

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

TUMORES DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO NA PELE EM CÃES:
ASPECTOS HISTOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E PROGNÓSTICO

GISELE SILVA BOOS

PORTO ALEGRE

2013

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

TUMORES DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO NA PELE EM CÃES:
ASPECTOS HISTOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E PROGNÓSTICO

GISELE SILVA BOOS

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de concentração em
Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Boos, Gisele Silva

Tumores de bainha de nervo periférico na pele em cães: aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e prognóstico / Gisele Silva Boos. -- 2013.

80 f.

Orientador: David Driemeier.

Coorientadora: Luciana Sonne.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Neoplasias de cães. 2. Neoplasias do sistema nervoso periférico. 3. Tumor de bainha de nervo periférico em cães. I. Driemeier, David, orient. II. Sonne, Luciana, coorient. III. Título.

Gisele Silva Boos

TUMORES DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO NA PELE EM CÃES:
ASPECTOS HISTOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E PROGNÓSTICO

Aprovada em ...

APROVADA POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Luciana Sonne
Co-orientadora

Prof. Dra. Ana Lucia Pereira Schild (UFPel)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros (UFMS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini (UFRGS)
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gilmar e Neide, e à minha irmã Alessandra, por tudo o que fizeram por mim até hoje, e pelo incentivo de evoluir sempre. Ao meu namorado Flávio, pela compreensão, carinho e incentivo, mesmo que à distância.

Ao meu orientador, o Professor David, pelas oportunidades e pelo exemplo de profissional e de dedicação. Agradeço também à minha co-orientadora, Prof. Luciana, pela amizade, pelas ideias e paciência. Ao Prof. Saulo, também pelas ideias e pela convivência.

Aos meus amigos e colegas do Setor de Patologia Veterinária, e também aos estagiários, todos foram importantes para mim durante a minha “estada” em Porto Alegre. Quero agradecer especialmente à Dani Bassuino, que me ajudou muito na execução deste trabalho, assim como a amizade (e paciência) dela!

Agradeço aos colegas que já fizeram parte do setor, de tudo o que me ensinaram e da amizade que ficou.

Resumo

Recentemente, verificou-se que a classificação dos tumores de bainha de nervo periférico (TBNP) é arbitrária, e por isso, os mesmos têm sido agrupados simplesmente como TBNP benignos ou malignos. Outras neoplasias devem ser levadas em consideração quando surge o diagnóstico destes tumores, já que eles apresentam conformação morfológica similar aos hemangiopericitomas e fibromas. Quanto ao diagnóstico imuno-histoquímico (IHQ), uma variedade de marcadores para identificar células de origem neural periférica, como as proteínas S-100 e a glial fibrilar ácida (GFAP) são amplamente utilizados, com o intuito inicial de diferenciar os TBNP. O objetivo deste trabalho é o de determinar a frequência dos TBNP de cães, diagnosticados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, além de determinar quais raças, sexo, faixas etárias e locais do corpo do animal são mais acometidos. Com base nesses dados, objetiva-se descrever as características histológicas, IHQ e prognósticas destas neoplasias na população estudada. Um estudo retrospectivo foi realizado nos arquivos do SPV-UFRGS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2012. O histórico de todos os cães diagnosticados com TBNP foi revisado, assim como o levantamento do que aconteceu com estes animais após o diagnóstico da neoplasia. Novas lâminas foram coradas pela hematoxilina e eosina, tricrômio de Masson e azul de toluidina para classificação histológica. Para a IHQ, utilizaram-se os anticorpos anti-vimentina, anti-proteína S-100, anti-actina, anti-GFAP, anti-von Willebrand, anti-neurofilamento e anti-Ki-67. O método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase foi empregado a todos. As variáveis de tipo tumoral (benigno ou maligno), anisocitose e anisocariose, índice mitótico, proliferação celular (Ki-67), necrose intratumoral, invasão a tecidos adjacentes, sexo e localização do tumor foram selecionadas para a análise univariada, relacionadas à recidiva tumoral. As variáveis com valores de $P < 0,20$ foram selecionadas e usadas para a construção do modelo multivariado. As variáveis que passaram no modelo univariado foram testadas para controle de confundidor e multicolinearidade. Nos 12 anos que abrangem o levantamento, 2.984 tumores de pele foram diagnosticados em cães. Destes, 2,34% correspondem a TBNP, sendo 49 benignos (70%) e 21 malignos (30%). Dos achados clínicos, os cães das raças Pastor Alemão e Poodle foram mais acometidos. Quanto ao sexo, as fêmeas representaram 55,71% das amostras. O tempo com que os animais permaneceram com o tumor até a retirada, variou de 3 semanas a 3 anos. Com relação à localização, 40% estavam nos membros torácicos, e 28,57% nos membros pélvicos, o restante localizava-se no tronco, pescoço, cabeça e cauda dos animais. A recidiva tumoral foi observada em 17 casos. Quanto à histologia, os padrões clássicos dos TBNP foram mais proeminentes nos tumores benignos, que possuem os padrões Antoni A e B bem estabelecidos. Os corpos de Verocay foram observados em uma pequena parte das amostras. Tanto as variantes benignas quanto as malignas apresentaram baixo índice mitótico. Na IHQ, os marcadores anti-vimentina e S-100 foram positivos em todas as amostras, exceto uma para vimentina. Os demais marcadores apresentaram marcação positiva em um número menor de amostras, exceto actina, que foi negativa em todas. A expressão de Ki-67 revelou índices proliferativos com diferença estatística não significativa entre os tumores malignos e benignos, porém, através da análise multivariada, foi possível constatar a chance de um animal que apresentava tumor do tipo maligno vir a desenvolver recidiva é 4,61 vezes maior em relação a um animal que apresentava tumor benigno.

