

Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino¹

Luciele V. Teixeira^{2*}, Sonia T.A. Lopes², Danieli B. Martins², Raqueli T. França² e Rafael A. Fighera³

ABSTRACT.- Teixeira L.V., Lopes S.T.A., Martins D.B., França R.T. & Fighera R.A. 2010. [Fine-needle aspiration cytology as a sampling method for histopathology in canine osteosarcoma.] Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(2):145-148. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: luciele.sm@gmail.com

Cytopathologic and histopathologic tests are important to obtain a definitive diagnosis of osteosarcoma. The sample for cytopathological exam is collected through fine-needle aspiration cytology (FNA). On the other hand, histopathological exams need a larger sample that is usually obtained by incisional biopsy. The objective of this article is to develop a FNA technique to biopsy and evaluate histopathologically samples of dogs with suspected osteosarcoma. Two FNS samples were collected from 12 such dogs. Samples obtained in the first procedure were examined cytologically. The material sampled at the second biopsy was fixed in 10% formalin and submitted to histopathological analysis. Four out of the 12 samples (33.3%) examined by the herein proposed method were diagnosed as osteosarcoma. These results indicate a possible adaptation of FNA for histopathological examination.

INDEX TERMS: Osteosarcoma, cytopathology, histopathology, methods of collection.

RESUMO.- Para a obtenção do diagnóstico definitivo do osteossarcoma realizam-se exames citopatológico e histopatológico. O material para exame citopatológico é coletado através de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), já para a realização do exame histopatológico é necessário uma amostra de tamanho maior, geralmente conseguida através de biópsia incisional. Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma técnica de coleta de material em cães com suspeita de osteossarcoma através de PAAF para a realização de exame histopatológico. Foram coletadas duas amostras de 12 cães suspeitos de osteossarcoma por PAAF. O material obtido pela primeira coleta foi utilizado para confirmar o diagnóstico através do exame citopatológico, enquanto que o material oriundo da segunda coleta

foi fixado em formol a 10% para a análise histopatológica. Quatro das 12 amostras (33,3%) avaliadas histopatologicamente pela metodologia proposta obtiveram também o diagnóstico de osteossarcoma. Esses resultados apontam para uma possível adequação da técnica de coleta de material por PAAF para exame histopatológico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Osteossarcoma, citopatologia, histopatologia, metodologia de coleta.

INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é uma neoplasia de origem óssea que afeta humanos e várias espécies de animais. Essa condição corresponde ao mais frequente neoplasma ósseo de cães (Thompson & Pool 2002). Na Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense, o osteossarcoma é o terceiro neoplasma mais associado com morte de cães, atrás apenas dos neoplasmas malignos mamários e dos linfomas (Fighera et al. 2008).

O diagnóstico dos mais variados neoplasmas torna-se necessário ao paciente e obrigatório para o clínico de pequenos animais, o qual deve ter conhecimento dos melhores exames e respectivos métodos de coleta a serem utilizados (Guedes et al. 2000). Com o avanço da Medici-

¹ Recebido em 23 de setembro de 2009.

Aceito para publicação em 19 de novembro de 2009.

² Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário Universitário, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: luciele.sm@gmail.com

³ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Santa Maria, RS.

na Veterinária, cada vez mais surgem novos métodos de avaliação e de diagnóstico para lesões ósseas (Cassone et al. 1996).

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) surgiu na década de 1930 com o intuito de diagnosticar tumores malignos em humanos. Em animais, essa técnica começou a ser utilizada na década de 1980, auxiliando na distinção de hiperplasias, inflamações, neoplasias e degenerações (Magalhães et al. 2001).

Em estudos comparativos entre PAAF e biópsia incisional, verificou-se várias vantagens relacionadas à primeira, como: baixo custo, rapidez e eficácia dos resultados, simplicidade da coleta, além de não proporcionar riscos ao paciente, podendo ser realizada em ambulatório (Larkin 1994, Guedes et al. 2000). No entanto, também há desvantagens, como a impossibilidade de graduar os neoplasmas (Lopes et al. 2009) e a dificuldade em emitir um prognóstico sem a avaliação da morfologia tecidual, principalmente no que se refere a invasibilidade de tecidos adjacentes e ao comprometimento de vasos linfáticos.

