female dogs with a mean age of 10.4 years. The mammary gland is the most commonly affected site for extra-skeletal osteosarcomas, followed by the subcutaneous tissue, and the liver. In these cases, regional and distant metastases are relatively frequent, primarily in female dogs with mammary gland osteosarcomas. Additionally, grades II and III osteoblastic osteosarcomas are probably the most frequently occurring histologic extra-skeletal osteosarcomas.

## **Conflict of interest**

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

Pró-Reitoria de Pesquisa (Propesq/UFRGS) supported this study.

## References

- EHRHART, N. P.; RYAN, S. D.; FAN, T. M. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S. J. PAGE, R.; VAIL, D. M. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5<sup>th</sup> ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. 750 p.
- GÂRJOABĂ, I.; TUDOR, N.; SOARE, T.; TĂNASE, A.; VLĂGIOIU, C. Extraskelatal osteosarcoma in dogs: presentation of two cases. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, Timisoara, v. 42, n. 2, p. 107-110, 2009.
- HEATH, S.; RANKIN, A. J.; DUBIELZIG, R. R. Primary ocular osteosarcoma in a dog. *Veterinary Ophthalmology*, Osney Mead, v. 6, n. 1, p. 85-87, 2003.
- HILLERS, K. R.; DERNELL, W. S.; LAFFERTY, M. H.; WITHROW, S. J.; LANA, S. E. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986–2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 226, n. 8, p. 1364-1367, 2005.
- KALLIANPUR, A. A.; GUPTA, R.; MUDULY, D. K.; KAPALI, A.; SUBBARAO, K. C. Osteosarcoma of breast: a rare case of extraskelatal osteosarcoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, Mumbai, v. 9, n. 2, p. 292, 2013.
- KIRPENSTEIJN, J.; KIK, M.; RUTTEMAN, G. R.; TESKE, E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Veterinary Pathology*, Thousand Oaks, v. 39, n. 2, p. 240-246, 2002.
- KUNTZ, C. A.; DERNELL, W. S.; POWERS, B. E.; WITHROW, S. Extraskelatal osteosarcomas in dogs: 14 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, South Bend, v. 34, n. 1, p. 26-30, 1998.
- LANGENBACH, A., ANDERSON, M. A., DAMBACH, D. M., SORENMO, K. U., & SHOFER, F. D. Extraskelatal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, South Bend, v. 34, n. 2, p. 113-120, 1998.
- LEE, J. S.; FETSCH, J. F.; WASDHAL, D. A.; LEE, B. P.; PRITCHARD, D. J.; NASCIMENTO, A. G. A review of 40 patients with extraskelatal osteosarcoma. *Cancer*, Hoboken, v. 76, n. 11, p. 2253-2259, 1995.

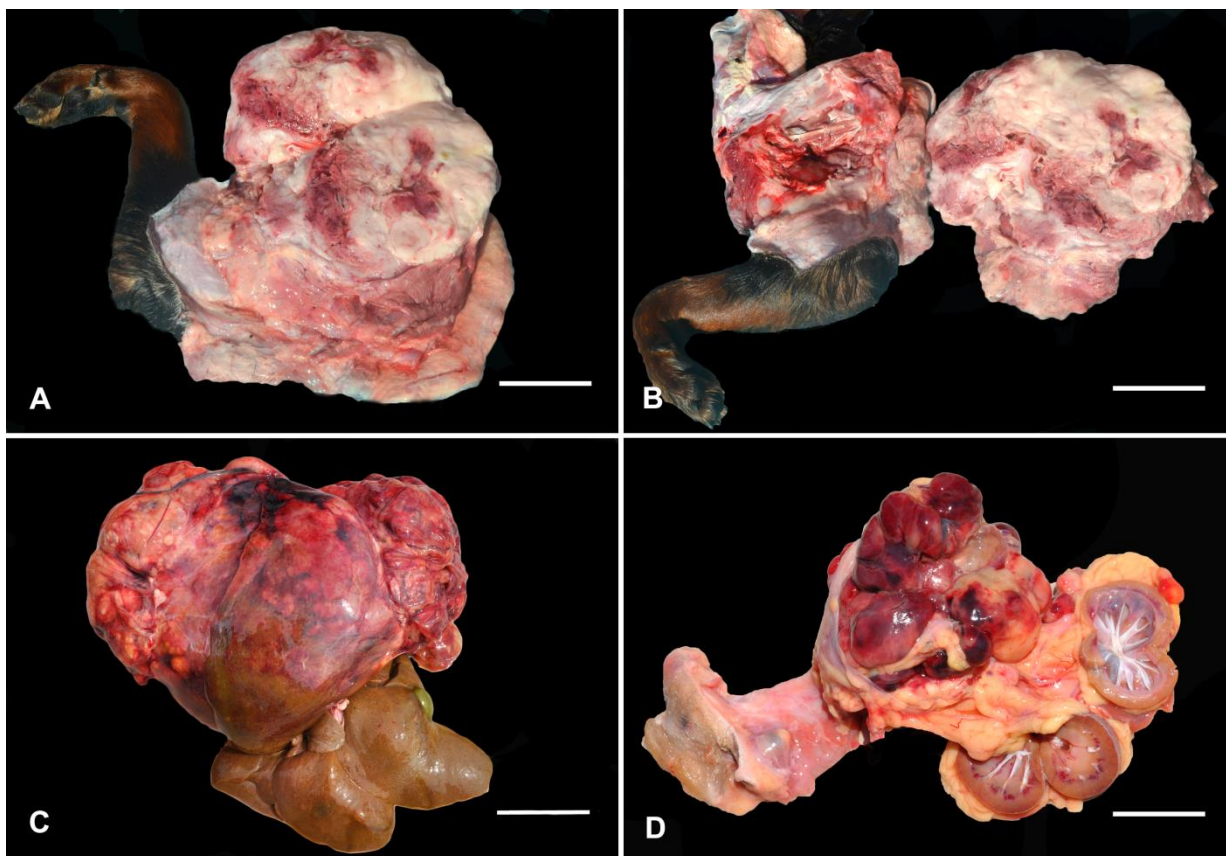
- LOUKOPOULOS, P.; ROBINSON, W. F. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *Journal of Comparative Pathology*, London, v. 136, n. 1, p. 65-73, 2007.
- PATNAIK, A. K. Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcoma: a clinicopathologic study of 14 cases. *Veterinary Pathology*, Thousand Oaks, v.27, p.46-55, 1990.
- SCHOTT, C. R.; TATIERSKY, L. J.; FOSTER, R. A.; WOOD, G. A. Histologic grade does not predict outcome in dogs with appendicular osteosarcoma receiving the standard of care. *Veterinary Pathology*, Thousand Oaks, v. 55, n. 2, p. 202-211, 2018.
- SLAYTER, M. V.; BOOSINGER, T. R.; POOL, R. R.; DAMMRICH, K.; MISDORP, W.; LARSEN, S. Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals. In: *International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: Armed forces institute of pathology, American Registry of Pathology and World Health organization, 1994. 59p.
- SPUGNINI, E. P.; RUSLANDER, D.; BARTOLAZZI, A. Extraskeletal osteosarcoma in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 219, n. 1, p. 60-62, 2001.
- THOMPSON, K.G.; DITTMER, K. Tumors of bone. In: MEUTEN, D.J. *Tumors in domestic animals*. 5<sup>th</sup> ed. Ames: John Wiley & Sons Inc, 2017. 989p.
- WOLDEMESKEL, M.W.; GRICE, C.D. Pathology in practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.238, n.3, p.297-299, 2011.

**Table 1.** Cases of extra-skeletal osteosarcoma affecting dogs diagnosed at the Department of Veterinary Pathology - UFRGS (2006-2016).

