

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO**

**MICROMETÁSTASES DE TUMORES EPITELIAIS NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES
E GATOS: REVISÃO**

Taís Farias Dolfini

**PORTO ALEGRE
2016/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO**

**MICROMETÁSTASES DE TUMORES EPITELIAIS NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES
E GATOS: REVISÃO**

Autor: Taís Farias Dolfini

Orientador: Prof. Dr. Stella de Faria Valle

Co-orientador: M. V. Juliana Pereira Matheus

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Veterinária como requisito parcial
para obtenção da Graduação em Medicina
Veterinária**

PORTO ALEGRE

2016/1

AGRADECIMENTOS

À todos aqueles sem os quais a realização deste sonho não seria possível.

Ao meu esposo Marcelo Cunha, pelo apoio incondicional, pelos incentivos e por estar sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, tornando esse sonho uma realidade.

À minha família por ter me dado uma base forte e me mostrado a importância dos estudos.

À minha orientadora, professora Stella de Faria Valle, e à minha coorientadora, Juliana Pereira Matheus, por me ajudarem na realização deste trabalho, pela paciência e tempo dedicado não só com o trabalho de conclusão do curso, mas também durante o período que estagiei no LACVET - Laboratório de Análises clínicas Veterinárias UFRGS.

Aos professores Ana Paula Ravazzolo, Rui Félix Lopes, Stella de Faria Valle e Luciana Branquinho Queiroga os quais tive a honra de estagiar. Obrigada por dividirem comigo os seus conhecimentos, pelo exemplo de dedicação e carinho na profissão e por me trazerem a certeza de que escolhi o caminho certo para mim.

Aos meus amigos da Faculdade de Veterinária que tornaram o dia-a-dia mais leve e que levarei para a vida toda.

A todos meus amigos, que aceitaram meus inúmeros “nãos” em finais de semestres e também compartilharam comigo muitos momentos de alegria, sempre que possível.

À minha família de pelo, Fuzarka, Bellinha, Kalinka, Mahara e Katy Maria Perry por me ensinarem coisas que humano algum poderia ensinar.

RESUMO

Com o aumento da longevidade dos animais domésticos, o número de casos diagnosticados de neoplasias também vem crescendo e se tornando uma rotina no atendimento clínico. Entretanto, na medicina veterinária, o pequeno número de pesquisas buscando novos marcadores prognósticos e preditivos para neoplasias revelam um imenso campo de pesquisa a ser desenvolvido quando comparados a medicina humana, onde casos de micrometástases de tumores sólidos não hematológicos na medula óssea têm sido amplamente descritos desde metade do século passado, relacionando a presença dessas células tumorais com o processo de carcinogênese e a progressão tumoral. Mais recentemente, estudos na medicina veterinária vêm sendo desenvolvidos e publicados comprovando que em animais de companhia também pode ocorrer micrometástases em medula óssea. Diferenciar neoplasias e identificar a presença de micrometástases na medula óssea previamente ao diagnóstico clínico ou radiológico é de extrema importância para um prognóstico e tratamento adequado do paciente. A presente revisão tem como objetivo expor a relevância da detecção de micrometástases em animais domésticos, assim como métodos de detecção, frequência dos casos apresentada em estudos, relação com a sobrevivência dos pacientes e perspectivas futuras na medicina veterinária.

Palavras chaves: mielopatia, tumores sólidos, células tumorais disseminadas.

ABSTRACT

With the increasing longevity of domestic animals, the number of diagnosed cases of neoplasia is also growing and becoming a routine in clinical care. However, in veterinary medicine, little research looking for new prognostic and predictive markers for neoplasia reveals an immense field to be developed when compared to human medicine, where cases of micrometastasis of non-hematologic solid tumors in the bone marrow have been extensively described since half of the last century, relating the presence of these tumor cells with the process of carcinogenesis and tumor progression. More recently, studies in veterinary medicine have been developed and published showing that micrometastasis in the bone marrow may also occur in pets. Differentiating neoplasias and identifying the presence of micrometastasis in the bone marrow prior to clinical and radiological diagnosis is of utmost importance for the prognosis and treatment of the patient. This review aims to expose the relevance of micrometastasis detection in domestic animals, as well as the development of detection methods, frequency of cases presented in studies related to patient survival and future prospects in veterinary medicine.

Keywords: bone marrow disorders, solid tumors, disseminated tumor cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Imunohistoquímica para citoqueratina no esfregaço de medula óssea de uma cadela com uma pequena massa mamária e coagulação intravascular disseminada usando anticorpo monoclonal humano para citoqueratina MNF116 (detecção de citoqueratinas 5, 6, 8, 17, e, provavelmente, 19) a partir de Dako, França. Cromogênio diaminobenzidina. Objetiva 100 x com óleo de imersão..... 20

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CID – Coagulação intravascular disseminada

CK – Citoqueratina

cm - Centímetro

CTC – Célula tumoral circulante

CTD – Célula tumoral disseminada

DRM – Doença residual mínima

Kg – Quilograma

mL - Mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	CASCATA METASTÁTICA.....	10
3	MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA.....	11
4	MICROMETÁSTASES EM MEDULA ÓSSEA.....	13
5	MÉTODOS DE DETECÇÃO DIAGNÓSTICA.....	15
5.1	Aspirado de medula óssea.....	16
5.2	Mielograma.....	17
5.3	Imunocitoquímica.....	17
5.3.1	Citoqueratinas.....	18
6	FREQUÊNCIA DE ESTUDOS RELACIONADOS E PERSPECTIVAS PARA A MEDICINA VETERINÁRIA.....	19
7	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da longevidade dos animais domésticos, o número de casos diagnosticados de neoplasias também vem crescendo e se tornando uma rotina no atendimento clínico (PAOLONI; KHANNA, 2007). Dados da literatura internacional sugerem que cerca de quatro milhões de cães e quatro milhões de gatos são diagnosticados com câncer anualmente (HANSEN; KHANNA, 2004). Um estudo realizado na região metropolitana de São Paulo identificou o câncer como a segunda maior causa de mortes em cães (13,28%), ficando atrás, somente, de doenças infecciosas (35,11%) (BENTUBO *et al.*, 2007).