O tratamento definitivo de tumores ósseos deve ser baseado na apresentação anatomopatológica do material obtido por biópsia. O exame histopatológico, além de fornecer o diagnóstico definitivo e a graduação da lesão, também permite que o tratamento seja bem planejado (Cassone et al. 1996, Kirpensteijn et al. 2002), entretanto, a biópsia incisional tem a desvantagem de ser um procedimento invasivo, já que a amostra deve ser grande o suficiente para ser submetida à histopatologia. As análises histopatológicas são mais específicas e definitivas, embora, muitos autores considerem também a citopatologia como um diagnóstico definitivo (Wellman 1990, Graça 2007).

O osteossarcoma foi eleito para este estudo por ser um tumor de origem óssea comum e devido à biópsia incisional acarretar vários problemas pós-operatórios ao paciente, como por exemplo, fraturas patológicas e complicações na cicatrização do local amostrado (David et al. 1996, Johnson & Hulse 2005). A técnica proposta neste trabalho visa obter material suficiente para ser conservado e posteriormente diagnosticado de forma satisfatória pela histopatologia sem que para isso se arrisque a vida do paciente durante o procedimento de coleta. Desta forma, este trabalho teve como objetivo coletar amostras de osteossarcomas em cães pelo método da PAAF e submetê-las à histopatologia, avaliando a viabilidade da técnica desenvolvida.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 12 cães atendidos no Setor de Clínica de Pequenos Animais, do Hospital Veterinário Universitário, da Universidade Federal de Santa Maria (HUV-UFSM). Desses, oito eram machos e quatro eram fêmeas, com idade média de 8,5 anos e peso médio de 30 kg. Oitenta e três por cento apresentaram neoplasma no esqueleto apendicular (nove casos no membro torácico e um no membro pélvico) e 17% no esqueleto axial (ílio). Os cães acometidos eram de porte grande e gigante e pertenciam às raças Pastor Alemão, São Bernardo, Boxer, Rottweiler ou não tinham raça definida (SRD), com exceção de um, que era de pequeno porte (Maltês).

Conforme o histórico e os sinais clínicos, os cães eram encaminhados ao Setor de Radiologia. Após o estudo radiológico, a coleta de material através da PAAF era realizada e as amostras processadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVET-UFSM). O patologista clínico observava a radiografia procurando regiões de rarefação óssea com aspecto lítico e proliferativo, características de tumores ósseos, como o osteossarcoma. Logo, o local era puncionado, utilizando-se agulha 21G ou 22G e seringa de 10mL acoplada ao citoaspirador, fazendo movimentos em leque, abrangendo assim vários locais do tumor. A seguir, era desprezado o conteúdo da agulha em lâminas de vidro, procedendo-se esfregaços do tipo *squash* para realização da análise citológica. As lâminas eram coradas com Panótico Rápido e analisadas, obtendo-se o diagnóstico citopatológico do tumor.

Após esta coleta realizava-se nova punção com agulha 18G. Esta amostra, de tamanho maior, era desprezada em papel seda (3x1cm) e, depois de seca, mergulhada em tubo de vidro contendo formol a 10% (2mL). Posteriormente, os tubos com os materiais imersos eram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM (LPV-UFSM) para processamento e análise histopatológica. No LPV-UFSM, após processamento histológico padrão, as secções foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE). Nesse ponto, cabe ressaltar que as amostras foram processadas juntamente com os papéis seda. Esse processamento teve de ser realizado manualmente, dado a delicadeza do material. Os papéis seda foram incluídos verticalmente, a fim de que muitos cortes pudessem ser avaliados, de forma seriada, na busca pelo tecido amostrado. Em média, após o desbaste dos blocos, foram necessários pelo menos cinco cortes seriados, cerca de 50 µm entre cada um deles. Em alguns casos foram necessários até 10 cortes para se encontrar amostras representativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A histopatologia evidencia a morfologia das células e dos tecidos, contudo, a amostra deve ter um tamanho adequado para a confecção dos cortes histológicos. Esse tamanho é obtido geralmente apenas com o uso de biópsia incisional, o que nem sempre é de fácil acesso ao clínico de pequenos animais. Neste trabalho, o material coletado por PAAF, de tamanho menor do que o coletado por biópsia incisional foi satisfatório em quatro das 12 amostras (33,3%) enviadas à histopatologia. O Quadro 1 contém os resultados das amostras coletadas utilizando a nova técnica proposta. Na Fig.1,