Abstract

Recently, it was verified that the classification of the peripheral nerve sheath tumours (PNST) is arbitrary, and thus, they have been called benign or malignant PNST. Other neoplasms should be taken into account when such tumours are diagnosed, since they display a similar morphological conformation to hemangiopericytomas and fibromas. Concerning the immunohistochemical (IHC) diagnosis, a variety of markers aiming the identification of cells with peripheral origin is widely used, such as the S-100 protein and the glial fibrillary acidic protein (GFAP). The markers are used in order to differentiate the PNSTs. The main objective of this thesis is to determine the frequency of PNST in dogs diagnosed in the Setor de Patologia Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), but also to determine which breeds, sex, ages and parts of the body are more afflicted. Based on these data, we aimed to describe the histological features, IHC and prognostic of these neoplasms in the studied population. A retrospective study was carried out in the files of the SPV-UFRGS, comprising the period between January 2000 and December 2012. Records of all dogs diagnosed with PNST were revised, as well as the surveys describing what happened with the animals after the tumour diagnostic. New slides were stained with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome and toluidine for histological classification. For IHC, the antibodies anti-vimentin, anti-S-100 protein, anti-actin, anti-GFAP, anti-von Willebrand, anti-neurofilament and Ki-67 were used. Biotin-streptavidin peroxidase method was applied to all the samples. The variables type of tumour (benign or malignant), sex, anisocytosis and anisokariosis, mitotic index, cell proliferation (Ki-67), intratumoral necrosis, invasion into surrounding tissue and location of the tumor, were selected for univariate analysis, and related to tumor recurrence. We selected the variables whose values were of $P < 0.20$ to the multivariate analysis. The variables that passed through the univariate model, were tested to confounding and multicollinearity control. Over the 12 years comprised in this survey, 2,984 skin tumours were diagnosed in dogs. Out of these, 70 (2.34%) corresponded to PNST. Among these, 49 (70%) were benign and 21 (30%) were malignant. The top two most affected breeds were German Shepherd and Poodle. Regarding sex, females represented 55.71% of the samples. The period of time that the animals remained with the tumor until its removal ranged from three weeks to three years. Concerning the distribution of the tumors, 40% were on the forelimbs, 28.57% were on the hind limbs and the remaining were distributed on the trunk, neck, head and tail of the animals. Recurrence was observed in 17 cases. Regarding histology, typical pattern of the PNSTs are more prominent in the benign tumors, in which patterns Antoni A and B are well established. Verocay bodies were observed in a small amount of samples. Low mitotic indexes were presented by both benign and malignant varieties. IHC showed that anti-vimentin and S-100 markers were positive in all samples, except in one of them (vimentin). Other markers were positive in a small number of samples, except actin, which was negative for all samples. Expression of Ki-67 revealed proliferative indexes with no significant statistical difference between malignant and benign tumors. However, multivariate analysis showed that the chances of an animal with malignant tumor develop recurrence was 4.61 times greater than an animal with benign tumor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Tumores de bainha de nervo. Na figura da esquerda, ilustra-se o crescimento de um schwannoma. Os axônios são deslocados para a periferia do tumor. Na direita, o crescimento de um neurofibroma, onde as células neoplásicas proliferam entre axônios. Fonte: UNICAMP – ANATOMIA PATOLÓGICA, 2013..... 22
- Figura 2-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Moderada celularidade tumoral, Obj. 4x. Hematoxilina e eosina (HE)..... 38
- Figura 3-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Massa bem delimitada, infiltrando a derme, Obj. 4x. HE..... 39
- Figura 4-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Arranjo celular do padrão Antoni A, de células fusiformes e alongadas, organizadas em feixes. Obj.10x, HE. 39
- Figura 5-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Arranjo celular do padrão Antoni A, de células fusiformes e alongadas, organizadas em feixes paralelos. Obj.20x. HE. 40
- Figura 6-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Feixes de células fusiformes que se entrecruzam com material acelular fibrilar, Corpo de Verocay (seta). Obj. 40x. HE. 40
- Figura 7-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni B, de células arredondadas, com contorno estrelado, e espaços intercelulares amplos, arranjadas frouxamente em uma matriz mucinosa. Obj. 20x. HE. 40
- Figura 8-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imagem sub macroscópica demonstrando variações na quantidade de tecido conjuntivo (azul) intra tumoral, Barra 1cm. Tricrômio de Masson (TM). 41
- Figura 9-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imagem sub macroscópica demonstrando variações na quantidade de tecido conjuntivo (azul) intra tumoral, Barra 1cm. TM..... 41
- Figura 10-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Discreta quantidade de tecido fibrovascular circundando células tumorais, Obj. 10x. TM. 42
- Figura 11-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni A. Moderada quantidade de tecido fibrovascular circundando células tumorais, Obj. 10x. TM..... 42
- Figura 12-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Moderada quantidade de tecido fibrovascular pericelular tumoral (azul), Obj. 40x. TM..... 42
- Figura 13-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni B com pequena quantidade de tecido fibrovascular pericelular, Obj. 40x. TM. 43
- Figura 14-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Lesão proliferativa não delimitada na derme, moderada celularidade. Obj. 10x. HE..... 43
- Figura 15-** Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Tumor de células fusiformes, formando feixes em diversas direções e circundadas por abundante quantidade de tecido fibrovascular. Obj. 20x. HE. 44

Figura 16- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Tumor de células fusiformes, formando feixes em diversas direções e circundadas por abundante quantidade de tecido fibrovascular. Obj. 20x. TM.....	44
Figura 17- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Tecido muscular normal (estrela) envolto por células neoplásicas com grande quantidade de tecido conjuntivo circundante. Obj.10x. TM.....	44
Figura 18- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Glândulas sudoríparas normais (estrela) circundadas por células neoplásicas e moderada quantidade de tecido conjuntivo. Obj. 20x. TM.....	45
Figura 19- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área de transição entre padrão Antoni A de células tumorais (estrela), e área de células tumorais envoltas por abundante quantidade de tecido conjuntivo (azul). Obj. 10x. TM.	45
Figura 20- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área de padrão Antoni A, formado por células fusiformes dispostas em paliçada e células alongadas e arredondadas em diversas direções. Obj. 40x. HE.....	46
Figura 21- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Invasão de células neoplásicas na derme, ao redor de anexos epiteliais como glândulas e folículos pilosos. Obj. 4x. HE.	47
Figura 22- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Alta celularidade tumoral. Obj. 10x. HE.	47
Figura 23- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Áreas de formação de paliçada de células tumorais, com citoplasma eosinofílico pálido e bordos indistintos. Obj. 20x. HE.	48
Figura 24- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área tumoral de células arredondadas, algumas multinucleadas. Obj. 40x. HE.	48
Figura 25- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Células tumorais dispostas em paliçada contendo pouco tecido fibrovascular pericelular. Obj. 20x. TM.	48
Figura 26- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, tecido subcutâneo, membro anterior, cão 47. A: proliferação de células neoplásicas fusiformes e alongadas, em diversas direções, circundadas por moderada quantidade de tecido conjuntivo. Obj. 20x. HE. B: evidenciação das fibras de tecido conjuntivo (azul) pericelulares das células neoplásicas (vermelho). Obj. 20x. TM.....	52
Figura 27- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pulmão, cão. A: área de metástase de tumor de células alongadas a arredondadas (estrela). Obj. 10x. HE. B: área de metástase de tumor de células alongadas a arredondadas com moderada quantidade de tecido com conjuntivo pericelular (em azul). Obj. 20x. TM.....	52
Figura 28- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcção citoplasmática difusa e acentuada de células neoplásicas fusiformes, dispostas em paliçada e por vezes redemoinhos, no centro, infiltrado inflamatório de linfócitos, Obj. 10x. IHQ anti-Vimentina.	53
Figura 29- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcção citoplasmática difusa e moderada de células neoplásicas fusiformes dispostas em paliçada, Obj. 20x. IHQ anti-Vimentina.	53

