

Dayane Alcântara

**Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma  
canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -  
Graduação em Anatomia dos Animais  
Domésticos e Silvestres da Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de mestre em Ciências

**Departamento:**  
Cirurgia

**Área de Concentração:**  
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientadora:**  
Prof. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2010

## RESUMO

ALCÂNTARA, D. **Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma canino.** [Obtention and characterization of canine osteosarcoma primary cell line]. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno comum em cães, com preferência por raças de grande porte, tem alto potencial metastático e ocorre frequentemente no esqueleto apendicular. O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, achados radiológicos e histopatológicos. O tratamento consiste na ressecção cirúrgica do tumor e o protocolo de tratamento de escolha é a amputação associada à quimioterapia. O osteossarcoma apresenta semelhanças em cães e humanos, portanto o osteossarcoma canino pode ser um modelo útil para estudar esta doença em humanos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar a linhagem celular primária de osteossarcoma canino. Os fragmentos tumorais foram obtidos por meio de biópsias e excereses cirúrgicas do osteosarcoma, a confirmação diagnóstica realizada pelo exame histopatológico. Os fragmentos foram cultivados em meios de cultura DMEM-H, DMEM-Low, RPMI-1640 e MEM para obtenção das linhagens. Para análise da morfologia celular foi realizada a fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A caracterização dos marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares, análise das fases do ciclo celular e potencial elétrico mitocondrial foram realizados por citometria de fluxo. Foram obtidos 6 tumores, sendo 5 osteossarcomas e um condrossarcoma, dos quais foram obtidas 3 linhagens OST-1, OST-3, e CDS1. Os meios de cultivo DMEM-H e MEM foram eficientes para obtenção e manutenção das linhagens. Morfologicamente as células OST-1, apresentaram aspecto fusiforme enquanto as células OST-3 apresentaram pleomorfismo celular. Os marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares nas células de osteossarcoma canino OST-3 apresentaram-se diferencialmente expressos, como os marcadores de origem mesenquimal, o marcador de reparo de DNA, P53, não foi expresso como também é encontrado em inúmeras linhagens de osteossarcoma.

Palavras-chave: Osteossarcoma. Neoplasia óssea. Metástase.

## ABSTRACT

ALCÂNTARA, D. **Obtention and characterization of canine osteosarcoma primary cell line.** [Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma canino]. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Osteosarcoma is a common malignant bone tumor in dogs, with a preference for large breeds, has a high metastatic potential and occurs often in the appendicular skeleton. Diagnosis is based on clinical history, physical examination, radiological and histopathological findings. The treatment consists in surgical tumor resection, and treatment protocol choice is amputation associated with chemotherapy. Osteosarcoma has many similarities in dogs and humans, thus the canine osteosarcoma can be a useful model to study this disease in humans. The aim of this work was to establish and characterize the canine osteosarcoma primary cell line. Tumor samples were obtained by surgical biopsy and the osteosarcoma confirmation was made by histopathological examination. Tumor fragments were cultured in DMEM-H, DMEM- LOW, RPMI-1640 and MEM culture media to establish the cell lines. Cell morphology analysis was carried out by photodocumentation in inverted microscopy and in transmission electron microscopy. The characterization of surface, cytoplasmic and nuclear markers and cell cycle phases, and mitochondrial electric potential analysis were performed by flow cytometry and analyzed with the Win MDI 2.8. Five osteosarcomas, 1 chondrosarcoma, and three cancer cell lines, OST-1, OST-3, and CDS1, were obtained. DMEM-H and MEM culture medium were efficient in cell lines establishing and maintenance. OST-1 cell line showed spindle shaped and OST-3 cell line showed pleomorphism. Surface, cytoplasmic and nuclear markers in the OST-3 canine osteosarcoma cell line were differentially expressed as mesenchymal origin markers, the DNA repair marker, P53, it was not expressed, it is also found in other osteossarcoma lines.

Keywords: Osteosarcoma. Bone neoplasm. Metastasis.