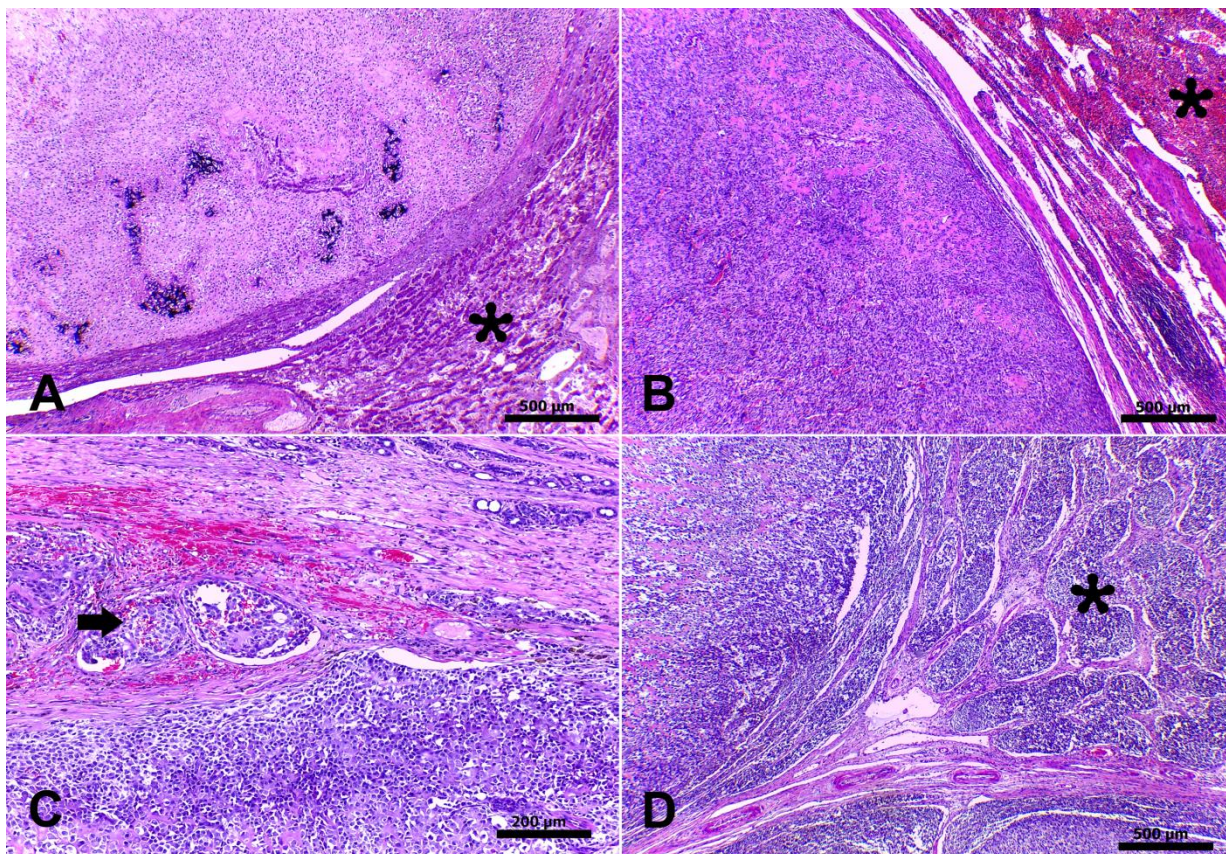
Cases	Breed	Age (Years)	Sex	Body weight (kg)	Anatomic site	Histologic subtype	Grade	Vascular invasion	Lymph node metastases	Distant metastases
1	Mixed breed	8	F	-	MG	Osteoblastic	III	No	No	-
2	Mixed breed	10	F	-	MG	Chondroblastic	III	No	-	-
3	Poodle	9	F	-	MG	Chondroblastic	I	No	-	-
4	Poodle	9	F	-	MG	Osteoblastic	III	No	-	-
5	Cocker Spaniel	14	F	-	MG	Chondroblastic	III	No	-	-
6	Mixed breed	9	F	-	MG	Osteoblastic	III	No	-	-
7	German Shepherd	14	F	-	MG	Chondroblastic	II	No	-	Lungs <sup>(a)</sup>
8	German Shepherd	9	F	-	MG	Osteoblastic	II	No	-	-
9	Mixed breed	11.6	F	12.2	MG	Osteoblastic	III	No	No	No <sup>(a)</sup>
10	Mixed breed	9	F	20.4	MG	Chondroblastic	II	No	-	No <sup>(a)</sup>
11	Mixed breed	-	F	15	MG	Chondroblastic	II	No	-	No <sup>(a)</sup>
12	Mixed breed	10	F	-	MG	Osteoblastic	III	No	Yes	-
13	German Shepherd	11	F	44.3	MG	Fibroblastic	II	No	No	No <sup>(a)</sup>
14	Boxer	7	F	-	MG	Osteoblastic	II	No	No	-
15	Mixed breed	-	F	-	MG	Chondroblastic	II	No	-	-
16	Dachshund	11	F	-	MG	Osteoblastic	III	Yes	No	-
17	Poodle	11	F	2.3	MG	Osteoblastic	III	No	No	Lungs <sup>(a)</sup>
18	Cocker Spaniel	9	F	10.6	MG	Osteoblastic	III	Yes	Yes	No <sup>(a)</sup>
19	Bulldog	12	F	18	MG	Osteoblastic	II	Yes	No	No <sup>(a)</sup>
20	Mixed breed	-	F	-	MG	Osteoblastic	II	Yes	-	-
21	NI	14	F	-	MG	Osteoblastic	III	No	No	-
22	Mixed breed	10	F	5.6	MG	Giantcell-rich	III	No	-	No <sup>(a)</sup>
23	Pinscher	10	F	-	MG	Osteoblastic	I	No	-	No <sup>(a)</sup>
24	Mixed breed	11	F	6.2	MG	Chondroblastic	II	No	No	No <sup>(a)</sup>
25	Pinscher	13	F	-	MG	Osteoblastic	III	Yes	Yes	Lungs and pancreas <sup>(b)</sup>
26	Rottweiler	6	F	36.6	MG	Chondroblastic	II	No	No	-
27	Dachshund	12	F	-	MG	Chondroblastic	II	No	No	-
28	Mixed breed	-	F	-	MG	Osteoblastic	III	Yes	-	Lungs <sup>(b)</sup>
29	Mixed breed	-	F	-	MG	Osteoblastic	II	No	-	No <sup>(b)</sup>
30	Labrador	9	M	-	Liver	Osteoblastic	III	Yes	-	-
31	Akita Inu	11	M	-	Kidney	Chondroblastic	II	No	-	-
32	Labrador	9	M	38	ST	Chondroblastic	II	No	-	No <sup>(a)</sup>
33	Mixed breed	11	F	-	Spleen	Osteoblastic	III	No	-	Liver <sup>(a and b)</sup>
34	Mixed breed	-	M	-	Omentum	Osteoblastic	II	No	-	Spleen <sup>(b)</sup>
35	Rottweiler	8	M	27.2	ST	Osteoblastic	III	No	-	Lungs <sup>(b)</sup>
36	Mixed breed	16	M	18.2	Liver	Osteoblastic	II	No	-	No <sup>(b)</sup>

NI: not informed; F: female; M: male; MG: mammary gland; ST: subcutaneous tissue; <sup>(a)</sup>: evaluated through imaging exams; <sup>(b)</sup>: Evaluated through autopsy procedure followed by histopathological examination.





**Figure 1.** Gross aspects of extra-skeletal osteosarcoma in dogs. **(A and B)** Medial side of the right forelimb. A white subcutaneous mass, showing multifocal areas of necrosis and reddening is observed with no bone involvement (Bar, 10 cm). **(C)** Hepatic osteosarcoma. Left lateral liver lobe showing a large irregular mass, which presents reddish surface and is surrounded by the omentum (Bar, 8 cm). **(D)** Iliac lymph node metastasis from mammary gland osteosarcoma. Lymph nodes are extremely enlarged, and effaced by a multilobulated mass, presenting reddened surface, which compressed the urinary bladder and led to bilateral hydronephrosis (Bar, 5cm).



**Figure 2.** Histologic findings of extra-skeletal osteosarcoma in dogs. Hematoxylin and Eosin stain (HE) (A-D). (A) Hepatic osteosarcoma. Proliferation of neoplastic cells with osteoblastic differentiation is observed associated with abundant bone matrix as well as multifocal areas of mineralization. The adjacent hepatocytes (asterisk) show degeneration and atrophy (Bar, 500 $\mu$ m). (B) The neoplastic cells are delimited by fibrous connective tissue in a case of splenic osteosarcoma. The adjacent splenic tissue is normal (asterisk). (Bar, 500 $\mu$ m). (C) Neoplastic emboli are observed within blood vessels (arrow) in a case productive osteoblastic osteosarcoma of the mammary gland (Bar, 200  $\mu$ m). (D) Lymph node metastasis in a case of mammary gland osteosarcoma. The lymph node tissue is normal (asterisk). (Bar 500  $\mu$ m).

### 3.2 Artigo 2

#### **Osteossarcoma apendicular em cães: caracterização clínico-patológica e avaliação de fatores de prognóstico**

Tainã Normanton Guim, Matheus Viezzer Bianchi, Cíntia De Lorenzo, Aline Silva Gouvea, Daniel Gerardi, David Driemeier, Saulo Petinatti Pavarini, Luciana Sonne

#### **Abstract**

Osteosarcoma is the most common primary bone neoplasm in canines, often involving appendicular skeleton. The objective of this study was to describe the clinical-pathological aspects of appendicular osteosarcomas diagnosed in canines from 2008 to 2018, as well as to evaluate clinical, histopathological and immunohistochemical prognostic factors. We reviewed 153 cases of appendicular osteosarcoma diagnosed in dogs during the analyzed period, of which the survival data of 22 canine submitted to surgery and chemotherapy were statistically compared with the clinical, histopathological and immunohistochemical data for prognostic correlation. In this study, appendicular osteosarcoma occurred in 82% of the cases. The mean was 9 years of age and the mean weight of 33.4 kg; there was no sexual predilection, although females were affected in 52% of the cases. Purebred dogs were more affected, with more frequency of Rottweiler breed (42%). The most affected sites were the thoracic limbs (54.6%) and proximal humeral (95%), distal femur (70%), distal radius (96%) and proximal tibia (56%) metaphyses. Histologically, osteoblastic osteosarcomas were the most common (57%, 87/153), followed by chondroblastic (14%, 21/153), telangiectatic (12%, 18/153), fibroblastic (8%, 12/153), rich in giant cells (5%, 8/153) and poorly differentiated (4%, 7/153). Metastases to the regional lymph node were found in 14% (4/28) of the cases. Distant metastases were observed in 75% of the cases by imaging and necropsy, in which the lung (43%) was the main organ involved. Regarding the analysis of prognostic factors, weight, age, sex, affected limb and bone, histological classification, mitotic count and histological grade did not influence survival ( $p > 0.05$ ). Neoplasms located at the proximal extremities of the limbs tend to have a poor prognosis ( $p = 0.06$ ). For these cases, the survival rate at one year was 14.3%, while at the distal end the rate was 46.7%. There was no significant difference in survival when using amputation or limb preservation techniques, since they were associated with chemotherapy ( $p = 0.20$ ). The survival of these dogs ranged from 73 to 1185 days, with a mean and median of 394 and 242 days, respectively. All cases presented cytoplasmic marking for osteopontin, but for the analysis of prognostic factors, marking intensity ( $p = 0.66$ ) and percentage of neoplastic cells ( $p = 0.49$ ) did not influence the survival of dogs with appendicular osteosarcoma. In 80% of the cases with metastases from this study there was marked marking for osteopontin.