Figura 30- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcção citoplasmática difusa e moderada de células neoplásicas fusiformes e alongadas, Obj. 40x. IHQ anti-Vimentina.	54
Figura 31- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcção citoplasmática de células neoplásicas dispostas em paralelo em matriz mucinosa (Antoni B), Obj. 20x. IHQ anti-Vimentina.	54
Figura 32- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação difusa e acentuada, citoplasmática e por vezes nuclear de células neoplásicas fusiformes. Obj. 10x. IHQ anti-S-100.....	55
Figura 33- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação moderada, citoplasmática e por vezes nuclear de células neoplásicas fusiformes e alongadas. Obj. 20x. IHQ anti-S-100.....	55
Figura 34- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação difusa e acentuada, citoplasmática e por vezes nuclear de células fusiformes e alongadas dispostas em paliçada e feixes. Obj. 40x. IHQ anti-S-100.....	55
Figura 35- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação moderada a discreta, citoplasmática de células fusiformes e serpiginosas, em fundo de tecido conjuntivo não reativo à imuno-histoquímica utilizada. Obj. 20x. IHQ anti-S-100.	56
Figura 36- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação moderada, citoplasmática de células fusiformes e alongadas. Obj. 20x. IHQ anti-GFAP.	56
Figura 37- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação acentuada citoplasmática de algumas células fusiformes. Obj. 40x. IHQ anti-GFAP.....	57
Figura 38- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação discreta em raras células tumorais (flecha) e em vasos sanguíneos. Obj. 20x. IHQ anti-Fator VIII.	57
Figura 39- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação citoplasmática acentuada e focal de células alongadas, com citoplasma abundante, além de positividade em estruturas anucleadas, longas e finas (seta). Obj. 40x. IHQ anti-Neurofilamento.	58
Figura 40- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação citoplasmática acentuada e focal de células alongadas, com citoplasma abundante, além de positividade em estruturas anucleadas, longas e finas (seta). Obj. 40x. IHQ Neurofilamento.	58
Figura 41- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação nuclear de células em proliferação. Obj. 40x. IHQ anti-Ki-67.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistema de graduação histológica de tumores que leva em consideração o tamanho do tumor primário, a disseminação para linfonodos regionais e a presença ou ausência de metástase (TNM), em animais domésticos.....	14
Tabela 2- Anticorpos, recuperação antigênica, diluição e referência comercial utilizadas na imuno-histoquímica de tecidos de cães diagnosticados com tumores de bainha de nervo no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, durante o período de 2000-2012.	30
Tabela 3- Total de exames anatomopatológicos (Ap) realizados em diversas espécies; em cães; de pele de cães e tumores de bainha de nervo periférico (TBNP) de pele de cães diagnosticados por ano pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre 2000-2012.	33
Tabela 4- Dados referentes aos cães diagnosticados com tumor de bainha de nervo periférico na pele e tecido subcutâneo, no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2000-2012.	35
Tabela 5- Aspectos histológicos dos tumores de bainha de nervo periférico na pele e tecido subcutâneo de cães, diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2000-2012.	49
Tabela 6- Imunomarcção das amostras de tumores de bainha de nervo periférico de cães, diagnosticados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre os anos 2000-2012.....	60
Tabela 7- Distribuição das variáveis: tipo de tumor (benigno ou maligno), sexo, localização do tumor, média de núcleos marcados em Ki-67, anisocitose e anisocariose, mitoses, celularidade, necrose e invasão do tumor a tecidos adjacentes, em relação à categoria recidiva tumoral.....	64
Tabela 8- Modelo de regressão logística multivariada relacionada ao fator de risco para a ocorrência de recidiva tumoral.	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	NEOPLASIAS DE PELE DE CÃES	12
2.2	MARCADORES TUMORAIS IMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	14
2.3	TUMORES DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO	15
2.3.1	Tumores benignos de bainha de nervo periférico.....	18
2.3.2	Tumores malignos de bainha de nervo periférico.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	28
3.2	HISTOLOGIA	28
3.3	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	29
3.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA	29
3.4.1	Classificação imuno-histoquímica.....	31
3.5	PROGNÓSTICO.....	31
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4	RESULTADOS	33
4.1	AMOSTRAS SELECIONADAS.....	33
4.2	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	38
4.2.1	Tumores benignos da bainha de nervo periférico.....	38
4.2.2	Tumores malignos de bainha de nervo periférico.....	46
4.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
4.4	PROGNÓSTICO.....	63
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo, e pode refletir uma grande variedade de processos patológicos externos e internos como ectoparasitoses, doenças imunomediadas, endoparasitoses, distúrbios endócrinos, problemas nutricionais e neoplásicos (BANKS, 1992; HAUCK, 2013).

Por causa de sua exposição, lesões e massas envolvendo este órgão são facilmente observadas pelos proprietários dos animais acometidos (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). As neoplasias cutâneas são frequentes em cães, e representam 20% a 40% de todos os neoplasmas diagnosticados na espécie (KALDRYMIDOU *et al.*, 2002; PAKHRIN *et al.*, 2007; MEIRELLES *et al.*, 2010, HAUCK, 2013). Os neoplasmas podem ter como origem células epiteliais, mesenquimais e melanocíticas (HAUCK, 2013). Sua localização e extensão são variáveis, dependentes do tipo celular envolvido e estágio de evolução da doença (HARGIS; GINN, 2007).

Os tumores mesenquimais da pele e de tecidos moles abrangem uma grande variedade de neoplasmas, alguns, de classificação incerta (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002) e seu diagnóstico pode tornar-se um desafio tanto na medicina humana, quanto na veterinária (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; WILLIAMSON; MIDDLETO, 1998; WEISS; GOLDBLUM, 2001a). Entre estas neoplasias, os tumores de bainha de nervos periféricos (TBNP), comumente diagnosticados em humanos (WEISS; GOLDBLUM, 2001a), e com menor frequência em animais domésticos (VEAZEY *et al.*, 1993; OMI *et al.*, 1994; NIELSEN *et al.*, 2007; SCHULMAN *et al.*, 2009; PAVARINI *et al.*, 2013), compõem um grupo heterogêneo de neoplasmas, de nomenclatura excepcionalmente confusa (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995). Os TBNP incluem os schwannomas, neurofibromas, perineuromas, neuroma traumático e tumores malignos da bainha de nervo periférico (JOSHI, 2012). São derivados de células mielinizadoras do sistema nervoso periférico e são compostos basicamente por células de Schwann (JOSHI, 2012).

Este trabalho tem como objetivos: determinar a frequência dos tumores de bainha de nervo periférico cutâneos em cães, diagnosticados pelo Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. Determinar quais raças, sexo, faixas etárias e locais do corpo do animal são mais acometidos. Aliado a isto, objetiva-se ainda descrever as características histológicas, imuno-histoquímicas e prognósticas destes neoplasmas na população estudada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias de Pele de Cães

Os processos corpóreos normais dependem de regulação cuidadosa da divisão celular. Se as células recebem permissão para que se multipliquem, torna-se essencial que elas o façam somente quando exigido (TIZARD, 2002). Como resultado de uma exposição a certos produtos químicos, fatores físicos, hormonais, infecções virais ou a uma mutação, as células podem ocasionalmente se livrar das restrições que normalmente regulam sua divisão celular. Uma célula que se prolifera de maneira descontrolada dará origem a uma clonagem crescente de células, formando um neoplasma (TIZARD, 2002).

A pele tem um alto índice de renovação celular, o que aumenta as chances de mutações, e surgimento de tumores (MURPHY, 2006). Além disso, a pele é continuamente exposta a uma grande variedade de injúrias como do tipo químicas, físicas e ambientais, o que aumenta as chances de alterações neoplásicas (KALDRYMIDOU *et al.*, 2002).

Neoplasmas de pele e de tecidos moles abrangem uma ampla variedade de tumores, dentre os quais, muitos são extremamente comuns em medicina veterinária (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; GROSS *et al.*, 2009). Por essas lesões envolverem a pele, são facilmente observadas pelo proprietário e frequentemente removidas pelo médico veterinário que as enviarão para a análise histopatológica (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; HAUCK, 2013). Quanto a frequência, as neoplasias cutâneas perfazem entre 20-54% das neoplasias diagnosticadas em cães (SOUZA *et al.*, 2006; PAKHRIN *et al.*, 2007; MEIRELLES *et al.*, 2010; SOARES, 2010).