## 1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é um tumor ósseo primário e maligno muito comum em crianças e adolescentes em fase de crescimento em cães, principalmente adultos, e de raças de grande porte, representando de 3 a 4% dos tumores malignos, e 85% dos tumores ósseos na espécie canina, ocorrendo também em felinos (THOMSON, 1983; DALECK, 1996; LINK; EILBER, 2002). Foi classificado por Thomson (1983) como mesenquimal podendo conter tecido conjuntivo, cartilagem, osso imaturo e osteóide. Podem ser simples quando o tecido ósseo é formado em uma matriz cartilaginosa, compostos quando osso e cartilagem estão presentes, ou pleomórficos, anaplásicos, quando tem apenas algumas áreas isoladas de osteóide.

O osteossarcoma é localmente invasivo, e potencialmente metastático, o que os torna particularmente difíceis de serem tratados. Sendo, a enfermidade metastática a causa mais comum de morte do paciente. As metástases ocorrem precocemente e o órgão preferencialmente afetado é o pulmão, em torno de 90%, e de 10% em outros órgãos, como fígado, rim, tecido ósseo, baço, miocárdio, gânglios linfáticos, diafragma, mediastino, medula, intestinos e tecido subcutâneo (SPODNICK; BERG; RAND, 1992; COSTA et al., 2001).

Os osteossarcomas originam-se, mais frequentemente nas metáfises rádio distal, tíbia distal e úmero proximal, cujo crescimento tumoral é frequentemente rápido e doloroso. Macroscopicamente, o tumor, têm aspecto branco-acinzentado e contêm quantidades variáveis de osso mineralizado. Histologicamente, o osteossarcoma canino pode ser subdividido de acordo com o tipo de células e sua atividade sendo os tipos: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, osteoclástico, pobremente diferenciado, telangiectásico e tipo células gigantes (COSTA et al., 2001).

Nas duas últimas décadas foram feitos progressos no tratamento de cães com osteossarcoma, dando opções que podem prolongar a sobrevida e manter um membro funcional sem dor (JOHNSON; WATSON, 2004).

A radioterapia é um método bastante útil para o tratamento de osteossarcoma. Pode ocasionar alívio ou até remissão da dor e retardo na progressão tumoral, sendo, portanto o procedimento indicado em casos em que há impossibilidade de excisão cirúrgica tumoral. Apesar de existirem casos de osteossarcoma induzidos por radiação ionizante em animais, a combinação entre a radioterapia e a cirurgia pode prolongar significativamente a sobrevida dos pacientes, podendo, às vezes, ser curativa (KLEINER; SILVA, 2003).

A combinação da quimioterapia com as técnicas cirúrgicas ou radioterapia em protocolos de tratamento são vitais para aumentar o tempo de sobrevida e diminuir a ocorrência de metástase (WITHROW et al., 1991).

Apesar das duas últimas décadas terem sido promissoras nos tratamentos neoadjuvantes no tratamento de cães com osteossarcoma, e mesmo as novas estratégias terapêuticas em pacientes portadores de osteossarcoma, dando opções e informações complementares para prolongar a sobrevivência e manter um membro funcional sem dor e sem metástases, as expectativas são raras. Existem várias semelhanças entre o osteossarcoma humano e o canino, dessa forma, o osteossarcoma canino pode ser um modelo útil para a descoberta de novas abordagens terapêuticas e para uma melhor compreensão da biologia dos tumores ósseos. Portanto este trabalho tem como objetivo obter e caracterizar a linhagem celular primária de osteossarcoma canino, com a finalidade de auxiliar no estudo de abordagens terapêuticas mais adequadas e eficientes.

## 7 CONCLUSÕES

- As estratégias experimentais e metodológicas no estabelecimento da cultura primária de osteossarcoma, utilizando os meios de cultivo DMEM-H e MEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1 % de ácido pirúvico foram eficientes para a obtenção, manutenção e expansão das células de osteossarcoma canino;
- os aspectos morfológicos encontrados foram de células fusiformes do tipo *fibroblast-like* para a linhagem celular OST-1 e pleomorfismo celular para as células OST-3 com núcleos irregulares, presença de uma ou mais núcleos e/ou nucléolos e pouco conteúdo citoplasmático, analisados em microscopia de luz e eletrônica;
- a inoculação das células tumorais OST-1 e OST-3 demonstraram potencial tumorigênico quando implantadas em camundongos NUDE;
- expressão de marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares para células tumorais mostraram diferencialmente expressos o que denota suas características de transformação celular maligna.