**Keywords:** oncology, bone tumors, osteopontin, post-operative survival, grading system, dogs, locomotor system.

## Resumo

Osteossarcoma é o neoplasma ósseo primário mais comum em caninos, frequentemente com envolvimento do esqueleto apendicular. Este trabalho tem como objetivo descrever os aspectos clínico-patológicos de osteossarcomas apendiculares diagnosticados em caninos de 2008 a 2018, bem como avaliar fatores prognósticos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos. Foram revisados 153 casos de osteossarcoma apendicular diagnosticados em cães durante o período analisado, dos quais os dados de sobrevida de 22 caninos submetidos a intervenções cirúrgicas e à quimioterapia foram confrontados estatisticamente com os dados clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos para correlação prognóstica. Neste estudo, o osteossarcoma apendicular ocorreu em 82% dos casos. A média foi de nove anos de idade, peso médio de 33,4 kg, não houve predileção sexual, embora fêmeas tenham sido acometidas em 52% dos casos. Cães de raças puras foram mais acometidos, com maior frequência da raça Rottweiler (42%). O membro torácico (54,6%) e as metáfises proximal do úmero (95%), distal do fêmur (70%), distal do rádio (96%) e proximal da tíbia (56%) foram os locais mais afetados. Na histologia, osteossarcomas osteoblásticos foram os mais comuns (57%; 87/153), seguidos por condroblásticos (14%; 21/153), telangiectásicos (12%; 18/153), fibroblásticos (8%; 12/153), ricos em células gigantes (5%; 8/153) e pouco diferenciados (4%; 7/153). Metástases para o linfonodo regional foram constatadas em 14% (4/28) dos casos. Metástases distantes foram constatadas em 75% dos casos por exame de imagem e necropsia, nos quais o pulmão (43%) foi o principal órgão acometido. Quanto à análise de fatores prognósticos, o peso, a idade, o sexo, o membro e osso afetado, a classificação histológica, a contagem mitótica e o grau histológico não influenciaram na sobrevida ( $p > 0,05$ ). Neoplasmas localizados na extremidade proximal dos membros tiveram uma tendência a um pior prognóstico ( $p=0,06$ ). Para estes casos, a taxa de sobrevida em um ano foi de 14,3%, enquanto que na extremidade distal a taxa foi de 46,7%. Não houve diferença significativa em relação à sobrevida quando utilizadas as técnicas de amputação ou preservação do membro, desde que associadas à quimioterapia ( $p=0,20$ ). A sobrevida destes cães variou de 73 a 1185 dias, com média e mediana de 394 e 242 dias respectivamente. Todos os casos apresentaram marcação citoplasmática para osteopontina, porém quanto a análise de fatores prognósticos, a intensidade de marcação ( $p=0,66$ ) e o percentual de células neoplásicas ( $p=0,49$ ) não influenciaram na sobrevida de cães com osteossarcoma apendicular. Em 80% dos casos com metástases deste estudo houve marcação acentuada para osteopontina.

**Palavras chave:** oncologia, tumores ósseos, osteopontina, sobrevida pós-cirúrgica, sistema de graduação, caninos, sistema locomotor.

## Introdução

Osteossarcoma é o neoplasma ósseo primário mais comum no cão (BRODEY; RISER, 1969), afetando principalmente o esqueleto apendicular, ou seja, ossos dos membros torácicos e membros pélvicos (CAVALCANTI *et al.*, 2004). O neoplasma tem usualmente um comportamento agressivo, e as metástases são comuns (THOMPSON; DITTMER, 2017). Uma alternativa para impedir a disseminação da neoplasia, melhorar a qualidade e aumentar o tempo de sobrevida do canino é obtida pela utilização de medidas terapêuticas, tais como quimioterapia associada às técnicas

cirúrgicas de amputação ou preservação do membro, radioterapia e imunoterapia associada à quimioterapia (MORELLO; MARTANO; BURACCO, 2011).

Fatores prognósticos são definidos como características clínicas e biológicas dos indivíduos, assim como aspectos patológicos do neoplasma que permitem estimar a evolução clínica e o tempo de sobrevivência do paciente (ITALIANO, 2011). O conhecimento destes fatores é importante para o direcionamento terapêutico adequado (BOERMAN *et al.*, 2012). Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo descrever as características clínicas e patológicas de osteossarcomas apendiculares diagnosticados em cães no período de 2008 a 2018, assim como avaliar os fatores prognósticos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos associados.

### **Materiais e Métodos**

Foi realizado um estudo retrospectivo em busca de casos diagnosticados de osteossarcoma em caninos no período entre 2008 a 2018 em um laboratório de Patologia Veterinária no Sul do Brasil. As amostras foram analisadas por meio dos registros de biópsias e/ou necropsias e incluíram cães com diagnóstico anatomopatológico de osteossarcoma no esqueleto apendicular.

### **Dados clínicos**

Os dados clínicos (raça, idade, sexo, peso corporal, local anatômico e modalidade terapêutica) foram obtidos por meio dos registros do Laboratório de Patologia Veterinária e via prontuários clínicos do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital de Clínicas Veterinárias da instituição para os casos atendidos neste local.

Informações referentes às metástases distantes foram obtidas através da análise de laudos de exames de imagem presentes nos prontuários clínicos.

### **Dados anatomopatológicos**

Quando remetido para análise o membro inteiro, o local anatômico previamente informado pelo clínico foi reavaliado por meio da descrição macroscópica e registro fotográfico.

Todos os casos foram submetidos à reavaliação histopatológica, de forma que os blocos de parafina contendo secções do neoplasma foram resgatados e submetidos a novo processamento histológico, com corte de 3 µm de espessura e corados em

hematoxilina-eosina (HE). Na avaliação histológica, os osteossarcomas foram classificados em osteoblástico (produtivo e não produtivo), condroblástico, fibroblástico, rico em células gigantes, pouco diferenciado e telangiectásico, conforme Slayter *et al.* (1994).

Nos casos em que dados de sobrevida pós-cirúrgica estavam disponíveis para correlação prognóstica, os osteossarcomas foram graduados (graus I, II e III) a partir de escores atribuídos ao pleomorfismo nuclear, a contagem de figuras de mitoses em 10 campos aleatórios de maior aumento (400X) e ao percentual de necrose. A soma dos escores variou de 1 a 10 e a conversão em grau foi realizada conforme prévia descrição na literatura (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007).

Metástases foram analisadas por meio de necropsias e biópsias excisionais constituída pelo membro inteiro. Em amostras constituídas por fragmentos de tecido neoplásico, estes dados não foram obtidos.

### **Dados imuno-histoquímicos**

Para a imuno-histoquímica, cortes histológicos de secções do neoplasma foram submetidos ao método do polímero universal MACH 4 HRP (Biocare<sup>®</sup>) para o anticorpo anti-osteopontina (ab8448, Abcam<sup>®</sup>, 1:20). A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 96°C, durante 40 minutos, com solução tampão citrato (pH 6,0). A revelação foi obtida através do cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Dako). As lâminas foram analisadas por dois observadores quanto ao percentual de células neoplásicas positivas e quanto à intensidade de marcação em ausente, discreta e acentuada. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada somente nos casos com dados de sobrevida pós-cirúrgica para correlação prognóstica.

### **Dados de sobrevida**

A avaliação da sobrevida foi realizada a partir da contagem em dias da data da cirurgia de amputação ou preservação do membro até o óbito decorrente da morte natural ou eutanásia relacionada ao neoplasma. As informações referentes a estes dados foram obtidas por meio de prontuários clínicos, quando completos, de qualquer ano dentro do período de estudo e por meio do contato telefônico com os tutores de cães com diagnóstico de osteossarcoma no período de 2015 a 2018. Estes cães foram acompanhados por um período mínimo de 24 meses e máximo 36 meses após a cirurgia.