Animais domésticos e humanos compartilham semelhantes estruturas anatômicas, respostas fisiológicas, e processos patogênicos. Além disso, há influência sobre população animal em relação ao espaço geográfico, status econômico, distribuição e história natural de doenças, bem como o acesso a serviços de saúde (PAOLONI; KHANNA, 2007).

Tumores em cães e humanos possuem muitas características similares, incluindo aparência, genética histológica tumoral, alvos moleculares, comportamento biológico, e resposta a terapias convencionais. A iniciação e a progressão tumoral são influenciadas por fatores semelhantes, incluindo a idade, nutrição, sexo, status reprodutivo e fatores ambientais (PAOLONI; KHANNA, 2007). Além disso, genoma do cão e o genoma do ser humano são semelhantes o suficiente para sugerir que as informações obtidas sobre uma espécie podem ser transferidas e aplicadas à outra (PAOLONI; KHANNA, 2007).

Na medicina humana, casos de micrometástases de tumores não hematológicos na medula óssea têm sido amplamente descritos desde metade do século passado, relacionando a presença dessas células tumorais com o processo de carcinogênese e a progressão tumoral (OLIVEIRA, 2009). Mais recentemente, estudos na medicina veterinária vêm sendo desenvolvidos e publicados comprovando que em animais de companhia também pode ocorrer micrometástases em medula óssea. Diferenciar essas neoplasias e identificar a presença de micrometástases na medula óssea (MO) antes que a doença seja detectada clinicamente ou radiologicamente é de extrema importância para um prognóstico e tratamento adequado (LEONG; TSENG, 2014).

Nesse íterim, esta revisão objetiva reportar a importância da detecção de micrometástases de tumores não hematológicos na medula óssea de animais domésticos, bem como seus métodos de detecção, frequência de casos relatados em estudos, relação com a sobrevida dos pacientes e perspectivas futuras na medicina veterinária.

2 CASCATA METASTÁTICA

Metástase é a disseminação de células neoplásicas para outros órgãos aonde irão se proliferar até formar massas macroscópicas (ARGYLE; KHANNA, 2013). Mesmo nos momentos iniciais de crescimento do tumor, as células tumorais podem migrar pelo tecido conjuntivo perineoplásico e atingir as correntes linfáticas e sanguíneas mais próximas, iniciando o processo de metástase precocemente, visto que essas células já podem apresentar um fenótipo metastático quando ainda estão no sítio primário (PANTEL; BRAKENHOFF, 2004).

O processo metastático inclui vários passos seqüenciais. Inicialmente, a célula tumoral precisa entrar e sobreviver na circulação, podendo fazer isso por via hematogena ou linfática. Chegando ao órgão, ela precisa migrar da circulação para o tecido, onde terá que sobreviver e se proliferar, e para tal, necessita de um microambiente favorável com aporte sanguíneo adequado (ARGYLE; KHANNA, 2013).

O conceito do nicho pré-metastático sugere que um tumor primário modula o microambiente do sítio secundário antes da chegada da maioria das células metastáticas. Essa modulação parece ser conseguida através da mobilização e do recrutamento de células primárias específicas, derivadas da medula óssea, para o microambiente secundário. Tais células de origem mielóide expressam fator de crescimento vascular endotelial. Curiosamente, os sítios de metástase tumoral parecem ter preferência por locais onde as células mielóides são recrutadas primeiro. Sobrevivendo no sítio distante, as células tumorais devem se proliferar e modular seu novo meio ambiente para que ocorra a progressão das lesões metastáticas. Estudos em andamento provavelmente irão descobrir uma maior relação entre populações de células recrutadas, nicho pré-metastático e potenciais alvos para terapias antimetastáticas (ARGYLE; KHANNA, 2013).

No sítio metastático pode-se encontrar células tumorais isoladas, micrometástases pré angiogênicas ou grandes metástases vascularizadas (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). As células tumorais também podem ir para um sítio temporário. Nesse caso, podem se apresentar em estado de dormência e possuem uma grande variação em relação ao tempo e à distância para desenvolver a metástase (ARGYLE; KHANNA, 2013).

Células tumorais apresentam um tropismo específico por determinados órgãos. Isso se deve a características tanto das células quanto dos órgãos. O fluxo sanguíneo também é um fator determinante para o sítio de metástase. Sua direção e o diâmetro de capilares podem determinar o local de armazenamento das células tumorais e possíveis metástases. As células

tumorais normalmente são bem maiores que as células sanguíneas e ficam retidas em alguns capilares. Essa é a forma mecânica que determina a permanências dessas células em um órgão, mas se a metástase irá se desenvolver naquele local vai depender de interações moleculares entre célula e órgão (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

Metástases podem aparecer até anos após o tratamento do tumor primário através de células em estado de dormência que resistem a terapias contra o câncer que focam na multiplicação celular (ARGYLE; KHANNA, 2013).

3 MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA

A medula óssea (em ossos longos, costelas, vértebras, pelve, crânio e esterno) é o centro primário da função hematopoiética. É um órgão difuso, volumoso, distribuído ao longo das cavidades ósseas, que está continuamente em atividade. Responsável pela formação, maturação e renovação das células sanguíneas (eritrócitos, plaquetas e granulócitos) e fagocitose e degradação de partículas (SAMUELSON, 2007).

No processo de degradação de partículas, ocorre o aprisionamento e fagocitose das células hematopoiéticas envelhecidas e de células não hematopoiéticas que sofreram apoptose. No caso das células tumorais, estas não sofrem apoptose e continuam retidas na medula, encontrando um meio propício para a sua sobrevivência (RIETHDORF; WIKMAN; PANTEL, 2008).

A medula óssea é subdividida em dois compartimentos: o compartimento vascular, que é composto por artérias veias e sinusóides, e o compartimento hematopoiético onde estão localizadas as células hematopoiéticas (células tronco e células sanguíneas imaturas) e a adventíciais. As células adventíciais e as pequenas fibras reticulares proporcionam suporte estrutural e ambiente adequado para a formação e o desenvolvimento das células sanguíneas (SAMUELSON, 2007).

A matriz estromal da medula óssea (adipócitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e fibras reticulares - colágeno tipo III), é responsável por muitos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e componentes de matriz extracelular que regulam o processo hematopoiético e as células progenitoras hematopoiéticas, promovendo a proliferação e diferenciação (KAPLAN; PSAILA; LYDEN, 2006).