## REFERÊNCIAS

- ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; JESUS, M. I.; PINTO, W. V. M.; MEDEIROS, R. L. F.; SILVA, D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2002.
- BERG, J. Canine osteosarcoma: amputation and chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, p. 111-119, 1996.
- BERGER, M.; MURARO, M.; FAGIOLI, F. Osteosarcoma Derived from Donor Stem Cells Carrying the Norrie's Disease Gene. **The New England Journal of Medicine**, p. 2502-2504, 2008.
- BOURDON, J.; SILVA, A. M.; PERRIER, S. p53 family members in cancer diagnosis and treatment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, p. 57-62, 2010.
- BRAMWELL, V. The role of chemotherapy in osteogenic sarcoma. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 20, p. 61-85, 1995.
- BROOKS, P. C. Role of integrins in angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 32a, p. 2423-2429, 1996.
- BURDEN, R. E.; GORMLEY, J. A.; JAQUIN, T. J.; SMALL, D. M.; QUINN, D. J.; HEGARTY, S. M.; WARD, C.; WALKER, B.; JOHNSTON, J. A.; OLWILL, S. A.; SCOTT, C. J. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6042-6051, 2009.
- CALUX, N. M. C. T.; RIBALTA, J. C. L.; FOCCHI, J. N. S. J.; BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino: comparação de dois marcadores de células endoteliais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 5, 2001. **Cancer**, v. 8, p. 108-113, 2008.
- CHORNA, I. V.; DATSYUK, L. O.; STOIK, R. S. Expression of Bax, Bad and Bcl-2 proteins under x-radiation effect towards human breast carcinoma MCF-7 cells and their doxorubicin-resistant derivatives. **Experimental Oncology**, v. 27, n. 3, p.196-201, 2005.
- CHUN, R.; DE LORIMIER, L. F. Update on the biology and management of canine osteosarcoma. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 33, p. 491-516, 2003.
- CIARCIA, R.; PAGNINI, C.; FIORITO, F.; PELLICANE, A.; MONTAGNARO, S.; RUSSO, R.; FLORIO, S. Effect of "All - trans " retinoic acid in canine osteosarcoma chemotherapy. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 267-269, 2008.
- COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment? **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.

- COSTA, F. S.; TOSTES, R. A.; FARIAS, M. R.; SAMPAIO, R. L.; PEREZ, J. A. Metástase cutânea de osteossarcoma em um cão. relato de caso. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 240-242, 2001.
- CUI, L.; SHI, Y.; QIAN, J.; DAI, G.; WANG, Y.; XIA, Y.; CHEN, J.; SONG, L.; WANG, S.; WANG, X. Deregulation of the p16-cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4-retinoblastoma pathway involved in the rat bladder carcinogenesis induced by terephthalic acid-calculi. **Urological Research**, v. 34, n. 5, p. 321-328, 2006.
- DALECK, C. R. Osteossarcoma canino. **Clínica Veterinária**, v. 1, n. 5, p. 26-27, 1996.
- DALECK, C. R.; CANOLA, J. C.; STEFANES, S. A.; SCHOCKEN, P. F. L.; NARDI, A. B. Estudo retrospectivo de osteossarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 125-131, 2006.
- DALECK, C. R.; FONSECA, C. S.; CANOLA, J. C. Osteossarcoma canino. **Revista Educação Continuada**, v. 5, p. 233-242, 2002.
- DI FIORE, R.; SANTULLI, A.; FERRANTE, R. D.; GIULIANO, M.; DE BLASIO, A.; MESSINA, C.; PIROZZI, G.; TIRINO, V.; TESORIERE, G.; VENTO, R. Identification and expansion osteosarcoma cancer-stem-cells by long term 3-aminobenzamide treatment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, p. 301-313, 2009.
- DOIGE, C. E.; WEISBRODE, S. E. Doenças dos ossos e das articulações. In: CARLTON, W. W. **Patologia veterinária especial de Thonson**, 2. ed. Porto Alegre: Art Méd, 1998. cap.10, p.448-485.
- DUFF, S. E.; LI, C.; GARLAND, J. M.; KUMAR, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **FASEB Journal**, v. 17, p. 984-992, 2003.
- EICHHORN, M. E.; KLEESPIES, A.; ANGELE, M. K.; JAUCH, K. W.; BRUNS, C. J. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 392, p. 371-379, 2007.
- EK, E. T. H.; DASS, C. R.; CHOONG, P. F. M. Commonly used mouse models of osteosarcoma. **Clinical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 60, p. 1-8, 2006.
- EL-DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. WAF1/GIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Research**, v. 75, p. 817-825, 1993.
- ESPOSITO, J. P.; CAMARGO, R. S.; LONGATTO FILHO, A.; DI LORETO, C.; KANAMURA, C. T.; TOLOSA, E. M. C. Expressão imunohistoquímica dos marcadores PCNA, Ki67 e P53 em carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 27, n. 5, p. 327-331, 2000.
- FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. Outras doenças ósseas e articulares: **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. cap. 32, p. 1115-1137.



FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells. In: **A manual of basic technique**. 4. ed. New York: Willey – Liss, 2000. 577 p.

GIANNIS, A.; RÜBSAM, F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis: new drugs in cancer therapy. **Angewandte Chemie** (International ed. in English), v. 36, n. 6, p. 588-590, 1997.

GIBBS, C. P.; KUKKOV, V. G.; REITH, J. D.; TCHIGRINOVA, O.; SUSLOV, O. N.; SCOTT, E. W.; GHIVIZZANI, S. C.; IGNATOVA, T. N.; STEINDLER, D. A. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. **Neoplasia**, v. 7, p. 967-976, 2005.

GOMES, C.; FERREIRA, M. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; CAVALCANTI, R. L.; SPAGNOL, C.; OLIVEIRA, L. O.; CONTESINI, E. A.; OLIVEIRA, R. T. Estudo epidemiológico de cães com imagens radiográficas compatíveis com neoplasias ósseas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 159-162, 2006.

GOMES, L. C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T. Osteossarcoma canino: revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, p. 204-219, 2008.

GRAÇA, B.; LUNET, C.; COELHO, A. S.; MONTEIRO, G.; FREIRE, P.; SPEIDEL, A.; CARVALHO, L. Angiogénese e cancro: da biopatologia à terapêutica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 17, p. 76-93, 2004.

GRIVICICHI, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAUBEN, E. I.; ARENDS, J.; VANDENBROUCKE, J. P.; VAN ASPEREN, C. J.; VAN MARCK, E.; HOGENDOORN, P. C. W. Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. **European Journal Human Genetics**, v. 11, n. 8, p. 611-618, 2003.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 1011-1027, 2005.  
INOUE, D. P.; AMAR, A.; CERVANTES, O. Marcadores Tumorais no Câncer da Laringe. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 34, n. 1, 2005.

IOACHIM, E. E.; KATSANOS, K. H.; MICHAEL, M. C.; TSIANOS, E. V.; AGNANTIS, N. J. Immunohistochemical expression of cyclin D1, cyclin E, p21/waf1 and p27/kip1 in inflammatory bowel disease: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 19, n. 4, p. 325-333, 2004.

JOHNSON, A. L.; HULSE, D.A. Neoplasias ósseas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005, p. 1165-1176.

JOHNSON, K. A.; WATSON, A. D. J. Doenças esqueléticas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 184, p. 1988-2019.

JONES, T. C. Neoplasias induzidas por parasitos. In: JONES, C. J.; HUNT, R. D. ; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 116.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. Genética do Câncer: In **Genética Médica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 197-212.

KAYA, M.; WADA, T.; AKATSUKA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 572-577, 2000.

KAYA, M.; WADA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. **British Journal of Cancer** , v. 86, p. 864-869, 2002.