Para o estudo de fatores prognósticos, somente foram considerados os dados de sobrevida de cães que além da cirurgia de amputação ou preservação do membro, também foram submetidos a um mesmo protocolo de quimioterapia adjuvante. Foram excluídos desta análise cães com diagnóstico de metástase distante na avaliação clínica inicial, sem quimioterapia adjuvante e com óbito no trans-operatório ou de causas não relacionadas ao neoplasma.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram analisados e descritos em frequências e porcentagens para as variáveis categóricas e em médias e medianas para as variáveis numéricas contínuas. Para a avaliação de fatores prognósticos, os dados de sobrevida dos cães submetidos à cirurgia e a quimioterapia adjuvante foram confrontados com os parâmetros clínicos (peso, idade, sexo, local anatômico e modalidade terapêutica), histopatológicos (classificação histológica, contagem mitótica e grau histológico) e imuno-histoquímico (osteopontina). Para estas análises, utilizou-se o teste de Log Rank (Mantel-Cox) do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi  $< 0,05$ . As análises de sobrevivência foram realizadas através das curvas de Kaplan Meier.

### **Resultados**

Durante o período de 2008 a 2018, foram analisadas 225 amostras com diagnóstico de osteossarcoma de um total de 28.523 amostras provenientes de biópsias e necropsias em cães, entre as quais 15.238 tiveram o diagnóstico de neoplasma. O osteossarcoma acometeu o tecido ósseo em 187 (83%) casos, e, entre esses, 153 (82%) envolviam o esqueleto apendicular.

### **Caracterização clínica e anatomopatológica**

A idade dos caninos afetados, informada em 132 casos, variou de 1 a 15 anos com uma média e mediana de 9 anos. As fêmeas foram acometidas em 79 casos (52%) e machos em 73 casos (48%), em um canino este dado não foi informado. Informações quanto às raças envolvidas constavam em 150 casos, no quais cães sem raça definida foram predominantemente afetados (58/150), seguidos por Rottweiler (39/150), Fila Brasileiro (8/150), Labrador (6/150), Golden Retriever (5/150), Pastor Alemão (5/150), Boxer (4/150), Akita Inu (4/150), Cocker Spaniel Inglês (3/150), Pitbull (2/150),

Dálmata (2/150), Cane Corso (2/150) e Poodle (2/150). Foi observado também o acometimento individual nas seguintes raças: São Bernardo, Dobermann Pinscher, Husky Siberiano, Weimaraner, American Staffordshire Terrier, Dog Alemão, Basset Hound, Beagle, Dachshund e Fox Terrier Brasileiro. O peso corporal, informado em 41 casos, variou de 9,2 a 56 kg com uma média de 33,4 kg e mediana de 35 kg.

Quanto ao membro acometido (152/153), o membro torácico foi acometido em 83 casos (54,6%) e o membro pélvico em 69 casos (45,4%), em um caso este dado não foi obtido. As informações referentes ao osso acometido foram obtidas em 134 casos (87%). O osteossarcoma ocorreu no úmero (31%, n=42), fêmur (23%, n=31), rádio (19%, n=25), tíbia (14%, n=19), ulna (3%, n=4), falange (2%, n=3), ísquio (2%, n=3), metacarpo (1,5%, n=2), ílio (1,5%, n=2), tarso (1,5%, n=2) e metatarso (1%, n=1). As informações referentes às extremidades foram obtidas no úmero (38/42), fêmur (27/31), rádio (23/25) e tíbia (16/19), das quais 95% eram proximais do úmero, 70% distais do fêmur, 96% distais do rádio e 56% proximais da tíbia (Figura 1A – 1D). Quanto às regiões para o desenvolvimento do osteossarcoma, essas puderam ser determinadas em 72 casos, dos quais 63% ocorreram em metáfise, 19% em epífise e 18% em diáfise.

Na avaliação histológica, verificou-se que 57% (87/153) dos osteossarcomas eram osteoblásticos [produtivo (75%, 65/87) e não produtivo (25%, 22/87)], 14% (21/153) eram condroblásticos, 12% (18/153) eram telangiectásicos, 8% (12/153) eram fibroblásticos, 5% (8/153) eram ricos em células gigantes e 4% (7/153) eram pouco diferenciados (Figura 2A – 2F).

O linfonodo regional foi avaliado em 28 biópsias excisionais constituídas por membros inteiros, com metástases nodais identificadas em 14% (4/28) dos casos no momento do diagnóstico histopatológico. Metástases em sítios distantes foram analisadas em 52 casos por exames de imagem (n=9) e necropsia (n=43), as quais foram confirmadas em 75% dos casos (39/52), com envolvimento dos pulmões (43%), rins (14%), baço (10%), linfonodos (9%), ossos (8%), fígado (6%), coração (5%), adrenais (3%), cerebelo (1%) e medula óssea (1%), em sítios únicos ou múltiplos.

### **Avaliação da sobrevida e de fatores prognósticos**

Os dados de sobrevida foram obtidos em 29 casos do total (29/153). Deste, somente os dados de sobrevida de 22 cães submetidos à cirurgia de amputação (n=16) ou preservação do membro (n=6) associados à quimioterapia adjuvante foram utilizados para correlação prognóstica (Tabela 1). Cães submetidos somente à amputação (7/29)



foram excluídos da análise de fatores prognósticos, devido a um menor tempo de sobrevida em relação às demais modalidades terapêuticas ( $p=0,01$ ). A sobrevida para estes casos variou de 31 a 780 dias, com média e mediana de 170 e 60 dias respectivamente. Por sua vez, não houve diferença estatística significativa na sobrevida de cães amputados ou preservados ( $p=0,20$ ), desde que submetidos a quimioterapia adjuvante. A sobrevida destes cães variou de 73 a 1185 dias, com média e mediana de 394 e 242 dias respectivamente. Quatro cães foram censurados da análise prognóstica, pois estavam vivos aos 24 e 36 meses de acompanhamento pós-cirúrgico.

Na avaliação clínica, o peso corporal ( $p=0,81$ ), a idade ( $p=0,73$ ), o sexo ( $p=0,46$ ) e o membro ( $p=0,48$ ) não influenciaram na sobrevida. Cães com osteossarcoma na extremidade distal, independentemente do osso acometido, tiveram uma tendência a uma maior sobrevida ( $p=0,06$ ). Para estes casos, a taxa de sobrevida em um ano foi de 46,7%, enquanto que na extremidade proximal a taxa foi de 14,3%. Nenhum cão com osteossarcoma na extremidade proximal sobreviveu mais de 446 dias. O osso acometido pelo neoplasma não influenciou na sobrevida ( $p=0,23$ ); no entanto, observou-se que cães com osteossarcoma no úmero apresentaram uma menor sobrevida em relação aos demais locais (rádio e ulna, tibia e fíbula e fêmur). Aos 446 dias, a probabilidade de sobrevida conforme o osso acometido foi de 40% para tibia e fíbula, 22,6% para rádio e ulna, 16,7% para fêmur e nula para úmero.

Dos casos avaliados com relação à sobrevida, verificou-se ainda que 14% (3/22) eram de grau I, 32% (7/22) eram de grau II e 54% (12/22) eram de grau III. Na avaliação histopatológica, a classificação histológica ( $p=0,08$ ), a contagem de figuras de mitoses ( $p=0,24$ ) e o grau histológico ( $p=0,73$ ) não influenciaram na sobrevida dos caninos afetados.

Na avaliação imuno-histoquímica para osteopontina, todos os casos apresentaram marcação citoplasmática difusa discreta ( $n=5$ ) e acentuada ( $n=17$ ), em 50 a 100 % das células neoplásicas (Figura 3A e 3B). Dados de metástases foram obtidos em 10/22 casos e uma marcação acentuada para osteopontina foi observada em 80% (8/10) dos casos; no entanto, essa correlação não foi possível devido ao número limitado de dados completos para a análise. Adicionalmente, 15/17 casos com marcação acentuada para osteopontina apresentaram graus histológicos elevados (II e III). Quanto a análise de fatores prognósticos, a intensidade de marcação ( $p=0,66$ ) e o percentual de células neoplásicas ( $p=0,49$ ) não influenciaram na sobrevida de cães com osteossarcoma apendicular.

## Discussão

Dentre os neoplasmas ósseos caninos, o osteossarcoma é o mais comumente diagnosticado na espécie (BRODEY; RISER, 1969; CAVALCANTI *et al.*, 2004). O esqueleto apendicular foi o local anatômico de maior importância (82%), assim como os prévios relatos na literatura (BRODEY; RISER, 1969; CAVALCANTI *et al.*, 2004).

Os cães adultos a senis foram os mais atingidos pelo osteossarcoma e a média de idade de nove anos foi semelhante a descrita por outros autores (SELMIC *et al.*, 2014; NAGAMINE *et al.*, 2015). Estudo anterior relata uma média de idade inferior a deste trabalho (BRODEY; RISER, 1969), em partes pela maior longevidade atingida pelos pacientes caninos atribuídas às práticas de terapia avançada e maiores cuidados pelos seus tutores. Houve uma grande variação na idade dos cães deste estudo (1 a 15 anos), também constatada em outros trabalhos (SCHOTT *et al.*, 2018). Fêmeas foram discretamente mais afetadas do que machos no presente estudo; todavia, não há uma predileção sexual aparente do neoplasma em caninos (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; NAGAMINE *et al.*, 2015).