A proliferação de células-tronco e sua diferenciação são amplamente guiadas por fatores específicos de origem local e sistêmica. As interleucinas 1 (IL-1), 3 (IL-3) e 6 (IL-6) são citocinas que estimulam a atividade mitótica das células-tronco hematopoiéticas. Além

disso, fatores de estimulação de colônias específicos, como a eritropoetina e o fator de estimulação de colônia granulocítica, promovem a mitose e a subsequente diferenciação das células unipotentes (SAMUELSON, 2007).

O fator de crescimento endotelial vascular e seus receptores atuam na formação de novos vasos, assim como na manutenção vascular. Tem importante papel tanto no osso como na medula óssea, influenciando o crescimento de células hematopoéticas e na formação óssea (KAPLAN; PSAILA; LYDEN, 2006).

Dondossola *et al.* (2013) evidenciou que células derivadas da medula óssea CD13 positivas, uma protease ligada à membrana, representam uma população de células imunitárias pró-angiogênicas implicadas na formação de vasos sanguíneos associados a tumores.

A complexa interação celular envolvendo células hematopoéticas, células estromais e células-tronco com fatores de crescimento, citocinas, fatores estimuladores de colônias, entre outros, permite e estimula a proliferação celular e vascular. Isso torna a medula óssea um tecido propício ao desenvolvimento e manutenção de tumores metastáticos (ORAZI; O'MALLEY; ARBER, 2006).

Assim é sustentado o conceito de especificidade entre células tumorais e órgãos através de interações locais entre eles evidenciando a forte influência do microambiente (FIDLER, 1999). Analisando essas informações, podemos concluir que a possível permanência das células tumorais na medula óssea somada a presença de fatores que promovem a proliferação e diferenciação celular e vascular proporcionam um ambiente fértil para o desenvolvimento de micrometástases (FRANCO *et al.*, 2010).

A medula óssea desempenha um importante papel como órgão indicador de doença residual mínima (DRM). Além disso, parece ser um órgão que abriga as células tumorais disseminadas (CTDs), podendo funcionar como um reservatório com capacidade de reintroduzi-las na corrente sanguínea, possibilitando a ida para órgãos distantes e o desenvolvimento de recorrências locais (PANTEL; BRAKENHOFF, 2004).

Existem ainda outros fatores hipotéticos sobre a influência do microambiente da medula óssea na manutenção de células tumorais e no desenvolvimento de metástases. Uma delas é que células derivadas da medula óssea poderiam regular genes responsáveis por iniciar a cascata metastática. Outra é que células da linhagem tumoral e células da linhagem mielóide poderiam se fundir, gerando uma subpopulação de células tumorais com maior ou menor grau de malignidade (PAWELEK; CHAKRABORTY, 2008).

A fusão é um mecanismo não mutacional que pode explicar a expressão de genes aberrantes. Muitas moléculas associadas com progressão tumoral são também expressas em células mielóides saudáveis, agindo diretamente em processos de angiogênese, motilidade, quimiotaxia, tropismo, sinalização imune, degradação e remodelação da matriz, respostas à hipóxia e resistência a drogas quimioterápicas (PAWELEK, 2005). Essas hipóteses só fortalecem a importância que a medula óssea tem na cascata metastática.

4 MICROMETÁSTASES EM MEDULA ÓSSEA

Micrometástases são formadas por células tumorais identificadas por histopatologia convencional (coloração hematoxilina-eosina e/ou imunocitoquímica) que propagam através do sistema linfovascular (LEONG; TSENG, 2014). Na maioria das vezes, as micrometástases possuem uma progressão ordenada de crescimento que vai do sítio primário para o linfonodo sentinela e linfonodos regionais, para só então terem uma distribuição para órgãos mais distantes através da medula óssea e do sangue. Entretanto, em 15-20% dos casos essas células tumorais entram diretamente para corrente sanguínea e medula óssea, se disseminando para órgãos distantes do sítio inicial do tumor (LEONG; TSENG, 2014).

A importância na detecção das micrometástases é que a maioria dos pacientes que desenvolvem tumores não vem a óbito com o tumor primário e sim com as metástases que desenvolvem anos depois do tratamento (JANNI *et al.*, 2005).

Células tumorais encontradas na medula óssea são conhecidas como CTDs. Elas podem extravasar para a circulação sanguínea ou funcionar como reservatório de células tumorais em estado de dormência (GORGES; PANTEL, 2013). Estão associadas à recidiva e ao desenvolvimento posterior de doença metastática em sítios distantes, bem como na menor sobrevida e em um pior prognóstico (BRAUN *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2010). A presença de CTDs é um fator de mau prognóstico, tanto para o desfecho do paciente quanto para a resposta ao tratamento (RIETHDORF; WIKMAN; PANTEL, 2008; PANTEL; BRAKENHOFF; BRANDT, 2008).

Células tumorais circulantes (CTCs) são células que se despreendem do tumor primário ou de suas metástases e se distribuem no sangue periférico, podendo ser úteis como biomarcadores. Em seres humanos, a pesquisa dessas células é realizada utilizando a reação de transcrição reversa, seguida da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) que, devido sua baixa concentração no sangue, se mostrou relevante para o prognóstico e a monitorização do

sucesso terapêutico. Estão correlacionadas com a diminuição da sobrevida (CRISCITIELLO; SOTIRIOU; IGNATIADIS, 2010).

O prognóstico dos pacientes com carcinoma, por exemplo, mesmo em casos de pequenos tumores primários, é limitado pela freqüente ocorrência de recidiva metastática. Isto é causado pela DRM na presença de CTCs e/ ou CTDs. Para identificar estas células na medula óssea, nódulos linfáticos e sangue, foram desenvolvidas técnicas específicas de detecção (PANTEL; BRAKENHOFF; BRANDT, 2008; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES; RIETHDORF, 2009). Descobertas anteriores sugerem também que CTDs / CTCs são capazes de sobreviver à quimioterapia e a radioterapia por persistirem em um estado de dormência não proliferativa ao longo de muitos anos, o que está provavelmente relacionado com um aumento do risco de recidiva metastática (MULLER *et al.*, 2005; SLADE *et al.*, 2005).

Embora a maioria dos resultados sobre a relevância clínica das CTDs / CTCs foram obtidos a partir de pacientes com tumor de mama, há cada vez mais evidências para um papel fulcral dessa análise também em pacientes com outros tumores sólidos (PANTEL; ALIX-PANABIÈRES; RIETHDORF, 2009).