Basicamente, os tecidos e tumores tem origem mesenquimal ou epitelial. Os elementos mesenquimais incluem tecido conjuntivo, músculo liso e estriado, células sanguíneas, células endoteliais e tecidos relacionados (sinóvia, mesotélio, e meninges). Já as células epiteliais incluem as células da epiderme, epitélio escamoso da pele, células de revestimento os sistemas respiratório, digestivo, urinário, tratos reprodutivos, todas as glândulas, exócrinas e endócrinas, e células de origem neuroectodérmica como os melanócitos (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

Entre as principais neoplasias cutâneas diagnosticadas em cães no sul do Brasil, estão os mastocitomas, carcinomas de células escamosas, lipomas, adenomas perianais, tricoblastomas, carcinomas apócrinos e perianais (SOUZA *et al.*, 2006; MEIRELLES *et al.*, 2010). Adicionados a esta lista, referem-se ainda os fibrossarcomas e hemangiopericitomas como de ocorrência frequente (HAUCK, 2013).

Quanto à predisposição racial, os cães sem raça definida (SRD) são frequentemente citados em pesquisas (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002; SOARES, 2010), seguidos normalmente por Cocker Spaniel, Boxer, Poodle e Pastor Alemão (MEIRELLES *et al.*, 2010). No que diz respeito ao sexo e idade, machos e fêmeas apresentam incidência similar (MEIRELLES *et al.*, 2010), enquanto que animais com média de oito anos são diagnosticados com maior frequência com alguma neoplasia cutânea e/ou subcutânea (MEIRELLES *et al.*, 2010).

Dentro das várias categorias histogênicas, os tumores são usualmente divididos em benignos e malignos. Os benignos, que são os que mais se assemelham ao tecido normal, possuem capacidade limitada de crescimento autônomo. Exibem uma pequena tendência a invasão local e são conhecidos por uma baixa recorrência local quando precedidos de terapia conservativa (WEISS; GOLDBLUM, 2001a). Já os tumores malignos, são localmente agressivos e possuem capacidade invasiva ou crescimento destrutivo, recorrência, e metástases em locais distantes. Frequentemente, procedimentos cirúrgicos radicais são necessários para se garantir a remoção total do tecido neoplásico (WEISS; GOLDBLUM, 2001b).

Entretanto, estas nomenclaturas não indicam a probabilidade nem a rapidez com que metástases podem ocorrer. Por estas razões, é importante qualificar os termos com o grau de diferenciação ou grau histológico. A graduação histológica é um meio de quantificar o grau de diferenciação através de um conjunto de critérios histológicos (WEISS; GOLDBLUM, 2001a). Em animais domésticos, estes critérios foram propostos por Owen (1980), conhecido como “Sistema TNM” – que leva em consideração três condições gerais, (T) tamanho do tumor primário; (N) disseminação para linfonodos regionais e (M) presença ou ausência de metástases (Tabela 1).

Tabela 1- Sistema de graduação histológica de tumores que leva em consideração o tamanho do tumor primário, a disseminação para linfonodos regionais e a presença ou ausência de metástase (TNM), em animais domésticos.

Tumor primário	
T0	Sem evidência de neoplasia
T1	Tumor <1cm de diâmetro, não invasivo
T2	Tumor 1-3cm, localmente invasivo
T3	Tumor >3cm, ou ulceração evidente, ou invasão local
Linfonodo	
N0	Sem evidência de invasão em linfonodo
N1	Linfonodo firme, aumentado
N2	Linfonodo firme, aumentado e fixo ao tecido adjacente
N3	Envolvimento do linfonodo além do primeiro estágio
Metástase	
M0	Sem evidência de metástase
M1	Metástase em um órgão ou sistema
M2	Metástase em mais de um órgão e/ou sistema

Fonte: OWEN, L. N. World Health Organization, 1980.

2.2 Marcadores tumorais imuno-histoquímicos

O diagnóstico histopatológico é amparado por técnicas suplementares, como a imuno-histoquímica (IHQ). Os tumores malignos em especial apresentam um grande espectro de aparências morfológicas, o que por vezes, torna sua identificação laboriosa, assim, em determinados caso faz-se necessário o emprego de técnicas auxiliares de diagnóstico (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002; MURPHY, 2006).

Filamentos intermediários onipresentes e proteínas citoplasmáticas estruturais são os marcadores usados com maior frequência na identificação imuno-histoquímica de tumores. Citoqueratina e vimentina são os filamentos intermediários mais utilizados, pois todas as células epiteliais possuem citoqueratina e a maioria das células mesenquimais possui vimentina (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

Erros de interpretação podem facilmente ocorrer quando apenas um anticorpo é utilizado. Um painel de anticorpos é mais provável de prover informações úteis e acuradas (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002). Fixação adequada, uso de controles e técnicas de marcação consistentes são essenciais para uma interpretação apropriada da IHQ (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002; TAYLOR; SHI; BARR, 2010).

2.3 Tumores de Bainha de Nervo Periférico

Tumores de bainha de nervo periférico (TBNP) em medicina veterinária são mais frequentes em bovinos e caninos, seguidos de equinos, felinos, caprinos e outras espécies (VEAZEY *et al.*, 1993; OMI *et al.*, 1994; NIELSEN *et al.*, 2007; SCHULMAN *et al.*, 2009; PAVIA *et al.*, 2011; PAVARINI *et al.*, 2013).

A incidência destes tumores, varia em torno de 0,5% (SOUZA *et al.*, 2006) a 2,41% (PAKHRIN *et al.*, 2007) entre as neoplasias mesenquimais cutâneas de cães. Os caninos afetados costumam ser de raças de médio e grande porte, com idade mediana ou idosos (faixa etária de 7,3 a 8,3 anos) (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; MCENTEE; DEWEY, 2013).

Apesar de possuírem este nome, os TBNP podem ocorrer em qualquer local do corpo. Podem envolver nervos fora do cérebro ou da medula espinhal (grupo periférico), nervos imediatamente adjacentes ao cérebro e medula espinhal (grupo de raízes) ou nos plexos braquial e lombossacral (grupo de plexos) (BREHM *et al.*, 1995). Nos cães, a neoplasia afeta mais comumente o quinto par de nervos cranianos ou raízes espinhais nervosas, como as raízes do plexo braquial e suas extensões, assim como as raízes nos níveis torácicos e lombares (ZACHARY, 2007; MCENTEE; DEWEY, 2013).

Os sinais clínicos apresentados dependem da localização anatômica do tumor. O sinal típico envolve a combinação de uma massa palpável envolvendo um nervo periférico, perda da função do nervo local, e/ou dor (SUGHRUE; LEVINE; BARBARO, 2008). Em muitos casos, as alterações clínicas típicas são de claudicação unilateral progressiva do membro afetado, que muitas vezes escapa ao diagnóstico por meses. Estes cães são frequentemente avaliados por possíveis problemas ortopédicos antes de se avaliar o potencial de um tumor do nervo periférico (BREHM *et al.*, 1995; MCENTEE; DEWEY, 2013).

A nomenclatura destes tumores é excepcionalmente confusa. Numerosas designações têm sido usadas na literatura médica e veterinária, incluindo schwannoma, neurinoma, neurilemmonma, neurofibroma e neurofibrossarcoma (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995).