Cães de grande porte, como as raças Rottweiler, Fila Brasileiro e Labrador, foram os mais afetados pelo neoplasma, de forma similar a outros estudos (DALECK *et al.*, 2016; SCHOTT *et al.*, 2018). A suscetibilidade de cães da raça Rottweiler para o desenvolvimento do osteossarcoma foi previamente associada a índices elevados de expressão do gene p53 mutado (LOUKOPOULOS; THORNTON; ROBINSON, 2003). Outra hipótese para essa maior frequência está associada ao fechamento tardio das placas epifisárias, o que torna estas regiões mais suscetíveis a pequenos e múltiplos traumas capazes de promover uma indução mitogênica (EHRHART; RYAN; FAN, 2013).

O membro torácico foi o mais acometido neste estudo, compondo 83 casos no total, de forma similar ao descrito por outros autores (SELMIC *et al.*, 2014; DALECK *et al.*, 2016). Isso provavelmente se deu devido ao fato que em caninos aproximadamente 60% do peso corporal está distribuído neste local (DALECK *et al.*, 2016). Semelhante ao descrito na literatura, as metáfises do úmero, fêmur, rádio e tíbia foram os locais mais acometidos pelo osteossarcoma (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; SCHOTT *et al.*, 2018), assim como as principais extremidades acometidas pelo neoplasma (distantes do cotovelo e próximas ao joelho) foram similares às descritas por outros autores. Cães com osteossarcoma na extremidade proximal dos membros

apresentaram uma tendência a um pior prognóstico, assim como descrito previamente (SCHOTT *et al.*, 2018), e isso possivelmente ocorreu devido à dificuldade de obter margens cirúrgicas seguras.

Metástases para linfonodos regionais foram pouco frequentes neste estudo, o que corrobora com os resultados descritos na literatura (HILLERS *et al.*, 2005; SCHOTT *et al.*, 2018), em partes porque a principal via de disseminação do osteossarcoma é a via hematogena (THOMPSON; DITTMER, 2017). Embora raro, as metástases nodais quando ocorrem estão associadas a um prognóstico ruim (HILLERS *et al.*, 2005). Assim como constatado em outros trabalhos (SELMIC *et al.*, 2014; THOMPSON; DITTMER, 2017; SCHOTT *et al.*, 2018), a principal causa de morte dos cães com osteossarcoma apendicular deste estudo foi a disseminação metastática, sendo o pulmão o principal órgão acometido.

Embora cães com diagnóstico de osteossarcoma submetidos à cirurgia e à quimioterapia possam ter uma sobrevida de até um ano (BERG *et al.*, 1992; MORELLO; MARTANO; BURACCO, 2011), quatro cães deste estudo encontravam-se vivos com dois anos ou mais após o procedimento cirúrgico. A amputação ou a cirurgia de preservação do membro quando associada à quimioterapia não influenciou na sobrevida dos cães com o neoplasma, de forma similar ao descrito previamente (STRAW; WITHROW, 1996). A amputação como única modalidade terapêutica deste estudo foi um indicador de mau prognóstico para cães com osteossarcoma apendicular, com uma média de 170 dias de sobrevida, de forma similar ao descrito na literatura (SPODNICK *et al.*, 1992; THOMPSON; FUGENT, 1992).

O osteossarcoma osteoblástico foi o mais frequente no presente estudo, tanto na forma produtiva como não produtiva (57%), de forma similar a estudos prévios (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007; NAGAMINE *et al.*, 2015). Todavia, a classificação histológica em subtipos não teve influência na sobrevida dos cães e, portanto, no prognóstico das neoplasias, similarmente a um estudo recente (NAGAMINE *et al.*, 2015). De forma distinta, estudos prévios têm reportado que o subtipo fibroblástico apresenta um prognóstico relativamente favorável, enquanto o subtipo telangiectásico um prognóstico ruim (MISDORP; HART, 1979; HAMMER *et al.*, 1995). Embora a classificação por subtipo histológico considere um padrão histológico predominante, um padrão subdominante de maior malignidade pode estar presente (NAGAMINE *et al.*, 2015; THOMPSON; DITTMER, 2017). Sendo assim,

estudos que avaliem o prognóstico dos subtipos mistos são necessários para elucidar esta questão.

A maioria dos osteossarcomas graduados deste estudo apresentou graus histológicos elevados (II e III), conforme descrito na literatura (LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007). Todavia, esses graus histológicos não influenciaram na sobrevida de cães com osteossarcoma apendicular, de forma similar a outros estudos (SCHOTT *et al.*, 2018). Isso possivelmente ocorreu devido à disparidade entre os observadores para determinar o grau, a falta de padronização dos sistemas de graduação disponíveis na literatura (SCHOTT *et al.*, 2018) e a variabilidade histológica em uma mesma amostra (THOMPSON; DITTMER, 2017).

Osteopontina é uma fosfoproteína não colágena que facilita a interação com a matriz extracelular (SHEVDE; SAMANT, 2014) e pode ser produzida por osteoblastos e osteoclastos normais em fases específicas de diferenciação celular (MERRY *et al.*, 1993; DODDS *et al.*, 1995). Em neoplasmas, níveis de expressão celular elevados de osteopontina estão associados à invasão, progressão e metástases e a um menor tempo de sobrevida (KRUGER *et al.*, 2014; SHEVDE; SAMANT, 2014). No presente estudo, obteve-se marcação para osteopontina em todos os casos de osteossarcoma canino analisados (22), de forma similar aos resultados obtidos por outros autores (OZMEN; HALIGUR; IPEK, 2015). Assim como no osteossarcoma em humanos (SULZBACHER *et al.*, 2002), a intensidade de marcação e o percentual de células neoplásicas não influenciaram na sobrevida dos cães afetados, de forma que uma correlação prognóstica positiva não foi observada. Com base no comportamento biológico do osteossarcoma e no potencial para metástases, a expressão desta proteína pode estar associada ao mecanismo para o desenvolvimento de metástases, visto que em 80% dos casos com metástases houve marcação acentuada para osteopontina.

## **Conclusão**

O osteossarcoma apendicular acometeu predominantemente cães idosos e sem predileção sexual. Cães de grande porte e de raças puras, principalmente Rottweiler, foram mais acometidos pelo neoplasma. Os principais locais acometidos foram: proximal do úmero (95%), distal do fêmur (70%), distal do rádio (96%) e proximal da tíbia (56%), predominantemente em metáfises. O osteossarcoma osteoblástico foi o subtipo histológico mais frequentemente diagnosticado. Metástases para linfonodos regionais foram incomuns. Metástases para os pulmões foram comuns em caninos com

o neoplasma. O peso, a idade, o sexo, o membro e osso acometido, a classificação histológica, a contagem de figuras de mitoses, o grau histológico e a imuno-marcação da osteopontina não foram fatores prognósticos para osteossarcomas. Cães submetidos somente à amputação apresentaram um prognóstico desfavorável, enquanto técnicas cirúrgicas aliadas à quimioterapia foram medidas importantes para uma maior sobrevida, sejam elas radicais (amputação) ou mais conservadoras. A osteopontina foi um importante marcador para amostras de osteossarcoma canino, visto que em 80% dos casos com metástases houve marcação acentuada para osteopontina.

### **Referências bibliográficas**

BERG, J.; WEINSTEIN, M. J.; SCHELLING, S. H.; RAND, W. M. Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb-sparing surgery: 22 cases (1987-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 12, p. 2005-2008, 1992.

BOERMAN, I.; SELVARAJAH, G. T.; NIELEN, M.; KIRPENSTEIJN, J. Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma—a meta-analysis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 56, 2012.

BRODEY, R. S.; RISER, W. Canine osteosarcoma: A clinicopathological study of 194 cases. **Clinical Orthopaedics and Related Research**.v.62, p.54-64, 1969.

CAVALCANTI, J. N.; AMSTALDEN, E. M. I.; GUERRA, J. L.; MAGNA, L. C. Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 299-305, 2004.

DALECK, C. A.; RAPETTI, C. S. F.; MINTO, B. W.; COSTA NETO, J. M. Tumores ósseos. In: DALECK, C.A.; DENARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos**, 2<sup>o</sup>ed., Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016,p. 836-856.

DODDS, R. A.; CONNOR, J. R.; JAMES, I. E.; LEE RYKACZEWSKI, E.; APPELBAUM, E.; DUL, E.; GOWEN, M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 11, p. 1666-1680, 1995.

- EHRHART, N.P.; RYAN, S.D.; FAN, T.M. Tumors of the Skeletal System. In: Withrow, S.; Vail, D.; Page, R. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 5<sup>th</sup> ed., Saunders Elsevier, 2013, p. 463-505.
- HAMMER, A. S.; WEEREN, F. R.; WEISBRODE, S. E.; PADGETT, S. L. Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 1995.
- HILLERS, K. R.; DERNELL, W. S.; LAFFERTY, M. H.; WITHROW, S. J.; LANA, S. E. Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986–2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1364-1367, 2005.
- ITALIANO, A. Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 35, p. 4718, 2011.
- KRUGER, T. E.; MILLER, A. H.; GODWIN, A. K.; WANG, J. Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. **Critical reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 2, p. 330-341, 2014.
- LOUKOPOULOS, P.; ROBINSON, W. F. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 1, p. 65-73, 2007.
- LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 237-248, 2003.
- MERRY, K.; DODDS, R.; LITTLEWOOD, A.; GOWEN, M. Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone. **Journal of Cell Science**, v. 104, n. 4, p. 1013-1020, 1993.
- MISDORP, W.; HART, A.A. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.62, n.3, p.537–545, 1979.