KERBAUY, F. R. Mutações do gene p53 em linfomas de Burkitt: muito além do gene c-myc. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 1-4, 2008.

KHANNA, C.; PREHN, J.; YEUNG, C.; CAYLOR, J.; TSOKOS, M.; HELMAN, L. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. **Clinical Experimental Metastasis**, v. 18, n. 3, p. 261-271, 2000.

KLEINER, J. A.; SILVA, E. G. Tumores ósseos em pequenos animais. **MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v. 1, n. 3, p. 193-200, 2003.

KOCH, W. M. Molecular biology of head and neck tumors. In: CUMMINGS, C. W.; FREDRICKSON, J. M.; HARKER, L. A.; KRAUSE, C. J.; RICHARDSON, M. A.; SCHULLER, D. E. **Otolaryngology head & neck surgery**. 3. ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1998.

KRUTH, S. Canine models for gene therapy. **Transfusion Science**, v. 17, n. 1, p. 71-77, 1996.

LANGEBANBACH, A.; ANDERSON, M. A.; DAMBACH, D. M.; SORENMO, K. U.; SHOFER, F. D. Extraskelatal osteosarcoma in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986- 1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 34, p. 113-120, 1998.

LARUE, S. M.; WITHROW, S. J.; WRIGLEY, R. H. Radiographic bone surveys in the evaluation of primary bone tumors in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 188, n. 5, p. 514-516, 1986.

LEE, J.; Kim, S. S. The function of p27 KIP1 during tumor development. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 41, n. 11, p. 765-771, 2009.

- LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.
- LIMA, J. J. G.; MANZI, F. R.; SILVA, F. L.; BAPTISTA, M. Z. Osteossarcoma extra-esquelético na região cervical- revisão da literatura e relato de caso clínico. **Radiologia Brasileira**. v. 35, n. 5, p. 315-319, 2002.
- LINK, M.; EILBER, F. Osteosarcoma. In: PIZZO, P.; POPLACK, D. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 2002. p. 1051-1089.
- LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STELLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-336,
- LIPTACK, J. M.; DERNELL, W. S.; EHRHART, N.; WITHROW, S. J. Canine appendicular osteosarcoma: diagnosis and palliative treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 26, n. 3, p. 172-182, 2004a.
- LIPTACK, J. M.; DERNELL, W. S.; EHRHART, N.; WITHROW, S. J. Canine appendicular osteosarcoma: curative-intent treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 26, n. 3, p. 188-196, 2004b.
- LIU, S. Tumores ósseos e cartilagosos In: BOJARAB, W. J. **Mecanismos das moléstias na cirurgia de pequenos animais**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1996.
- LONGHI, A.; ERRANI, C.; PAOLIS, M.; MERCURI, M.; BACCI, G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. **Cancer Treatment Reviews**, v. 32, p. 423-436, 2006.
- LOUKOPOULOS, P.; O'BRIEN, T.; GHODDUSI, M.; MUNGALL, B. A.; ROBINSON, W. F. Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 131-141, 2004.
- LOUKOPOULOS, P.; ROBINSON, W. F. Clinicopathological relevance of tumor grading in canine osteosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 65-73, 2007.
- MA, H.; PEDERSON, T. Nucleostemin: a multiplex regulator of cell-cycle progression. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 12, p. 575-579, 2008.
- MA, X.; YANG, Y.; WANG, Y.; AN, G.; GANG, L. V. Small interfering RNA-directed knockdown of S100A4 decreases proliferation and invasiveness of osteosarcoma cells. **Cancer Letters**, 2010. (No prelo).
- MAHHAFHEY, E. A. Cytology of musculoskeletal system. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1999, p. 120-124.
- MARTELLI, A.; TEIXEIRA, L. B. C.; SANTOS JR., A. R. Aspectos histopatológicos e histoquímicos de osteossarcoma em cães. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, p. 179-189, 2007.

MC KAIG, R. G.; BARIC, R. S.; OLSHAN, A. F. Human papilloma virus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. **Head Neck**, v. 20, s.n., 1998.