Quadro 1. Resultados das amostras de osteossarcoma coletadas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e enviadas ao exame histopatológico no LPV-UFSM

Nº da amostra	Resultado
1	Osteossarcoma
2	Coágulos sanguíneos
3	Coágulos sanguíneos
4	Osteossarcoma
5	Poucas células neoplásicas e coágulos sanguíneos
6	Coágulos sanguíneos
7	Coágulos sanguíneos e tecido conjuntivo
8	Coágulos sanguíneos
9	Coágulos sanguíneos e tecido conjuntivo
10	Osteossarcoma
11	Poucas células neoplásicas e coágulos sanguíneos
12	Osteossarcoma

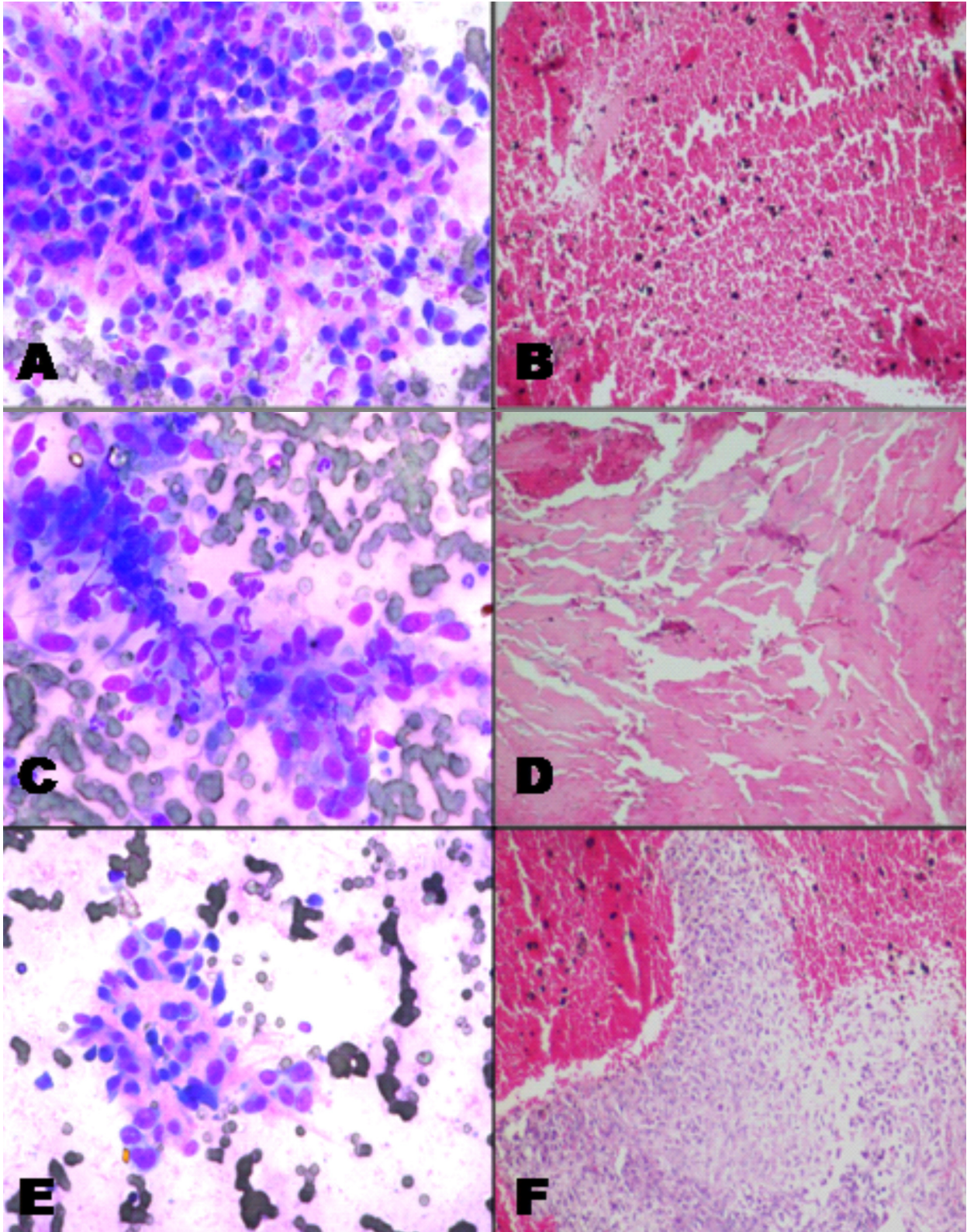


Fig.1. Imagens mostrando os resultados dos exames citopatológicos (à esquerda) e histopatológicos (à direita) de casos de osteossarcoma canino coletados por PAAF. A citopatologia (**A,C,E**) demonstra células neoplásicas envoltas por matriz osteoide. A histopatologia revela apenas (**B**) coágulo sanguíneo, (**D**) colágeno associado a poucos eritrócitos e (**F**) células neoplásicas em meio a um coágulo sanguíneo. HE, obj.20x, e Panótico Rápido, obj.40x. As imagens A,C,E e B,D,F correspondem aos exames citopatológico e histopatológico dos Cães 2, 7 e 1, respectivamente.

as imagens A, C e E (exame citopatológico), fazem um comparativo com as imagens B, D e F (exame histopatológico). Dos 12 casos estudados, 100% tiveram diagnóstico citopatológico de osteossarcoma, podendo-se observar células neoplásicas características de sarcoma ósseo em desenvolvimento avançado, além de outros tipos celulares presentes nas amostras, como células inflamatórias e eritrócitos.