MORELLO, E.; MARTANO, M.; BURACCO, P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 3, p. 268-277, 2011.

NAGAMINE, E.; HIRAYAMA, K.; MATSUDA, K.; OKAMOTO, M.; OHMACHI, T.; KADOSAWA, T.; TANIYAMA, H. Diversity of histologic patterns and expression of cytoskeletal proteins in canine skeletal osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 5, p. 977-984, 2015.

OZMEN, O.; HALIGUR, M.; IPEK, V. Immunohistochemical expression of osteopontin in canine and feline tumors. **Revue Médecine Vétérinaire**, p. 2-10, 2015.

SCHOTT, C. R.; TATIERSKY, L. J.; FOSTER, R. A.; WOOD, G. A. Histologic grade does not predict outcome in dogs with appendicular osteosarcoma receiving the standard of care. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 2, p. 202-211, 2018.

SELMIC, L. E.; BURTON, J. H.; THAMM, D. H.; WITHROW, S. J.; LANA, S. E. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 554-563, 2014.

SHEVDE, L.A.; SAMANT, R.S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. **Matrix Biology**, v. 37, p. 131–141, 2014.

SLAYTER, M. V.; BOOSINGER, T. R.; POOL, R. R.; DAMMRICH, K.; MISDORP, W.; LARSEN, S. Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals. In: **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. 2<sup>nd</sup> ed., Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and World Health organization, 1994. 59p.

SPODNICK, G. J.; BERG, J.; RAND, W. M.; SCHELLING, S. H.; COUTO, G.; HARVEY, H. J.; HENDERSON, R. A.; MACEWEN, G.; MAULDIN, N.; MCCAWE, D. L. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 995-999, 1992.

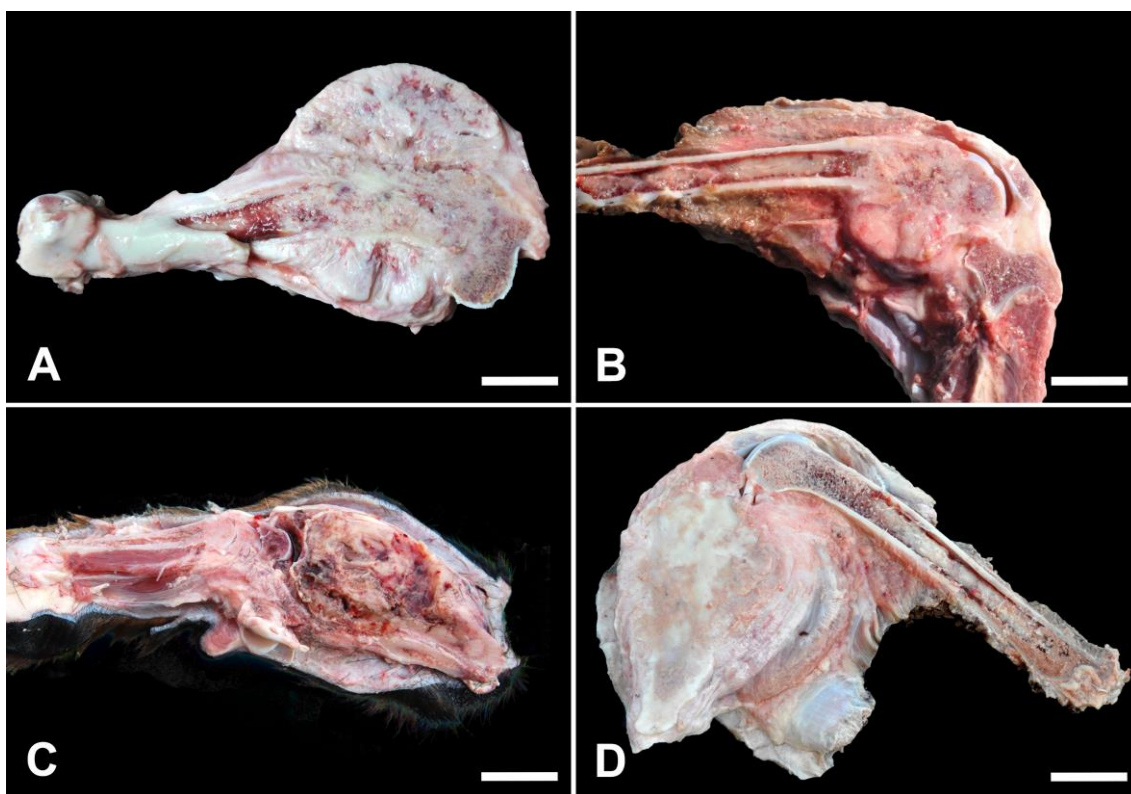
STRAW, R. C.; WITHROW, S. J. Limb-sparing surgery versus amputation for dogs with bone tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 135-143, 1996.

SULZBACHER, I.; BIRNER, P.; TRIEB, K.; LANG, S.; CHOTT, A. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. **Virchows Archiv**, v. 441, n. 4, p. 345-349, 2002.

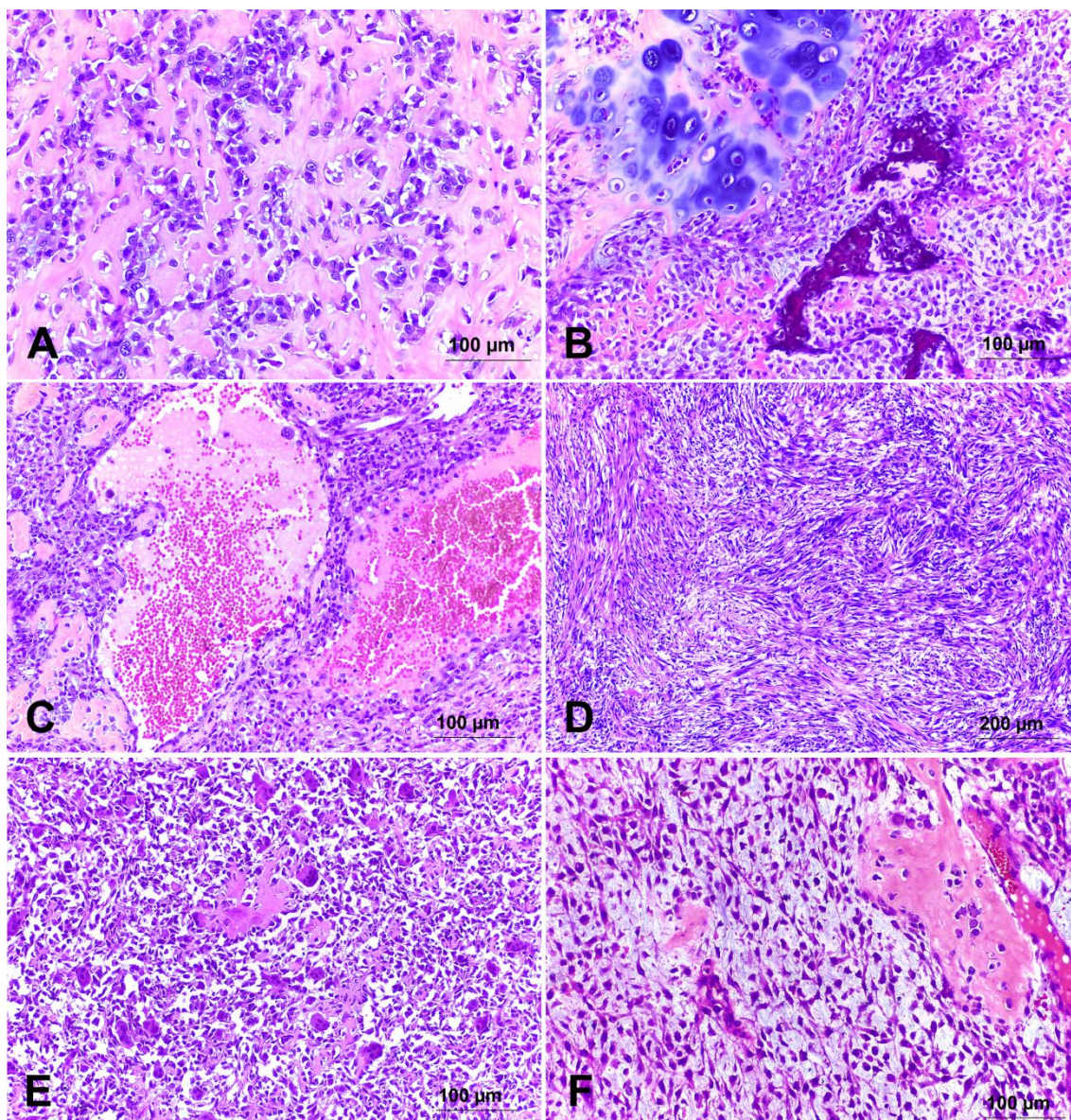
THOMPSON, K.G.; DITTMER, K. Tumors of bone. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**.5<sup>th</sup>.ed., John Wiley& Sons Inc, 2017. p.356-424.