Em geral, os TBNP devem ser diferenciados de tumefações focais de nervos. Estes neuromas proliferativos, porém, não neoplásicos, são lesões hiperplásicas que representam um processo de reparação desordenado (KRINKE, 2011). Geralmente são o resultado de um trauma, como nos cortes de cauda (GROSS *et al.*, 2009). Além disso

os TBNP cutâneos também devem ser diferenciados de outros neoplasmas como hemangiopericitomas e fibromas, que podem possuir conformação morfológica similar (ZACHARY, 2007).

Recentemente, tem sido aceito que a classificação destes tumores é arbitrária, e por isso, têm sido agrupados simplesmente como tumores benignos ou malignos de bainha de nervo periférico (ZACHARY, 2007; KRINKE, 2011). De Lahunta (2010) ainda observou que a nomenclatura atual pode ser equivocada, já que todos os nervos são periféricos, e não necessitariam desta denominação redundante.

Normalmente os TBNP tendem a serem firmes ou moles; brancacentos ou acinzentados, e localizam-se principalmente em membros (CHIJIWA; UCHIDA; TATEYAMA, 2004); GAITERO *et al.*, 2008). Microscopicamente, as características descritas em seres humanos também são aplicáveis em animais. Em humanos, o schwannoma é caracterizado por ter duas características morfológicas conhecidas como padrão Antoni A e padrão Antoni B, que ocorrem em proporções variáveis nos tumores (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Estes padrões foram descritos pela primeira vez em 1920 pelo neurologista sueco Nils Antoni (JOSHI, 2012). As áreas denominadas como Antoni A, são regiões altamente celulares e consistem em células de Schwann monomórficas de formato fusiforme arranjadas em feixes. Estas células possuem citoplasma eosinofílico pobremente definido e núcleo puntiforme basofílico. Além disso, um estroma colagenoso de variável extensão está presente. Podem estar presentes ainda, os corpos de Verocay, arranjos de células neoplásicas em que os núcleos encontram-se enfileirados em paliçada, entre os quais está a matriz citoplasmática em paralelo (ZACHARY, 2007), o que reflete a secreção de laminina destes (JOSHI, 2012). Estes arranjos foram descritos em 1910, pelo neuro-patologista uruguaio José Verocay (JOSHI, 2012).

Já o padrão Antoni B, que também é composto por células de Schwann, apresenta células com citoplasma inconspícuo e núcleo que parece suspenso em uma matriz mixoide, frequentemente microcística (ROSAI, 2004)

Quanto ao tratamento, este fica restrito à cirurgia, envolvendo a amputação e ressecção do plexo envolvido, a laminectomia ou hemilaminectomia, para remoção da raiz do nervo (VOLL *et al.*, 2006; MCENTEE; DEWEY, 2013). Exames de imagem transversal pré-operatória são recomendados para definir a extensão da doença e para o pré-planejamento, particularmente quando se considera a terapia de combinação (MCENTEE; DEWEY, 2013). Radioterapia adjuvante é uma opção de procedimento

pós-operatório, quando existe o risco de resíduos da doença. Porém, muitos animais são submetidos à eutanásia durante o procedimento cirúrgico exploratório, devido ao reconhecimento da extensão da lesão (BRADLEY; WITHROW; SNYDER, 1982).

O uso da imuno-histoquímica para auxiliar a diagnóstico de TBNP é aplicado com frequência e uma variedade de marcadores para identificar células de origem neural periférica (S-100, GFAP, proteína básica mielínica, enolase específica neuronal) são utilizados, porém são reconhecidamente inespecíficos, ou apresentam reatividade cruzada em animais domésticos (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

O prognóstico para TBNP em cães depende em parte da localização do tumor e mesmo se o tumor é susceptível de cirurgia (amputação, laminectomia, ou a combinação de ambas), com informações muito limitadas sobre os resultados da terapia adjuvante. Para os animais já tratados cirurgicamente, o prognóstico tem sido relatado como reservado a ruim, apesar de que a detecção precoce da neoplasia pode melhorar esta relação (BREHM *et al.*, 1995).

Inicialmente, na medicina veterinária, utiliza-se como ferramentas a classificação do tumor. Esta é baseada na avaliação de critérios morfológicos como o grau de diferenciação celular, invasão, celularidade geral, índice mitótico e necrose, que são examinados sozinhos ou combinados (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

Com o emprego da IHQ, além de se obter os marcadores de identificação de origem celular, pode-se utilizá-la como auxiliar no estabelecimento de um prognóstico. No caso dos TBNP, utiliza-se o Ki-67. Este antígeno é uma proteína nuclear, expressada durante todas as fases ativas do ciclo celular (fases G₁, S, G₂ e M), e ausente em células em repouso (fase G₀) (GERDES *et al.*, 1984). Durante a inter-fase, o antígeno pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo, ao passo que nas mitoses a maior parte da proteína é relocada para a superfície dos cromossomos. O antígeno é rapidamente degradado quando a célula entra em um estado não proliferativo, e aí parece não haver expressão de Ki-67 durante o processo de reparo do DNA (KEY; KUBBUTAT; GERDES, 1994).

Outra proteína nuclear utilizada na predição de comportamento tumoral, a p53, é um gene supressor tumoral ativado quando existe dano ao DNA, sinais anormais de crescimento e outros fatores de estresse intrínsecos e extrínsecos. O nível de proteína p53 é autorregulado através de enzimas, como a MDM2 via ubiquitinação. Em células normais, a concentração de proteína p53 é geralmente abaixo do nível detectável por métodos imuno-histoquímicos. Mutações do gene p53 estão entre as mudanças

moleculares mais comuns identificadas em neoplasmas de humanos. Estas mutações podem resultar em acúmulo e superexpressão de proteína p53 mutante. Muitas destas mutações ocorrem no domínio de ligação da proteína, o que proíbe a p53 mutante de se ligar apropriadamente ao alvo no DNA (OREN, 1999; VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000).

Recentemente, tem-se avaliado ainda a expressão das proteínas de choque térmico (HSP ou chaperonas) nos TBNP. Particularmente em humanos, estas proteínas têm sido investigadas nos gliomas (YANG; FANG; PARSA, 2010). Em cães, informações limitadas estão disponíveis, porém promissoras (ROMANUCCI *et al.*, 2013). Estas proteínas são induzidas em altos níveis em condições de stress celular causado por vários tumores e estão associadas a um prognóstico ruim e resistência à terapia. O aumento da transcrição das HSP nas células tumorais se deve à perda da função da p53 e a uma maior expressão de proto-oncogenes HER2 e c-Myc, cruciais na tumorigênese. São essenciais no crescimento tumoral já que promovem o crescimento autônomo das células em proliferação e inibe os caminhos de morte celular (CALDERWOOD *et al.*, 2006).

2.3.1 Tumores benignos de bainha de nervo periférico

Em seres humanos, os tumores benignos da bainha neural periférica (TBBNP) são frequentemente subclassificados como schwannomas, neurotecomas, neurofibromas e perineuromas (WEISS; GOLDBLUM, 2001a). Nos tumores bem diferenciados, os elementos celulares podem ser discriminados de acordo com as características morfológicas (KRINKE, 2011). A classificação baseia-se em achados como presença ou ausência de encapsulação, quantidade e tipo de estroma e, presumivelmente, origem celular (WEISS; GOLDBLUM, 2001a).