MÉPLAN, C.; RICHARD, M. J.; HAINAUT, P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. **Oncogene**, v. 19, n. 46, p. 5227-5236, 2000.

MIYACHI, M.; KAKAZU, N.; YAGYU, S. Restoration of p53 Pathway by Nutlin-3 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Rhabdomyosarcoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 12, 2009.

MUELLER, F.; FUCHS, B.; KASER-HOTZ, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. **Anticancer Research**. v. 27, s. n., p. 155-164, 2007.55-164, 2007.

MUNDAY, J. S.; EGINS, J.; SELCER, B. A. e STEDMAN, N. L. Renal osteosarcoma in dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, p.618-622, 2004.

NAKAJIMA, K.; TANIGUCHI, K.; MUTOH, K. I. Expression of CD44v6 as matrix-associated ectodomain in the bone development. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 72, n. 8, p. 1017-1022, 2010.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Neoplasias selecionadas em cães e gatos: osteossarcoma em cães e gatos. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 84, p. 899-901.

Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. **BMC OLIVEIRA, F.; SILVEIRA, P. R. Osteossarcoma em cães (revisão de literatura). Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 11, 2008.

OYA, N.; KOKUBO, M.; MIZOWAKI, T.; SHIBAMOTO, Y.; NAGATA, Y.; SASAI, K.; NISHIMURA, Y.; TSUBOYAMA, T.; TOGUCHIDA, J.; NAKAMURA, T.; HIRAOKA, M. Definitive intraoperative very high-dose radiotherapy for localized osteosarcoma in the extremities. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 51, n. 1, p. 87-93, 2001.

PALMER, N. Diseases of bone. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. Academic Press Inc., 1992. v. 1, p. 1 -137.

PAN, G.; THOMSON, J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. **Cell Research**. v. 17, p. 42-49, 2007

PATNAIK, A. K. Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcomas: a clinicopathologic study of 14 cases. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 1, p. 46- 55, 1990.

PAUTKE, C.; SCHIEKER, M.; TISCHER, T.; KOLK, A.; NETH, P.; MUTSCHLER, W.; MILZ, S. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Research**, v. 24, p. 3743-3748, 2004.

PEÑA, L. L., NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p.237-246, 1998.

PINTO, A. P.; CRUM, C. P. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. **Clinical Obstetrics Gynecology**, v. 43, n. 2, 2000.

POOL, R. R. Tumors of bone and cartilage. In: MOULTON, J. E. **Tumors of domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press, 1990. cap. 5, p.157- 230.  
poor prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 572-577, 2000.

RECH, C.; CASTRO JR., C. G.; MATTEL, J.; GREGLANIN, L.; DI LEONE, L.; DAVID, A.; RIVERO, L. F.; TARRAGO, R.; ABREU, A.; BRUNETTO, A. L. Características clínicas do osteossarcoma na infância e sua influência no prognóstico. **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 1, p. 65-70, 2004.

REINHARDT, S.; STOCKHAUS, C.; TESKE, E., RUDOLPH, R.; BRUNNBERG, L. Assessment of cytological criteria for diagnosing osteosarcoma in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 2, p. 65-70, 2005.

RESNITZKY, D.; REED, S. I. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. **Molecular Cell Biology**, v.15, n.7, p. 3463-3469, 1995.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E.; SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

RIVOIRE, W. A.; CORLETA, H. V. E.; BRUM, I. S.; CAPP, E. Biologia Molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira Saúde Materna e Infantil**, v. 6, n. 4, 2006.

RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L. T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. **Veterinary Journal**, v. 156, p. 31-39, 1998.

RUDZYK, Z.; JOTHY, S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 50, p. 57-71, 1997.

SÁNCHEZ, I.; DYNLACHT, B. D. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 3, p. 311-321, 2005.

SANZ-RODRIGUEZ, F.; GUERRERO-ESTEO, M.; BOTELLA, L. M.; BANVILLE, D.; VARY, C. P. H.; BERNABÉU, C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32858-32868, 2004.

SHAY, J. W.; TOMLINSON, G.; PIATSZEK, M. A.; GOLLAHON, L. S. Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 1, p. 425 - 432, 1995.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 4, p. 696-704, 2003.