Micrometástases representam a fisiopatologia da doença residual mínima que eventualmente levará ao desenvolvimento de metástases e à recidiva da doença. No entanto, elas não podem ser detectadas por métodos convencionais de estadiamento e podem não reagir aos tratamentos quimioterápicos (HIRSCH-GINSBERG, 1998). Pequenos aglomerados de células cancerígenas podem ser encontrados em uma grande proporção de aspirados de medula óssea de pacientes acometidos por vários tumores epiteliais, mesmo sem nenhuma evidência de metástase (BRAUN; PANTEL, 1999).

Em humanos, as neoplasias não hematógenas que mais freqüentemente fazem micrometástases em medula óssea são as de próstata, de mama, carcinoma de pulmão, neuroblastoma, sarcoma de Ewing / tumor neuroectodérmico periférico, rhabdomiosarcoma e melanoma maligno (PAPAC, 1994). Em cães, o tumor mais freqüentemente encontrado é o tumor de mama (TEDARDI *et al.*, 2014).

A presença dessas células tumorais representa fator prognóstico significativo de diminuição da sobrevida, tempo livre de doença e tempo livre de metástase à distância durante um período de seguimento de 10 anos (BRAUN; AUER; MARTH, 2009). Em animais domésticos, estamos carentes de estudos de freqüência dessa enfermidade. A maior parte dos estudos publicados relata casos isolados, que muitas vezes apresentam as micrometástases em medula óssea como um achado acidental. Porém sabe-se que, em cadelas, o tumor mamário é o mais freqüente e que muitas vezes torna-se fatal devido ao desenvolvimento de metástases

distantes. Também se sabe que existem semelhanças entre as espécies, tanto no aspecto clínico como no molecular (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999; KLOPFLEISCH *et al.*, 2010).

As CTDs podem permanecer em proliferação ou estarem em estado de repouso. Independentemente dessa condição, a presença de CTD tem sido associada com um estágio avançado do tumor, células tumorais pouco diferenciadas, metástase linfonodal e expressão ausente ou baixa de receptores hormonais (PANTEL; BRAKENHOFF; BRANDT, 2008).

O sucesso da terapia adjuvante é baseado na habilidade de erradicação de metástases ocultas, assim como de células tumorais disseminadas, antes que elas se tornem clinicamente evidentes (BECKER S, 2006). Frequentemente é observada a resistência de algumas células à quimioterapia que, enquanto permanecem na medula óssea, apresentam-se muitas vezes em estado de dormência, fora da atividade mitótica, conseqüentemente livres dos efeitos dos quimioterápicos anti-neoplásicos (BRAUN; AUER; MARTH, 2009). Sendo assim, se mostra de suma importância o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para atuar especificamente na doença microscópica (BECKER *et al.*, 2006).

5 MÉTODOS DE DETECÇÃO DIAGNÓSTICA

Tumores de origem epitelial são comumente encontrados em pacientes veterinários. Seu diagnóstico precoce é importante tanto para o prognóstico quanto para o tratamento adequado. Falhas no tratamento podem ocorrer devido a não detecção de metástases que podem estar presente mesmo em diagnóstico precoce (TAYLOR *et al.*, 2013).

Em humanos, a presença de células epiteliais nos aspirados de medula óssea são detectáveis em todos os tipos de carcinomas, com uma prevalência média de aproximadamente 30 a 35% (FUNKE; SCHRAUT, 1998). No entanto, em veterinária, são raros os estudos que detectam micrometástases em medula óssea (HENSON *et al.*, 1998).

Um dos problemas enfrentados é a falta de padronização nos métodos diagnósticos. As diferenças metodológicas e de escolha de marcadores e anticorpos usados nas detecções das células tumorais vem causando controvérsias em pesquisas e resultados (JANNI *et al.*, 2005).

As CTDs encontradas na medula óssea estão associadas à menor sobrevida, menores chances de cura, menor tempo de remissão e maior risco de desenvolvimento de metástases em sítios distantes. Isso evidencia a importância de sua detecção precoce (BRAUN *et al.*, 2005; DA COSTA *et al.*, 2011; JANNI *et al.*, 2011).

Um número considerável de técnicas de detecção de células raras foi desenvolvido durante os últimos anos e estão sendo continuamente melhoradas. Estas técnicas ajudam na detecção de CTDs na medula óssea e de CTCs no sangue periférico de pacientes com câncer, mesmo anos antes da ocorrência de metástases distantes evidentes. No entanto, a análise das CTDs / CTCs ainda não faz parte do estadiamento do tumor na prática clínica humana (RIETHDORF; PANTEL, 2010) e veterinária (TAYLOR *et al.*, 2013). Isto ocorre, principalmente, devido à baixa concentração dessas células e a conseqüente dificuldade de detecção com os métodos atualmente disponíveis, especialmente em pacientes com tumores em fase inicial. Portanto, novas abordagens precisam ser avaliadas para aumentar a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade deste tipo de diagnóstico (RIETHDORF; PANTEL, 2010).

Como exemplo, tem-se a técnica de bloco celular, que é um método de enriquecimento que concentra as células do aspirado de medula óssea, auxiliando na detecção, já que muitos marcadores ainda não foram estabelecidos. Também permite um exame mais rápido e eficaz, pois concentra as células em uma área pequena de fácil visualização quando comparada ao método citológico convencional. Além disso, o bloco celular pode ser armazenado para novas futuras avaliações (TAYLOR *et al.*, 2013).

O diagnóstico de CTCs / CTDs pode ser utilizado para avaliação de prognóstico, estratificação de pacientes com riscos de recidivas para terapias diferenciais, além servir como biomarcador para o monitoramento em tempo real da eficácia de terapias sistêmicas e auxiliar no estudo de novas terapias alvos (RIETHDORF; PANTEL, 2010).

5.1 Aspirado de medula óssea

A coleta de medula óssea é indicada para detectar anormalidades que não são reconhecidas através do esfregaço sanguíneo de rotina, na detecção de tumores linfóides e mielóides, em casos de síndrome mielodisplásica, e para auxiliar no estadiamento de neoplasias hematopoiéticas e carcinomas (MORITZ *et al.*, 2010).