Em cães, os TBBNP normalmente se apresentam como massas cutâneas circunscritas e lobuladas de consistência variável (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; GROSS *et al.*, 2009). Geralmente, elas medem cerca de dois a três cm de diâmetro, mas ocasionalmente podem chegar até cinco cm. A maioria delas se desenvolve no tecido subcutâneo, podendo se expandir até a derme. A pele subjacente pode estar atrofiada, alopecica, e frequentemente ulcerada (ROSS *et al.*, 2009).

Os TBBNP cutâneos são neoplasias incomuns em cães e gatos. Não obstante é difícil avaliar a incidência exata desses tumores, uma vez que eles possuem

características histológicas e imunofenotípicas muito semelhantes com outros tumores de células alongadas. Dessa forma, em muitas instâncias, eles podem não ser percebidos, ou ser subdiagnosticados, dependendo dos critérios adotados (GROSS *et al.*, 2009).

Com exceção dos tumores benignos de bainha de nervo periférico mixoide, uma subclassificação histológica clara para os TBBNP ainda não está disponível para cães e gatos (GROSS *et al.*, 2009). Por razões como a inespecificidade e a utilização restrita de alguns de marcadores, os tumores que surgem e se disseminam pela bainha dos nervos periféricos são todos classificados sob o termo de tumor de bainha de nervo periférico (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

Devido ao grande potencial regenerativo dos nervos periféricos, proliferação acentuada das células de Schwann em reação à lesão neural pode ocorrer em neoplasias de tecido conectivo, e assim, estas células reativas formam uma parte substancial do tecido tumoral (KRINKE, 2011). Na medicina humana, os tumores formados basicamente por células de Schwann, são denominados schwannoma. Em cães, ocorrem com pouca frequência (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). As células de Schwann não produzem colágeno, são positivas para proteína S-100 e são circundadas por lâmina basal (KRINKE, 2011). Têm como função básica a formação da mielina e estão associadas intimamente às fibras nervosas, e provavelmente aos oligodendrócitos (BANKS, 1992).

Os schwannomas são geralmente lesões expansivas e compressivas, que podem ter uma cápsula derivada do perineuro (KRINKE, 2011). Possuem normalmente coloração brancacenta a acinzentada, muitas vezes protruem discretamente na superfície de corte, e quando maiores, possuem áreas císticas (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; ROSAI, 2004). Ficam localizados, com mais frequência, na região do tronco e na porção distal dos membros (GROSS *et al.*, 2009).

São massas variavelmente demarcadas que podem ser delineadas por uma fina cápsula ou, ainda, podem se apresentar na forma desencapsulada. A última forma se localiza principalmente no tecido subcutâneo e, ocasionalmente, emite projeções delicadas a partir do tecido tumoral que se estendem até a gordura adjacente, ao longo dos planos fasciais. Isso explica a alta taxa de recidiva observada após a excisão desses tumores (GROSS *et al.*, 2009).

Os schwannomas são massas compostas por células fusiformes arranjadas em feixes, paliçadas ou enoveladas. Possuem baixa celularidade, com células fusiformes ou

poligonais distribuídas frouxamente numa matriz fibrilar ou mucinosa. O núcleo é pequeno e normocromático (HENDRICK *et al.*, 1998). A clássica configuração de bandas Antoni A com corpos de Verocay tem sido considerada a chave dos schwannomas em humanos, porém essas características são raramente observadas em tumores de animais domésticos (HENDRICK *et al.*, 1998; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Ocasionalmente, células com núcleo hiperchromático bizarro são observadas, particularmente comuns em schwannomas antigos de humanos sem significado particular (ROSAI, 2004). Pequenos nervos são observados ocasionalmente no ou adjacente ao tumor, porém a presença deles não preclui outra origem celular (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; GROSS *et al.*, 2009).

Outras três formas de schwannoma são ainda reconhecidas na medicina humana. O schwannoma celular, termo utilizado para schwannomas altamente celulares, que são compostos exclusivamente por áreas de padrão Antoni A, porém sem corpos de Verocay, compostas por células de Schwann bem diferenciadas. Estas mudanças podem ser acompanhadas por atipia nuclear, atividade mitótica e necrose focal (CASADEI *et al.*, 1995; ROSAI, 2004). Uma importante pista para este diagnóstico inclui agregados de macrófagos espumosos, uma cápsula bem formada contendo agregados linfóides e uma marcação imuno-histoquímica difusa e forte para proteína S-100 e expressão de colágeno tipo IV pericelular. Este padrão de marcação em S-100 é extremamente incomum em tumores malignos da bainha de nervo periférico fusiforme, e este achado deve sempre levantar a hipótese de um schwannoma celular (CASADEI *et al.*, 1995). Esta variante é relativamente incomum, porém é importante por sua celularidade, padrão de crescimento fascicular, alta atividade mitótica e de comportamento ocasionalmente localmente destrutivo, que inclui erosão óssea, muitas vezes uma pronta consideração de malignidade. A maioria dos casos relatados em humanos ocorre no retroperitônio, pelve e mediastino (ROSAI, 2004).

A segunda forma, o schwannoma melanótico psamomatoso, é um tipo raro e distinto de tumor de nervo periférico que ocorre como um componente da síndrome de Carney. A maioria surge da raiz de nervos espinhais. Como o nome indica, o tumor se caracteriza microscopicamente pela presença de pigmentação por melanina e deposição de corpos psamomatosos. Esta variedade tem baixo grau de malignidade por sua tendência à recorrência local e aos poucos casos de metástase que foram relatados em medicina humana (MENNEMEYER *et al.*, 1979; ROSAI, 2004). Em cães, esta é uma

variedade extremamente rara, com características malignas e que foi diagnosticada na medula espinhal (PATNAIK; ERLANDSON; LIEBERMAN, 1984).

O schwannoma plexiforme ocorre geralmente em locais superficiais, pele ou tecido subcutâneo, e é definido por um padrão plexiforme de crescimento. Tende a ser menos circunscrito que o schwannoma clássico, e é composto pelo padrão Antoni A. São problemáticos os raros schwannomas plexiformes que crescem em locais anatômicos profundos, em tecidos moles ou em nervos periféricos maiores, já que eles demonstram alta celularidade e atividade mitótica, e por isso, difíceis de distinguir de um tumor maligno da bainha de nervo periférico (TBBNP). O diagnóstico pode ser determinado com a presença de marcação generalizada de S-100, colágeno IV e lâmina basal (HÉBERT-BLOUIN *et al.*, 2010).

Quanto ao tratamento dos schwannomas cutâneos, a excisão completa geralmente é curativa, porém alguns se tornam recorrentes. Recorrência é especialmente comum em cavalos, necessitando muitas vezes de múltiplas cirurgias (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

A distinção entre schwannoma e neurofibroma pode ser feita pela observação de marcação para S-100, GFAP e outros marcadores neurais, porém, com a não especificidade destes marcadores, a diferenciação é difícil (HENDRICK *et al.*, 1998). O diagnóstico diferencial de perineuroma pode ser feito, já que este não expressa proteína S-100 e é formado por células perineurais arranjadas em anéis concêntricos (KRINKE, 2011).