Neste trabalho houve somente um ponto de coleta para o exame histopatológico, o que pode ter gerado alguns resultados negativos em relação à técnica adotada. Portanto, para o aperfeiçoamento da coleta, recomenda-se que mais pontos sejam punccionados à procura de uma área neoplásica de maior esfoliação. Com base neste propósito, uma alternativa de se obter maior amostragem de tecido neoplásico seria aumentar o calibre da agulha utilizada na punção para 16G, procedendo a coleta pelo mesmo orifício em vários ângulos, resultando assim, em mais de uma amostra (David et al. 1996).

Nos esfregaços foram encontradas células mesenquimais neoplásicas com várias alterações citopatológicas indicativas de osteossarcoma, como: anisocitose, citoplasma basofílico e pouco vacuolizado, presença de matriz osteoide, cromatina nuclear grosseira e nucléolos evidentes, como se pode observar nas imagens A, C e E da Fig.1. Além destas células havia grande quantidade de eritrócitos, um achado comum, pois o osteossarcoma é um tumor altamente vascularizado, o que leva à ruptura vascular quando da punção e, conseqüentemente, contaminação da amostra por sangue (Coomber et al. 1998, Fielder & Mahaffey 2008). Com isso, é importante que sejam feitas sempre várias lâminas a cada punção, com o intuito de que o esfregaço fique o melhor possível, propiciando uma boa análise. Ainda, para que o diagnóstico não seja duvidoso, as amostras devem ser coletadas em áreas livres de necrose e inflamação. Mesmo tendo sido encontrada inflamação em alguns dos casos de osteossarcoma aqui descritos, o exame citopatológico não ficou prejudicado, conseguindo com a PAAF desviar das áreas de necrose e inflamação, características de neoplasmas com rápido crescimento (Zuccari et al. 2001).