O local de aspiração mais utilizado em cães e gatos é a crista ilíaca e o úmero proximal. O aspirado realizado a partir da crista ilíaca de cães pode ser feito com o animal em estação e acordado. Cães ansiosos ou agressivos necessitam de sedação ou anestesia geral. Gatos geralmente precisam ser anestesiados. Para a coleta de medula óssea dessa espécie, a posição adequada é decúbito esternal, com os membros posteriores dobrados ao lado do corpo. A coleta no úmero proximal de ambas as espécies é realizada em decúbito lateral.

O local da coleta deverá ser tricotomizado e preparado assepticamente. Cerca de 1-2 mL de uma solução de lidocaína a 20% é utilizado para a anestesia local em todos os tecidos, especialmente no periósteo. Pode-se utilizar agulha gauge 16-18 com cânula de punção Klima Rosegger de 2,5 cm, agulha Rosenthal ou Illinois.

Para a aspiração na crista ilíaca, a maior proeminência da asa do íleo deve ser palpada. A agulha é inserida com movimentos lentos de rotação, em um ângulo 45°, paralelo ao eixo longitudinal do íleo. Ao atingir a medula óssea, pode ocorrer uma breve reação de dor. Após a remoção do mandril, uma seringa de 10 mL é acoplada e se aspira aproximadamente 0,5 mL de medula óssea. Amostras sem anticoagulantes produzem os melhores resultados na coloração. No entanto, os esfregaços devem ser preparados imediatamente após a coleta.

5.2 Mielograma

Mielograma é o exame para a avaliação da medula óssea, realizado através de citologia aspirativa. Ele tem sido amplamente utilizado no diagnóstico das doenças do sistema hematopoiético, no estadiamento das neoplasias e na pesquisa de parasitas. Além disso, pode ser utilizado para procedimentos terapêuticos (coleta de material e infusão de substâncias) (ALENCAR *et al.*, 2002).

Após a coleta da medula óssea, o material é transferido para uma placa de Petri possibilitando a melhor visualização das espículas medulares. Com um capilar de micro-hematócrito, captura-se esses fragmentos e, em seguida, transfere-se o conteúdo do tubo capilar para uma lâmina, coloca-se sobre ela outra lâmina que irá deslizar sobre o material, com o objetivo de deixar o maior número de espículas no centro da lâmina. Para finalizar, podem ser realizadas técnicas de coloração específicas e/ou imunocitoquímica para auxiliar na avaliação citológica (ALENCAR *et al.*, 2002).

5.3 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica é uma técnica que detecta materiais específicos, especialmente de natureza proteínica, dentro de células, respectivamente. A técnica envolve o acoplamento de anticorpos (derivados de outras espécies) contra antígenos específicos (uma enzima, citocina, ou outra molécula). Os anticorpos, por sua vez, são tipicamente marcados com um marcador colorido para microscopia óptica ou um traçador eletrodenso para microscopia eletrônica de transmissão. Sua precisão a torna uma ferramenta potente, que está sendo cada vez mais

utilizada na medicina veterinária. Com esse método, os patologistas conseguem diagnosticar determinadas doenças e diferenciar populações celulares, por exemplo (SAMUELSON, 2007).

A imunocitoquímica facilita a localização das CTDs e possibilita a identificação de neoplasias de diferentes origens, além de permitir a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores, produtos de genes, etc.) que estão relacionados ao comportamento biológico das neoplasias (ZUCCARI, 2001).

A detecção por imunocitoquímica não apenas permite a caracterização celular (tamanho, forma, relação núcleo:citoplasma), mas também permite a identificação da localização celular de uma imunorreação específica.

5.3.1 Citoqueratinas

Por causa da ausência de um marcador específico para antígenos de células tumorais, antígenos específicos de epitélio, tais como citoqueratinas (CK) associada ao citoesqueleto, moléculas de adesão da superfície e receptores de fatores de crescimento, ainda são os marcadores de escolha para a detecção de CTC (LACROIX, 2006).

As CKs são proteínas de queratina que compõem os filamentos intermediários encontrados no citoesqueleto dos tecidos epiteliais saudáveis e dos tecidos tumorais. A família das CKs são compostas por pelo menos 20 polipeptídeos. Com base nisso, são numeradas de 1- 20, possuindo diferentes pesos moleculares e pHs. As CKs 1 a 8 são chamadas de tipo II e apresentam pH básico, formam pares com suas CKs homólogas que são classificadas de 9 a 20 e que apresentam pH ácido.

A expressão dessas CKs é freqüente em órgão ou tecido específico. Podem ser de grande utilidade em testes imunohistoquímicos, já que células tumorais geralmente expressam as CKs do órgão que são originadas. Através de anticorpos monoclonais específicos, as CKs são empregadas para detectar e distinguir a origem de células tumorais, sendo úteis no diagnóstico diferencial de carcinomas (MONTEROS *et al.*, 1999). A medula óssea em condições fisiológicas não deve conter células positivas para CKs, portanto elas podem ser empregadas na detecção de células epiteliais em medula óssea (TAYLOR *et al.*, 2013).

Para fazer a identificação da origem epitelial das CTDs em cães, são utilizados anticorpos monoclonais anti-citoqueratina humana, capazes de reconhecer um amplo espectro de CKs expressadas durante a diferenciação epitelial (HOINGHAUS; HEWICKER-TRAUTWEIN; MISCHKE, 2007).

Métodos de enriquecimento por imunohistoquímica ou técnicas moleculares já são utilizados na medicina humana para detecção de CTDs (TAYLOR *et al.*, 2013). A vantagem da imunohistoquímica é que permite, além da detecção, a avaliação morfológica das células. Em contra partida, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica mais sensível (TAYLOR *et al.*, 2013).

Estudos evidenciam que anticorpos para CKs humano são imunoreativos em tecidos de caninos e felinos demonstrando reatividade cruzada entre anticorpos de filamentos intermediários entre essas espécies e possibilitando a utilização para diagnóstico de carcinomas nessas espécies (VOS *et al.*, 1993; MULAS *et al.*, 1995; MONTEROS *et al.*, 1999; TAYLOR *et al.*, 2013).