Hemangiopericitomas podem apresentar grande semelhança celular com os TBBNP, fazendo com que seja difícil diferenciá-los. Uma formação espiralada e concêntrica ao redor dos ramos capilares centrais é um achado comum nos hemangiopericitomas. Entretanto, esse mesmo padrão pode ser visto nos TBBNP. Comparativamente aos TBBNP, os hemangiopericitomas são mais celulares, na maior parte dos casos. O predomínio de núcleos fusiformes com nucléolos pequenos torna o diagnóstico de TBBNP mais consistente, visto que os hemangiopericitomas possuem núcleos mais redondos (GROSS *et al.*, 2009). Outros diagnósticos diferenciais a serem considerados incluem o fibroma, o fibrossarcoma, o lipoma de células alongadas e o dermatofibroma (GROSS *et al.*, 2009) todos de origem celular diferente da dos schwannomas.

Na medicina humana, o fato de que alguns tumores e os schwannomas dividem certas similaridades, não justifica uni-los sob uma única denominação (ROSAI, 2004).

No caso dos neurofibromas, a aparência macroscópica varia de lesão para lesão. Na pele, são massas borrachentas, pequenas, pedunculadas e protruindo da pele, já os tumores mais profundos são maiores (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995; ROSAI, 2004). Como regra, os tumores não são encapsulados e possuem consistência mais macia que a dos schwannomas (ROSAI, 2004).

Enquanto os schwannomas tipicamente crescem dentro de uma cápsula e permanecem anexados ao nervo originário, que pode ser observado na periferia, achatado ao longo da cápsula, sem penetrar o tumor, os neurofibromas crescem difusamente ao longo do nervo (ROSAI, 2004; JOSHI, 2012)(Figura 1).

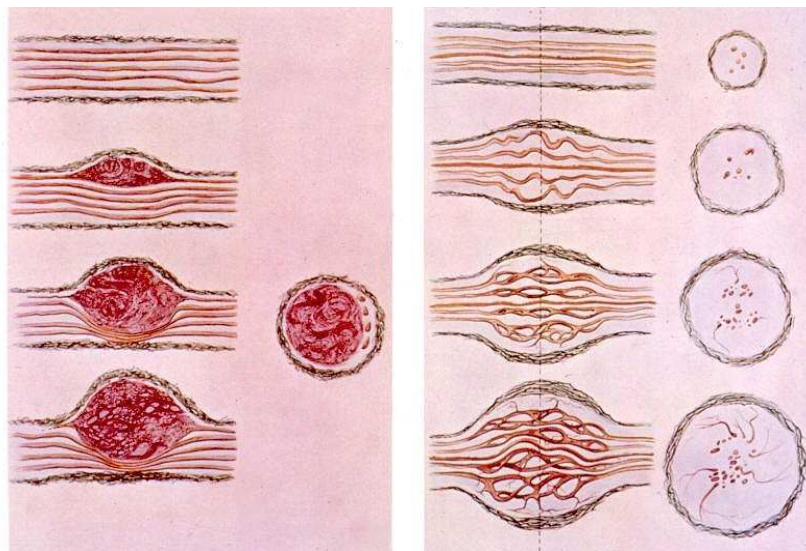


Figura 1- Tumores de bainha de nervo. Na figura da esquerda, ilustra-se o crescimento de um schwannoma. Os axônios são deslocados para a periferia do tumor. Na direita, o crescimento de um neurofibroma, onde as células neoplásicas proliferam entre axônios. Fonte: UNICAMP – ANATOMIA PATOLÓGICA, 2013.

Microscopicamente, três padrões de crescimento foram observados na medicina veterinária: localizado, plexiforme e difuso (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009). O primeiro e mais comum, costuma envolver um nervo maior, e tipicamente resulta numa expansão fusiforme do tronco do nervo (subtipo intraneural) (WATABE *et al.*, 1983). No neurofibroma plexiforme, os nervos afetados se expandem de forma irregular, à medida que cada um de seus fascículos é infiltrado pela neoplasia (FROSCH; ANTHONY; GIROLAMI, 2010). E no difuso, os tumores são caracterizados por um aumento similar a uma placa usualmente na cabeça ou no pescoço (WATABE *et al.*, 1983).

Basicamente, os neurofibromas são compostos por células de Schwann (predominantes) e células perineurais (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002), além de

components não neoplásicos de nervo periférico como fibroblastos, axônios (JOSHI, 2012) e diversas células inflamatórias, como mastócitos e linfócitos. Adicionado a estas células, podem ser observadas células CD34 positivas, de histogênese incerta (CARROLL, 2012). As células de Schwann desta neoplasia possuem núcleo alongado, hipercromático e disperso com uma configuração ondulada a serpentina e final aguçado, além de serem menores do que os observados nos schwannomas (KRINKE, 2011). Podem apresentar alta celularidade, porém a atividade mitótica é baixa ou ausente (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009).

O estroma pode conter diversos mastócitos, uma rica e variável quantidade de fibras colágenas (I, III, IV, V e VI) além de estruturas organoides distorcidas lembrando corpúsculos de Wagner-Meissner ou de Pacini. Em contraste com os schwannomas, não são observados corpos de Verocay, núcleos em paliçada e hialinização da parede de vasos (ROSAI, 2004; SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009). Uma subpopulação das células dos neurofibromas são imunorreativos a proteína S-100 e circundados por componentes da membrana basal (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009), e os axônios são demonstrados pela IHQ para neurofilamento (ROSAI, 2004).

Deve-se suspeitar de transformação maligna, quando se observam mitoses frequentes, excessiva expressão de marcadores de proliferação celular e presença de p53 em muitas células tumorais (KINDBLOM *et al.*, 1995).

Outra variante de TBBNP, é o perineuroma, extremamente raro, e foi descrito um caso em um canino (CUMMINGS; LAHUNTA, 1974). Composto predominantemente ou exclusivamente por células perineurais, é formado por células extremamente alongadas e arranjadas em feixes paralelos. Alguns casos possuem padrão de crescimento estoriforme, e podem corresponder aos fibromas perineurais estoriformes (ROSAI, 2004).

Em sua ultraestrutura, é caracterizado por finos processos citoplasmáticos não ramificados, revestidos por uma lâmina externa e unidos em suas porções finais por uma junção estreita, poucas organelas, filamentos de actina e vimentina e diversas vesículas pinocitóticas (ROSAI, 2004). É observado como uma única massa ou múltiplos nódulos nas raízes dos nervos espinhais. Histologicamente, consiste em novelos concêntricos de células fusiformes, num padrão chamado de bulbo de cebola, formado ao redor de um cerne axônico central variavelmente mielinizado (KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Na IHQ, as células tumorais são positivas para antígeno de membrana epitelial (EMA) e Glut-1, e negativas para S-100, lembrando o perfil de células perineurais normais (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995; ROSAI, 2004; ORTIZ-HIDALGO; WELLER, 2007).

Há ainda os TBNP mixoides, que são especulados como tendo relação, se não forem idênticos aos neurotecomas (TELLECHEA; REIS; BAPTISTA, 1992; ROSAI, 2004).