O exame radiológico atua como uma ferramenta auxiliar na PAAF, diminuindo a possibilidade de erro durante a sua execução. É importante que a área a ser punccionada seja bem delimitada na tentativa de que a amostra seja representativa para o diagnóstico do neoplasma (Robaina et al. 2007). Neste estudo, as amostras coletadas para citologia apresentaram inúmeras células neoplásicas e matriz osteoide, conferindo o diagnóstico de osteossarcoma conforme citam vários autores (Rosen et al. 2000, Fielder & Mahaffey 2008). No entanto, para a histopatologia, algumas amostras coletadas por PAAF foram pequenas, podendo-se, assim, adequar a técnica para novas investigações.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, pode-se concluir que a técnica de PAAF proposta é viável

para análise histopatológica. Estes resultados apontam para uma possível adequação da metodologia, podendo-se investigar a eficácia desta técnica para o exame histopatológico, tanto para o osteossarcoma como para outros neoplasmas de cães.

REFERÊNCIAS

- Cassone A.E., Barbi-Gonçalves J.C. & Aguiar S. 1996. Eficácia da biópsia com agulha nos tumores ósseos. *Revta Bras. Ortop.* 31:891-894.
- Coomber B.L., Denton J., Sylvestre A. & Krut S. 1998. Blood vessel density in canine osteosarcoma. *Can. J. Vet. Res.* 62:199-204.
- David A., Rios A.R., Tarragô R.P. & Dalmina V. 1996. Biópsia com agulha fina nos tumores ósseos. *Revta Bras. Ortop.* 31:89-92.
- Fielder S.E. & Mahaffey E.A. 2008. The musculoskeletal system, p.210-214. In: Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H. & De Nicola D.B. (Eds), *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 3rd ed. Mosby Elsevier, Missouri.
- Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1964-2004). *Pesq. Vet. Bras.* 28:223-230.
- Graça R.F. 2007. Citologia para clínicos: como usar esta ferramenta diagnóstica. *Acta Sci. Vet.* 35:267-269.
- Guedes R.M.C., Zica K.G.B., Coelho-Guedes M.I.M. & Oliveira S.R. 2000. Acurácia do exame citológico no diagnóstico de processos inflamatórios e proliferativos dos animais domésticos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52:437-439.
- Johnson A.L. & Hulse D.A. 2005. Neoplasias ósseas, p.1165-1176. In: Fossum T.W. (Ed.), *Cirurgia de Pequenos Animais*. 2^a ed. Roca, São Paulo.
- Kirpensteijn J., Kik M., Rutteman G.R. & Teske E. 2002. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Vet. Pathol.* 39:240-246.
- Larkin H.A. 1994. Differentiation of malignant lymphoma and other tumours of animals. *Irish J. Vet. Med.* 47:161-167.
- Lopes B.B., Lot R.E. & Zappa V. 2009. Mastocitoma: revisão de literatura. *Revta Cient. Med. Vet. Garça*. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev100.pdf>. Acesso em 4 mai. 2009.
- Magalhães A.M., Ramadina R.R., Barros C.S.L. & Peixoto P.V. 2001. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesq. Vet. Bras.* 21:23-32.
- Robaina T.F., Coutinho A.C.A., Valladares C.P., Dias E.P. & Lourenço S.Q.C. 2007. Correlação entre os diagnósticos citopatológicos e histopatológicos das lesões da mucosa oral após a punção aspirativa por agulha fina. *Revta Col. Bras. Cirur.* 34:285-289.
- Rosen G., Forscher C.A., Mankin H.J. & Selch M.T. 2000. Neoplasms of the bone and soft tissue, p.1870-1902. In: Bast Jr R.C., Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Holland J.F., Frei E. & Gansler T.S. (Eds), *Cancer Medicine*. 5th ed. B.C. Decker, Ontario.
- Wellman M.L. 1990. The cytologic diagnosis of neoplasia. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 20:919-938.
- Thompson K.G. & Pool R.R. 2002. Tumors of bones, p.245-317. In: Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Zuccari D.A.P.C., Santana A.E. & Rocha N.S. 2001. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:38-41.