6 FREQUENCIA DE ESTUDOS RELATADOS E PERSPECTIVAS PARA A MEDICINA VETERINÁRIA

Tumores em cães apresentam histopatologia e comportamento biológico semelhantes àqueles que acometem humanos, além dos fatores epidemiológicos, clinicopatológicos e bioquímicos serem similares (KUMARAGURUPARAN; PRATHIBA; NAGINI, 2006). Por esse motivo, as pesquisas na medicina humana podem servir de inspiração para novos trabalhos em veterinária e vice e versa.

Henson *et al.* (1998), diagnosticaram um adenocarcinoma metastático através do exame citológico do aspirado de medula óssea de um cão. Os achados foram elevada celularidade, aglomerados de células epiteliais com pleomorfismo, anisocariose, cromatina grosseira e figuras de mitoses.

Mischke *et al.* (2003) detectaram células epiteliais de colangiocarcinoma na medula óssea de um cão através de exame citológico e imunocitológico com anticorpos para CK7 e CK20, que já haviam sido avaliadas para uso em cães por Monteros *et al.* (1999).

Um estudo analisando a ocorrência de metástases locais, proximais e à distância, em sete cadelas com carcinoma mamário, identificou células tumorais na medula óssea de um dos animais, através da utilização de CKs nos testes imunohistoquímicos (ESPINOSA DE LOS MONTEROS *et al.*, 2003).

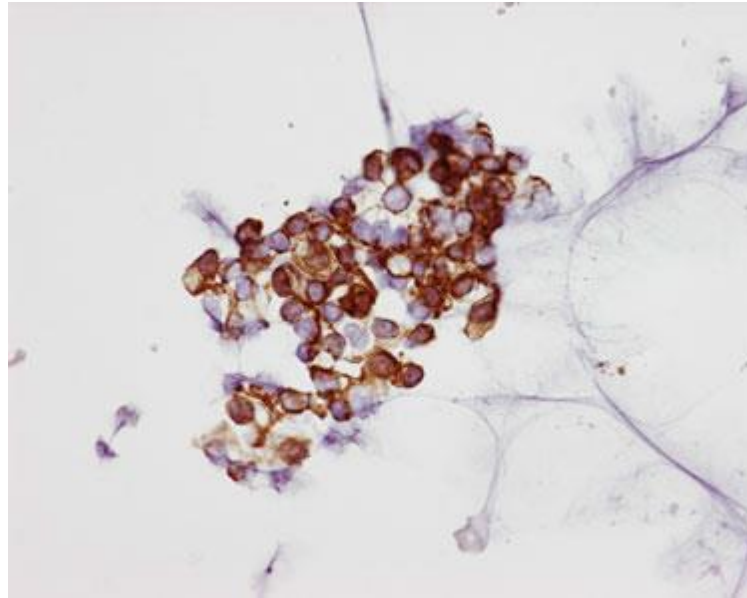
Jaillardon *et al.* (2012) relataram o caso de uma cadela de 7 anos que havia removido uma massa mamária há sete meses e apresentava prostração, mucosas pálidas e numerosas petéquias e hematomas. O aspirado de medula óssea continha grandes células atípicas contendo elevada relação núcleo:citoplasma, núcleos ovais, múltiplos e proeminentes e

citoplasma basofílico com projeções das vilosidades. Na análise imunocitoquímica, foram utilizados anticorpos monoclonais humanos anti-citoqueratina, apresentando imunorreatividade. O diagnóstico foi de carcinoma mamário com coagulação intravascular disseminada (CID), células tumorais disseminadas na medula óssea e células tumorais circulantes no sangue. Esse foi o primeiro relato de carcinoma mamário canino com CTCs e CID secundária ao tumor de mama. Devido à deterioração clínica e o mau prognóstico, o cão foi eutanasiado.

Weishaar *et al.* (2014) descreveram o caso de um Golden Retriever que após a remoção de uma massa sobre o ombro esquerdo, diagnosticada histologicamente como osteossarcoma, sofreu um procedimento de aspirado de medula, realizado com o intuito de avaliar a anemia e a trombocitopenia. O mielograma revelou hipoplasia eritróide, hiperplasia mielóide com um predominância de precursores primários e um subconjunto de células não-classificáveis que representavam 20% da população total. Tais células foram descritas apresentando citoplasma moderadamente basofílico e vacuolizado, núcleos predominantemente individuais e deslocados, cromatina grosseira com um único nucléolo. Foi então realizado exame imunocitoquímico nas amostras de medula óssea e as células anormais foram positivas para vimentina, confirmando sua origem mesenquimal. O cão foi eutanasiado devido à piora na condição clínica e no exame post-mortem, foram encontradas metástases generalizadas envolvendo pulmões, fígado, rim, coração, e medula óssea. Histopatologicamente as lesões tumorais foram classificadas como malignas e formadas por duas populações distintas: lipossarcoma e osteossarcoma, consistente com mesenquimoma maligno.

Piane *et al.* (2014) relataram o caso de uma fêmea, canina, 7 anos com carcinoma mamário que, a avaliação citológica da medula óssea, revelou uma população de células coesas e organizadas, com características altamente sugestivas de células epiteliais com marcada anisocitose e anisocariose. O exame imunoistoquímico foi positivo para CK (figura 1).

Figura 1 - Imunoistoquímica para CK no esfregaço de medula óssea de uma cadela com uma pequena massa mamária e CID usando anticorpo monoclonal humano para citoqueratina MNF116. Objetiva 100 x com óleo de imersão.



Fonte: (PIANE *et al.* 2014)

Em humanos, as CTDs também estão sendo analisadas para presença de células tronco tumorais através de marcadores CD44 e CD24 (LINet *et al.*, 2011). É possível que a fusão entre células tumorais e células mielóides sejam uma fonte de células-tronco do câncer (MARHABA; ZÖLLER, 2004) evidenciando o quão ampla pode ser a relação entre medula óssea e metástase tumoral.

A alta prevalência de células tronco tumorais pode justificar a reincidência da doença após um longo período. A identificação dessas células é importante para um nova abordagem terapêutica, melhor controle em longo prazo e maior sobrevida do paciente (MARHABA; ZÖLLER, 2004; REUBEN; LEE; GAO, 2011). Estudos para esses marcadores em veterinária podem ser de suma importância (TAYLOR *et al.*, 2013).