THOMPSON, J. P.; FUGENT, M. J. Evaluation of survival times after limb amputation, with and without subsequent administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 4, p. 531-533, 1992.





**Figura 1.** Principais localizações anatômicas do osteossarcoma apendicular em cães. (A) Osteossarcoma em úmero proximal. Massa brancacenta em região de metáfise estendendo-se para diáfise e epífise proximal (Bar, 2,5 cm). (B) Osteossarcoma em fêmur distal. Massa brancacenta em região de metáfise (Bar, 3 cm). (C) Osteossarcoma em rádio distal. Massa brancacenta com áreas multifocais avermelhadas em região de metáfise (Bar, 4 cm). (D) Osteossarcoma em tíbia proximal. Massa brancacenta em região de metáfise estendendo-se para diáfise e epífise proximal (Bar, 3,5 cm).

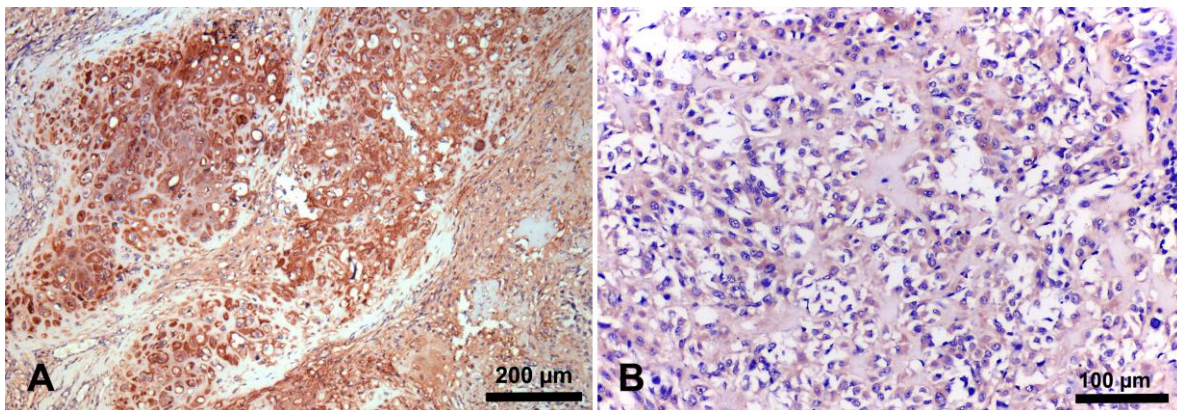


**Figura 2.** Classificação por subtipos histológicos do osteossarcoma apendicular canino. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) (A – F). **(A)** Osteoblástico produtivo. As células neoplásicas são poligonais e estão entremeadas por acentuada matriz eosinofílica (osteóide). (Bar, 100  $\mu$ m). **(B)** Condroblástico. Há proliferação neoplásica de células mesenquimais em meio a moderada quantidade de matriz condroide e osteóide além de áreas multifocais de mineralização (Bar, 100  $\mu$ m). **(C)** Telangiectásico. As células neoplásicas forma espaços vasculares preenchidos por hemácias (Bar, 100  $\mu$ m). **(D)** Fibroblástico. As células neoplásicas são fusiformes e estão dispostas em feixes coesos em diferentes direções (Bar, 200  $\mu$ m). **(E)**. Rico em células gigantes. Em meio ao neoplasma há acentuada quantidade de células gigantes multinucleadas (Bar, 100  $\mu$ m). **(F)** Pouco diferenciado. As células neoplásicas variam de fusiformes a estreladas e se arranjam de maneira frouxa.

**Tabela 1.** Dados clínicos, anatomopatológicos, imuno-histoquímicos e de sobrevida de cães com osteossarcoma apendicular diagnosticados entre 2008 a 2018.

Casos	Raça	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	Local Anatômico	Subtipo histológico	Grau	OPN	Metástases	Terapêutica	Sobrevida (dias)
1	Boxer	12	F	26	Úmero proximal	Osteoblástico	III	Acentuado	-	AQ	73
2	Rottweiler	8	F	38	Úmero distal	Telangiectásico	III	Acentuado	Pulmão, rim e baço <sup>(b)</sup>	AQ	74
3	SRD	7	F	26	Tíbia proximal	Osteoblástico	II	Discreto	Pulmão e osso <sup>(a)</sup>	AQ	78
4	SRD	10	M	27	Úmero proximal	Osteoblástico	III	Acentuado	-	AQ	85
5	SRD	3	F	14	Fêmur distal	Condrolástico	III	Acentuado	Pulmão, rim, coração e cerebelo <sup>(b)</sup>	AQ	95
6	Rottweiler	6	M	48	Fêmur proximal	Telangiectásico	II	Acentuado	Pulmão e linfonodo <sup>(b)</sup>	PQ	133
7	Rottweiler	10	F	39	Rádio distal	Fibroblástico	I	Acentuado	-	PQ	133
8	Fila Brasileiro	10	F	48	Rádio distal	Osteoblástico	III	Acentuado	Pulmão, rim e linfonodo <sup>(b)</sup>	PQ	140
9	Dog Alemão	8	F	40	Rádio distal	Osteoblástico	III	Acentuado	Pulmão <sup>(a)</sup>	AQ	144
10	Rottweiler	8	M	51	Fêmur distal	Osteoblástico	III	Discreto	-	AQ	154
11	SRD	8	M	33	Fêmur distal	Pouco diferenciado	II	Acentuado	Pulmão, rim, baço, coração e adrenal <sup>(b)</sup>	PQ	242
12	Rottweiler	7	M	35	Tíbia proximal	Condrolástico	II	Acentuado	Fígado e baço <sup>(b)</sup>	AQ	270
13	Pastor Alemão	13	F	38	Fêmur proximal	Condrolástico	III	Acentuado	-	AQ	270
14	SRD	10	F	21	Tíbia distal	Osteoblástico	III	Acentuado	Pulmão <sup>(a)</sup>	PQ	300
15	Dálmata	12	M	29	Rádio distal	Osteoblástico	II	Discreto	-	PQ	320
16	Rottweiler	6	F	38	Rádio distal	Condrolástico	I	Acentuado	-	AQ	442
17	Fila Brasileiro	12	F	50	Úmero proximal	Osteoblástico	II	Discreto	Pulmão <sup>(a)</sup>	AQ	446
18	Fila Brasileiro	6	M	56	Ulna distal	Rico em células gigantes	II	Acentuado	-	AQ	540
19	Fila Brasileiro	10	M	42	Rádio distal	Condrolástico	III	Acentuado	-	AQ	897*
20	Cane Corso	8	F	38	Fêmur distal	Osteoblástico	III	Acentuado	-	AQ	1083*
21	SRD	8	F	14	Tíbia distal	Condrolástico	III	Acentuado	-	AQ	1177*
22	SRD	10	M	22	Tíbia distal	Pouco diferenciado	I	Discreto	-	AQ	1185*

SRD: sem raça definida; F: fêmea; M: macho; OPN: osteopontina; AQ: amputação e quimioterapia; PQ: preservação e quimioterapia; (\*) animais vivos ao término do estudo; <sup>(a)</sup>: avaliado por exame de imagem; <sup>(b)</sup>: avaliado por necropsia e análise histopatológica.



**Figura 3.** Imuno-marcação anti-osteopontina do osteossarcoma apendicular canino. **(A)** Acentuada marcação citoplasmática difusa em células mesenquimais neoplásicas no osteossarcoma condroblástico (Bar 200  $\mu\text{m}$ ). **(B)** Discreta marcação citoplasmática difusa em células mesenquimais neoplásicas no osteossarcoma osteoblástico (Bar 100  $\mu\text{m}$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

1. O osteossarcoma no esqueleto apendicular foi o mais frequente em caninos.
2. O osteossarcoma extraesquelético ocorreu predominantemente em fêmeas idosas. As raças puras foram mais acometidas, mas nenhuma predileção racial foi observada.
3. O osteossarcoma no esqueleto apendicular ocorreu predominantemente em cães idosos e sem predileção sexual. Cães de grande porte e de raças puras, principalmente Rottweiler, foram mais acometidos pelo neoplasma.
4. Os principais locais acometidos pelo osteossarcoma extraesquelético foram: glândula mamária, seguidos pelo tecido subcutâneo e pelo fígado.
5. Os principais locais acometidos pelo osteossarcoma esquelético apendicular foram: úmero proximal, seguidos pelo fêmur distal, rádio distal e tibia proximal, predominantemente em metáfises.
6. O osteossarcoma osteoblástico de graus II e III foi a classificação histológica mais frequente para os osteossarcomas extraesqueléticos e esqueléticos.
7. Metástases para os linfonodos regionais foram incomuns para o osteossarcoma, embora a frequência para metástases nodais do osteossarcoma extraesquelético de glândula mamária tenha sido discretamente maior em relação ao osteossarcoma do esqueleto apendicular.
8. Metástases para os pulmões foram frequentes principalmente para os osteossarcomas extraesquelético de glândula mamária e esquelético apendicular.