SICLARI, V.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 78, 2010.

SILLANPÄÄ, S.; ANTTILA, M. A.; VOUTILAINEN, K.; TAMMI, R. H.; TAMMI, M. I.; SAARIKOSKI, S. V.; VELLI-MATTI, K. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 5318-5324, 2003.

SILVEIRA, P. R.; DALECK, C. R.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F.; REPETTI, C. S. F.; NARDI, A. B. Estudo retrospectivo de osteossarcoma apendicular em cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 487-495, 2008.

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

STRAW, R. C. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 378-417.

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

SU, Y.; LUO, X.; HE, B. C.; WANG, Y.; CHEN, L.; ZUO, G. W.; LIU, B.; BI, Y.; HUANG, J.; ZHU, G. H.; HE, Y.; KANG, Q.; LUO, J.; SHEN, J.; CHEN, J.; JIN, X.; HAYDON, R. C.; HE, T. C.; LUU, H. H. Establishment and Characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 26, n. 7, p. 599-610, 2009.

SZYFTER, K.; HEMMINKI, K.; SZIFTER, W.; SZMEJA, Z.; BANASZEWSKI, J.; PABISZCZAK, M. Tobacco smoke-associated N-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leucocytes. **Carcinogenesis**, v. 17, 1996.

TAJRA, J. B. M.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; CZECZKO, N. G.; PAULO NASSIF, P. A. N.; SILVA, M. I. Expressão Citofotométrica do marcador CD-34 no adenocarcinoma de Cólon. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 4, p. 409-413, 2008.

THOMAS, D.; KANSARA, M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p 757-769, 2006.

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

THOMSON, R. G. Neoplasia. **Patologia geral veterinária**. In: Philadelphia: Guanabara, 1983. cap. 6, p. 290 - 315.

TRIEB, K.; KOTZ, R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 11-17, 2001.

VAN DEN BERG, H. Biology and therapy of solid tumors in childhood. **Update on Cancer Therapeutics I**, p. 367-383, 2006.

VAN LEEUWEN, I. S.; CORNELISSE, C. J.; MISDORP, W.; GOEDEGEBUURE, S. A.; KIRPENSTEIJN, J.; RUTTEMAN, G. R. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. **Cancer Letters**, v.111, p. 173-178, 1997.

WHITE, V. A.; FANNING, C. V.; AYALA, A. G.; RAYMOND, A. K.; CARRASCO, C. H.; MURRAY, J. A. Osteosarcoma and the role of fine needle aspiration: a study of 51 cases. **Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1238-1246, 1988.

WITHROW, S. J.; DOIGE, C. E. En bloc resection of a juxtacortical and three intraosseous osteosarcoma of the zygomatic arch in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 16, p. 867- 872, 1980.

WITHROW, S. J.; POWERS, B. E.; STRAW, R. C.; WILKINS, R. M. Comparative aspects of osteosarcoma: dog versus man. **Clinical Orthopaedics Related Research**, v. 270, p. 159-168, 1991.

WOJEWODA, M.; DUSZYŃSKI, J.; SZCZEPANOWSKA, J. Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 890-896, 2010.

WONG, N. A.; MAYER, N. J.; ANDERSON, C. E.; MCKENZIE, H. C.; MORRIS, R. G.; DIEBOLD, J.; MAYR, D.; BROCK, I. W.; ROYDS, J. A.; GILMOUR, H. M.; HARRISON, D. J. Cyclin D1 and p21 in ulcerative colitis-related inflammation and epithelial neoplasia: a study of aberrant expression and underlying mechanisms. **Human Pathology**, v. 34, n. 6, p. 580-588, 2003.

WU, H.; WANG, T.; DENG, Z.; CHEN, D. Study on angiogenesis factor of human osteosarcoma. **Journal of Tongji Medical University**, v. 20, n. 3, p. 227-230, 2000.

YE, F.; ZHOU, C.; CHENG, Q.; SHEN, J.; CHEN, H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. **BMC Cancer**, v. 8, n. 108, 2008.