Na oncologia veterinária, os estudos sobre o valor preditivo de CTCs ainda não estão disponíveis. No entanto, estudos recentes têm sido capazes de identificar um conjunto de potenciais marcadores de CTCs em tumores mamários caninos mostrando uma possibilidade promissora de uso para diagnóstico, prognóstico e monitorização de tratamento em animais (KLOPFLEISCH *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013).

Uma nova proposta de detecção de micrometástases na medula foi realizada por Wetterwald *et al.*, 2001. Na sua pesquisa foram injetadas células tumorais acrescidas de luciferase no ventrículo esquerdo de ratos, simulando a propagação metastática. A bioluminescência facilitou a detecção microscópica de células tumorais e permitiu a monitoração contínua do animal em relação ao crescimento metastático. A proposta desse

método é acelerar a compreensão dos eventos moleculares das metástases e avaliar novas terapias que visem reprimir as metástases no seu estágio inicial.

Na medicina veterinária em especial, o pequeno número de pesquisas, buscando novos marcadores prognósticos e preditivos para neoplasias revela um imenso campo de pesquisa a ser desenvolvido (ZUCCARI *et al.*, 2008).

7 CONCLUSÃO

É importante despertar o interesse da comunidade científica sobre este tema para que mais estudos, com números representativos de pacientes, sejam realizados. Com objetivo de alcançar maiores conhecimentos sobre a necessidade real de determinar a presença de células tumorais em medula óssea, identificar marcadores adequados para a detecção em animais, avaliar o valor prático da pesquisa de micrometástases em medula óssea de cães e gatos e padronizar as técnicas de detecção. Assim como sua relevância no diagnóstico, sua relação com metástases distantes e na identificação da origem tumoral, seu uso na escolha adequada da terapia.

Uma consideração plausível sobre os estudos levantados é que se faz necessária a detecção das micrometástases em medula óssea de cães e gatos com tumores sólidos, pois essa ferramenta teria grande importância na adequação do tratamento e auxiliaria em um prognóstico mais criterioso buscando uma melhor e maior sobrevida ao paciente. Com destaque para pacientes com tumores mamários de origem epitelial, já que esse é o mais freqüente tumor, tanto em mulheres quanto em cadelas e, em humanos, é o tumor que mais apresenta formação de micrometástases em medula óssea.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K. C. H.; TAKAHIRA, R. K. Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material. **Revista de Educação Contínua em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 5, n. 2, p. 157-163, 2002.
- ARGYLE, D. J.; KHANNA, C. Tumor Biology and Metastasis. *In: Small animal clinical oncology*. 5. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 30-50.
- BECKER, S.; BECKER-PERGOLA, G.; WALLWIENER, D.; SOLOMAYER, E.F.; FEHM, T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 97, n. 1, p. 91-96, mai. 2006.
- BENJAMIN, A. S.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 5, p. 423-436, 1999.
- BENTUBO, H.D.L.; TOMAZ, M.A.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural** v.37, p.1021-1026, 2007.
- BRAUN, S.; AUER, D.; MARTH, C. The prognostic Impact of Bone Marrow Micrometastases in Women With Breast Cancer. **Cancer Investigation**, v. 27, p. 598-603, 2009.
- BRAUN, S.; PANTEL, K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. **Medical Oncology**, v. 16, p. 154-165, 1999.
- BRAUN, S.; VOGL, F.D.; NAUME, B.; *et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 353, p. 793-802, 2005.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I.C. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. **Nature** v.2, ago 2002.
- CRISCITIELLO, C.; SOTIRIOU, C.; IGNATIADIS, M. Circulating tumor cells and emerging blood biomarkers in breast cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 22, p. 552-558, 2010.
- DA COSTA, A.; OLIVEIRA, J.T.; GARTNER, F.; KOHN, B.; GRUBER, A.D.; KLOPFLEISCH, R. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 165-168, 2011.
- DONDOSSOLA, E.; RANGEL, R.; GUZMAN-ROJAS, L. *et al.* CD13-positive bone marrow-derived myeloid cells promote angiogenesis, tumor growth, and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 51, p. 20717-20722, dez. 2013.
- ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; FERNÁNDEZ, A.; MILLAN, M. Y.; RODRIGUEZ, F.; HERRÁEZ, P.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Coordinate Expression of

Cytokeratins 7 and 20 in Feline and Canine Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 3, p. 179–190, 1999.

FIDLER, I. J. Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 43, p. S3–S10, 1999.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; DE BRITO, T.; BACCHI, C.E. & CARDOSO DE ALMEIDA, P. - Patologia. Processos gerais. 5a edição. São Paulo, Atheneu, p. 273-285, 2010.

FUNKE, I.; SCHRAUT, W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. **Journal of Clinical Oncology**, v.16, p. 557-566, 1998.

GORGES, T.M.; PANTEL, K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. **Cancer Immunol Immunother**, v. 62, p. 931-939, jan. 2013.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 858-880, apr. 2004.

HENSON, K. L.; ALLEMAN, R. A.; FOX, L. E.; RICHEY, L. J.; CASTLEMAN, W. L. Diagnosis of Disseminated Adenocarcinoma by Bone Marrow Aspiration in a Dog with Leukoerythroblastosis and Fever of Unknown Origin. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, n. 3, 1998.

HIRSCH-GINSBERG, C. Detection of minimal residual disease: relevance for diagnosis and treatment of human malignancies. **Annual Reviews Medicine**, v. 49, p. 111–122, 1998.

HOINGHAUS, R.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; MISCHKE, R. Immunocytochemical differentiation of neoplastic and hyperplastic canine epithelial lesions in cytologic imprint preparations. *The Veterinary Journal*, v. 173, p.79–90, 2007.

JAILLARDON, L.; BARTHÉLEMY, A.; GOY-THOLLOT, I.; POUZOT-NEVORET, C.; FOURNEL-FLEURY, C. Mammary gland carcinoma in a dog with peripheral blood and bone marrow involvement associated with disseminated intravascular coagulation. **Veterinary Clinical Pathology**, v.41 n. , p. 261–265, 2012.

JANNI, W.; RACK, B.; LINDEMANN, K.; HARBECK, N. Detection of Micrometastatic Disease in Bone Marrow: Is It Ready for Prime Time? **The Oncologist**, v. 10, p. 480–492, out. 2005.

JANNI, W.; VOGL, F.D.; WIEDSWANG, G.; *et al.* Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled analysis. **Clinical Cancer Research**, v.17, p. 2967–2976, 2011.