9. Quanto aos fatores prognósticos: o peso, a idade, o sexo, o membro e osso acometido, a classificação histológica, a contagem de figuras de mitoses, o grau histológico e a imuno-marcação para a osteopontina não foram fatores prognósticos para os osteossarcomas apendiculares.
10. Cães submetidos somente à amputação tiveram um prognóstico desfavorável, enquanto técnicas cirúrgicas aliadas à quimioterapia foram medidas importantes para uma maior sobrevida, sejam elas radicais (amputação) ou mais conservadoras.
11. A osteopontina foi um importante marcador para amostras de osteossarcoma canino, visto que 80% dos casos com metástases houve marcação acentuada para osteopontina.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKWITH, K. *et al.* Osteosarcoma of the canine head: a retrospective analysis of 136 cases (1991–2008). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 1, p. e10-e11, 2011.

BERG, J. *et al.* Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb-sparing surgery: 22 cases (1987-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 12, p. 2005-2008, 1992.

BOERMAN, I. *et al.* Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma – a meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 8, p. 1-12, 2012.

BRODEY, R. S.; RISER, W. Canine osteosarcoma: A clinicopathological study of 194 cases. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v.62, p.54-64, 1969.

BROGDON, J. D. *et al.* Parosteal osteosarcoma of the mandible in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 8, p. 1079-1081, 1989.

CAVALCANTI, J. N. *et al.* Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 299-305, 2004.

COOK, J. L. *et al.* Periosteal osteosarcoma in the long head of the triceps in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 4, p. 317-320, 1995.

DALECK, C. A. *et al.* Tumores ósseos. In: DALECK, C.A.; DENARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos**, 2.ed.Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016, p. 836-856.

DICKERSON, M. E. *et al.* Retrospective analysis of axial skeleton osteosarcoma in 22 large-breed dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 2, p. 120-124, 2001.

DOBSON, J. M. *et al.* Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, n. 6, p. 240-246, 2002.

DODDS, R. A. *et al.* Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 11, p. 1666-1680, 1995.

EHRHART, N.P.; RYAN, S.D.; FAN, T.M. Tumors of the Skeletal System. In: Withrow, S.; Vail, D.; Page, R. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 5.ed. St. Louis, Missouri : Saunders Elsevier, 2013, p. 463-505.

GÂRJOABĂ, I. *et al.* Extraskelital osteosarcoma in dogs: presentation of two cases. **Lucrari Științifice-Universitatea de Științe Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara**, v. 42, n. 2, p. 107-110, 2009.

GOUVÊA, A. S. *et al.* Pedicle frozen autograft for limb sparing surgery in a dog with femoral osteosarcoma. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2206-2209, 2016.

GRIFFITH, J. W. *et al.* Parosteal osteosarcoma with pulmonary metastases in a cat. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 123-125, 1984.

HAMMER, A. S. *et al.* Prognostic factors in dogs with osteosarcomas of the flat or irregular bones. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 1995.

HEATH, S.; RANKIN, A.; DUBIELZIG, R. Primary ocular osteosarcoma in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.6, n.1, p.85-87, 2003.

HILLERS, K. R. *et al.* Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986–2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1364-1367, 2005.

ITALIANO, A. Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions!. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 35, p. 4718-4718, 2011.



- KALLIANPUR, A.A. *et al.* Osteosarcoma of breast: A rare case of extraskeletal osteosarcoma. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.9, p.292-294, 2013.
- KIRPENSTEIJN *et al.* Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v.39, n. 2, p. 240-246, 2002.
- KRUGER, T. E. *et al.* Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 2, p. 330-341, 2014.
- KUNTZ, C. A. *et al.* Extraskeletal osteosarcomas in dogs: 14 Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.34, p. 26-30, 1998.
- LANGENBACH, A. *et al.* Extraskeletal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986–1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.34, p.113-120, 1998.
- LEE, S.Y. *et al.* A review of 40 patients with extraskeletal osteosarcoma. **Cancer**, v.76, p.2253-2259, 1995.
- LIEBICH, H. G. *et al.* Introdução e anatomia geral. In: KÖNIG, H.E; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 6.ed. Porto Alegre : Artmed Editora, 2016. p.1-52.
- LOUKOPOULOS, P.; ROBINSON, W.F. Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v.136, p.65-73, 2007.
- LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 237-248, 2003.
- MARDANPOUR, K.; RAHBAR, M.; MARDANPOUR, S. Coexistence of HER2, Ki67, and p53 in osteosarcoma: a strong prognostic factor. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 8, p. 210-214, 2016.
- MERRY, K. *et al.* Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone. **Journal of Cell Science**, v. 104, n. 4, p. 1013-1020, 1993.

- MISDORP, W.; HART, A.A. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.62, n.3, p.537–545, 1979.
- MORELLO, E.; MARTANO, M.; BURACCO, P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 3, p. 268-277, 2011.
- MUNDAY, J. S. *et al.* Renal osteosarcoma in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, n. 12, p. 618-622, 2004.
- NAGAMINE *et al.* Diversity of histologic patterns and expression of cytoskeletal proteins in canine skeletal osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v.52.n.5, p.977-984, 2015.
- OZMEN, O.; HALIGUR, M.; IPEK, V. Immunohistochemical expression of osteopontin in canine and feline tumors. **Revue Médecine Vétérinaire**, p. 2-10, 2015.
- PATNAIK, A. K. Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcoma: a clinicopathologic study of 14 cases. **Veterinary Pathology**, v.27, p.46-55, 1990.
- RITTLING, S. R.; CHAMBERS, A. F. Role of osteopontin in tumour progression. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 10, p. 1877, 2004.
- SCHOTT, C. R. *et al.* Histologic grade does not predict outcome in dogs with appendicular osteosarcoma receiving the standard of care. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 2, p. 202-211, 2018.
- SELMIC, L. E. *et al.* Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 554-563, 2014.
- SELVARAJAH, G. T.; KIRPENSTEIJN, J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 28-35, 2010.
- SHEVDE, L.A.; SAMANT, R.S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. **Matrix Biology**, v. 37, p. 131–141, 2014.

SLAYTER, M.V. *et al.* Histological classification of bone and joint tumors of domestic animals. In: **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. 2.ed. Washington: Armed forces institute of pathology, American registry of pathology and World health organization, 1994. p.1-47.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 3, p. 279-303, 2000.

SPODNICK, G. J. *et al.* Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 995-999, 1992.

SPUGNINI, E. P.; RUSLANDER, D.; BARTOLAZZI, A. Extraskelatal osteosarcoma in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 1, p. 60-62, 2001.

STRAW, R. C. *et al.* Canine mandibular osteosarcoma: 51 cases (1980-1992). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 3, p. 257-262, 1996.

STRAW, R. C.; WITHROW, S. J. Limb-sparing surgery versus amputation for dogs with bone tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 135-143, 1996.

STRAW, R.C.; WITHROW, S.; POWERS, B. Management of canine appendicular osteosarcoma. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n.4, p.1141-1161, 1990.

SULZBACHER, I. *et al.* Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. **Virchows Archiv**, v. 441, n. 4, p. 345-349, 2002.

SZEWCZYK, M.; LECHOWSKI, R.; ZABIELSKA, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment?—review. **Veterinary research communications**, v. 39, n. 1, p. 61-67, 2015.

THOMAS, W.B.; DANIEL, G.B.; MCGAVIN, M. D. Parosteal osteosarcoma of the cervical vertebra in a dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 38, n. 2, p. 120-123, 1997.

THOMPSON, K.G.; DITTMER, K. Tumors of bone. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5.ed. Ames:John Wiley & Sons Inc, 2017. p.356-424.

THOMPSON, J. P.; FUGENT, M. J. Evaluation of survival times after limb amputation, with and without subsequent administration of cisplatin, for treatment of appendicular osteosarcoma in dogs: 30 cases (1979-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 4, p. 531-533, 1992.

THOMPSON, K.G.; POOL, R.R. Tumors of the bones. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p.246-317.

THOMSEN, B. V.; MYERS, R. K. Extraskelatal osteosarcoma of the mandibular salivary gland in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 1, p. 71-73, 1999.

WAI, P.Y.; KUO, P.C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 27, p. 103–118, 2008.

WEBER, G. F. The cancer biomarker osteopontin: combination with other markers. **Cancer Genomics-Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 263-288, 2011.

WEHRLE-MARTINEZ, A. S. *et al.* Osteocalcin and osteonectin expression in canine osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 4, p. 781-787, 2016.

WITHROW, S.J. *et al.* Comparative aspects of osteosarcoma. Dog versus man. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 270, p. 159-168, 1991.

WOLDEMESKEL, M.W.; GRICE, C.D. Pathology in practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.238, n.3, p.297-299, 2011.

ZARUBY, J. F.; WILLIAMS, J. W.; LOVERING, S. L. Periosteal osteosarcoma of the scapula in a horse. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 34, n. 12, p. 742-744, 1993.