KAPLAN, R. N.; PSAILA, B; LYDEN, D. Bone marrow cells in the “pre-metastatic nich”: within bone and beyond. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, p. 521-529, dez. 2006.

KLOPFLEISCH, R.; KLOSE, P.; WEISE, C.; BONDZIO, A.; MULTHAUP, G.; EINSPANIER, R.; GRUBER, A. D. Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: Similarities to and differences from human breast cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 6380–6391, 2010.

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A. D. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v. 10, n.618, 2010.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, v.81, n. 2, p. 218-224, 2006.

LACROIX, M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, v. 13, p. 1033–1067, 2006.

LEONG, S. P. L.; TSENG, W. W. Micrometastatic Cancer Cells in Lymph Nodes, Bone Marrow, and Blood - Clinical Significance and Biologic Implications. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 3, p. 195-206, mai/jun. 2014

LIN, H.; BALIC, M.; ZHENG, S.; DATAR, R.; COTE, R. J. Disseminated and circulating tumor cells: role in effective cancer management. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 77, 2011.

MARHABA, R.; ZÖLLER, M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *Journal of Molecular Histology*, v.35, p. 211–231, 2004.

MARTÍN DE LAS MULAS, J.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; CARRASCO, L.; NIEL, V. M.; FERNÁNDEZ, A. Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins in 50 feline neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 692–701, 1995.

MISCHKE, R.; HÖINGHAUS, R.; LÜTKEFELS, E.; BUHL, K.; GERHARDT, A.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Immunocytological confirmation of bone marrow metastases in a dog with cholangiocarcinoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, p. 411-414, 2003.

MONTEROS, A.; HELLMÉ, E. N.; RAMÍREZ, G. A.; HERRÁEZ, P.; RODRÍGUEZ, F.; ORDÁS, J.; MILLÁN, Y.; LARA, A.; MARTÍN DE MULAS, J. Lipid-rich Carcinomas of the Mammary Gland in Seven Dogs: Clinicopathologic and Immunohistochemical Features. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 718–723, 2003.

MORITZ, A.; BAUER, N. B.; WEISS, D. J.; LANEVSCHI, A.; SAAD, A. Evaluation of Bone Marrow. *In: Veterinary Hematology*. 6. ed. Blackwell Publishing Ltd., 2010. p. 1039-1046.

MULLER, V.; STAHMANN, N.; RIETHDORF, S. *et al.* Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clinical Cancer Research*, v. 11, p. 3678–3685, 2005.

OLIVEIRA, C.T. Mielopatia Infiltrativa por Tumores não-Hematológicos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica - **Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP**, para obtenção do título de Mestre. Orientadora: Profa. Dra. Lígia Niero-Melo Botucatu – SP 2009

ORAZI, A; O'MALLEY, D.P; ARBER, D.A; *Illustrated Pathology of the Bone Marrow*. **Cambridge University Press**, p.1-14, 2006.

- PANTEL, K.; ALIX-PANABIERES, C.; RIETHDORF, S. Cancer Micrometastases. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, p. 339–351, jun. 2009.
- PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the Metastatic Cascade. **Nature**, v. 4, p. 448–456, jun. 2004.
- PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R.H.; BRANDT, B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. **Nature Review Cancer**, v. 8, p. 329–340, 2008.
- PAOLONI, M. C.; KHANNA, C. Comparative Oncology Today. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 37, p. 1023–1032, 2007.
- PAPAC, R.J. Bone Marrow Metastases: a review. **Cancer**, v. 74, n. 9, p. 2403-2413, nov. 1994.
- PAWELEK, J. M. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. **The Lancet Oncology**, v. 6, p. 988–993, 2005.
- PAWELEK, J. M.; CHAKRABORTY, A. K. Fusion of Tumour Cells With Bone Marrow-Derived Cells: a Unifying Explanation for Metastasis. **Nature Publishing Group**, v.8, mai. 2008.
- PIANE, L.; SAYAG, D.; LERMUZEAUX, J.; SEMIN, M. O.; LAMOUR-LAYSSOL, C.; AUMANN, M.; TRUMEL, C. What is your diagnosis? Abnormal cells on a blood smear from a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. /3, p. 461–462, 2014.
- REUBEN, J.M.; LEE, B.N.; GAO, H.; *et al.* Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44 CD24 cancer stem cell phenotype. **European Journal of Cancer**, v. 47, p. 1527–1536, 2011.
- RIETHDORF, S.; PANTEL, K. Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells. **New York Annals of the Academy of Sciences**, v. 1210, p. 66–77, 2010.
- RIETHDORF, S.; WIKMAN, H.; PANTEL, K. Review: biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1991–2006, 2008.
- SAMUELSON, D. A. Histotécnicas. In: SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 1-10.
- SAMUELSON, D. A. Sangue e Hematopoese. In: SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 125-150.
- SLADE, M.J.; SINGH, A.; SMITH, B. M. *et al.* Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 94–100, 2005.
- TAYLOR, B. E.; LEIBMAN, N. F.; LUONG, R.; LOAR, A. S.; DIANE M.; CRAFT, D. M. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n.1, p. 85–91, 2013.

TEDARDI, M. V.; BIONDI, L. R.; KIMURA, C. K.; MENDONÇA, P. P.; LATORRE, M. R. O.; DAGLI, M. L. Z. Comparative Oncology in Sao Paulo, Brazil– What to Learn From Cancer RegistrySource. **Journal of Veterinary Science**, v. 1, n. 1, out. 2014.

TOWNSEND III, F. I. Bone Marrow Aspiration in Dogs and Cats. **Lab Animal**, v. 37, n. 11, Nov. 2008

WEISHAAR, K.M.; EDMONDSON, E. F.; THAMM, D. H.; OLVER, C. S. Malignant mesenchymoma with widespread metastasis including bone marrow involvement in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.43, n.3. p. 447–452, 2014.

WETTERWALD, A. *et al.* Optical Imaging of Cancer Metastasis to Bone Marrow - A Mouse Model of Minimal Residual Disease. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, mar. 2002.

ZUCCARI, D. A. P. C.; CARLA R. BERTON, C.R.; ANA CAROLINA B. TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivos de Ciência da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189-198, out. 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C. Estudo Imunocitoquímico de Marcadores Diagnósticos e Prognósticos em Neoplasias Mamárias Caninas [tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2001.