Pode ocorrer na pele, em tecidos moles ou intra-espinhal em humanos (ROSAI, 2004) e em cães, é observado nos dígitos (GROSS *et al.*, 2009). Possui aparência macroscópica e microscópica que lembra um mixoma, exceto pela presença de células epitelioides, poliédricas e ocasionalmente multinucleadas, e um distinto arranjo fascicular ou plexiforme (TELLECHEA; REIS; BAPTISTA, 1992; ROSAI, 2004). Além disso, possui uma configuração multilobulada, com pequenas células alongadas e estreladas que formam redemoinhos concêntricos e frouxos, em um ambiente extremamente mucinoso, rico em ácido mucopolissacarídico (GROSS *et al.*, 2009).

O diagnóstico diferencial inclui perineuroma, que possui características mixoides, o neurofibroma mixoide, imunorreativo para S-100 (ROSAI, 2004), o mixoma e o mixossarcoma de baixo grau de malignidade (GROSS *et al.*, 2009).

2.3.2 Tumores malignos de bainha de nervo periférico

Em seres humanos, os TMBNP podem ser subclassificados como schwannoma maligno, neurofibrossarcoma (WEISS; GOLDBLUM, 2001b) e sarcoma neurogênico (ROSAI, 2004). Manifestam-se com pouca frequência em cães, representando cerca de 0,5% das neoplasias neurais observadas na espécie (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992).

Sua exata incidência é difícil de ser avaliada. Os TMBNP caninos podem demonstrar variáveis padrões histológicos como visto em humanos, porém, as características destes tumores não estão bem estabelecidas. Por isso, o diagnóstico destas neoplasias é confundido com outros, de tecidos moles (CHIJIWA *et al.*, 2004). Devido à grande semelhança histopatológica existente entre os TMBNP e outras neoplasias de células alongadas, como os fibrossarcomas, os mixomas, os hemangiopericitomas, os melanomas amelanóticos de células alongadas e os sarcomas

histiocíticos, os tumores neurais podem ser subdiagnosticados ou sobrediagnosticados (HENDRICK *et al.*, 1998; GROSS *et al.*, 2009).

A média de idade dos indivíduos afetados é de nove anos para cães, e afirma-se que haja predisposição de animais da raça Golden Retriever (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992). Quanto à localização, normalmente são profundos, mas podem se originar na subcútis, podendo se estender até a derme (ROSAI, 2004; GROSS *et al.*, 2009). Na maior parte dos casos, localizam-se no tronco do animal ou nas extremidades (GROSS *et al.*, 2009). Ocasionalmente, TMBNP são encontrados em nervos periféricos maiores ou outro local no tecido subcutâneo, tendo aparência sugestiva de origem neuroectodérmica primitiva (ROSAI, 2004).

Em alguns TMBNP, parte ou a maior parte do tumor é composta por células amplas com citoplasma poligonal acidofílico e aparência epitelióide, designados como TMBNP epitelióides (DICARLO *et al.*, 1986).

Semelhante à sua variante benigna, as células tumorais dos tumores malignos são presumivelmente oriundas das células de Schwann (SUMMERS *et al.*, 1992).

A maioria das massas mede mais de 2cm de diâmetro, é pobremente definida e usualmente se adere firmemente ao tecido mole subjacente (GROSS *et al.*, 2009). Manifestam-se na forma de massas subcutâneas e desencapsuladas, que exibem um crescimento infiltrativo aos tecidos mais profundos, incluindo a gordura adjacente e os planos fasciais (WEISS; GOLDBLUM, 2001b).

Microscopicamente, pequenos ramos de células tumorais enveladas invadem o tecido mole subjacente e se proliferam ao longo dos planos fasciais e das bainhas neurais. Esse padrão de crescimento explica porque os tumores de bainha neural periférica normalmente recidivam. Os tumores dérmicos mais incomuns normalmente se estendem até a junção dermoepidérmica, de forma semelhante aos dermofibrossarcomas dos seres humanos (WEISS; GOLDBLUM, 2001b). Observa-se ainda uma lâmina basal ao redor de algumas células singulares, assim como ao redor de células tumorais, o que pode ser constatado à microscopia eletrônica e à IHQ, sustentando tal hipótese (ROSAI, 2004).

De forma geral, os tumores malignos possuem maior celularidade e os padrões neuronais podem ser sutis. Consequentemente, os padrões de Antoni A e B são menos evidentes na maior parte dos casos. As células tumorais encontram-se embebidas em um estroma delicadamente colagenoso. Zonas de necrose e de esclerose podem aparecer. Alterações mixóides do estroma podem ocorrer e, às vezes, a matriz extracelular exibe

diferenciação cartilaginosa, óssea (GROSS *et al.*, 2009), muscular (PATNAIK *et al.*, 2002) e de epitélio escamoso (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995).

As massas tumorais apresentam número variável de células alongadas, robustas e pleomórficas, arranjadas em feixes entrelaçados, ao passo que um padrão espiralado ou em paliçada, indicando a reduplicação de receptores táteis, é menos pronunciada que nos tumores benignos (HENDRICK *et al.*, 1998; GROSS *et al.*, 2009). As células apresentam núcleo vesicular que pode ser fusiforme, ovóide ou serpiginoso, observando-se um contraste marcante entre o núcleo hipercromático e o citoplasma pálido, pobremente definido e moderadamente alongado (ROSAI, 2004; GROSS *et al.*, 2009). Cerca de cinco figuras de mitose a cada 10 campos de aumento de 40x são observadas, assim como mitoses atípicas (GROSS *et al.*, 2009). Ainda é possível distinguir uma concentração de células tumorais perivasculares, com aspecto túrgido, aparência epitelióide das células endoteliais destes vasos, presença de grandes espaços vasculares, e áreas de necrose com paliçadas do tumor nas bordas (ROSAI, 2004). Melanina pode estar presente nas células tumorais, especialmente se o tumor se originar das células das raízes de nervos espinhais (KRAUSZ; AZZOPARDI; PEARSE, 1984).

Os tumores tendem a recidivar após a excisão cirúrgica. Tal incidência é mais alta em gatos do que em cães. A taxa de metástase é baixa (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002), mas já foi observada em linfonodos e nos pulmões (KUNTZ *et al.*, 1997). Segundo Kuntz *et al* (1997), nenhum dos cães que manifestaram essa neoplasia distalmente aos joelhos ou aos cotovelos desenvolveu metástases.

Quanto ao diagnóstico imuno-histoquímico, as células tumorais apresentam reatividade para marcadores de células de Schwann, como a proteína S-100 e leu-7 (JOHNSON *et al.*, 1991). Na marcação de S-100, esta tende a ser focal e particularmente não muito forte, exceto na variante epitelióide. Entretanto, a marcação forte e difusa em um tumor de células fusiformes com aspectos morfológicos sugestivos de TMBNP, deve levantar a possibilidade de diagnósticos alternativos como melanoma maligno (KING; BUSAM; ROSAI, 1999).

Diferenciam-se da variante benigna por meio de sua população celular mais pleomórfica, de sua elevada atividade mitótica, de seus padrões neuronais menos pronunciados e do seu crescimento infiltrativo (GROSS *et al.*, 2009).

Em comparação com os TMBNP, os fibrossarcomas podem apresentar um número razoável de células gigantes e a distribuição em paliçadas não é observada (GROSS *et al.*, 2009). Além disso, os fibrossarcomas tendem a apresentar marcação

acentuada na coloração de Tricrômio de Masson (TM) e negativa na IHQ para proteína S-100 (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Semelhante aos mixossarcomas, os TMBNP podem conter estroma mixoide. Entretanto, esse estroma mixoide é mais pronunciado nos mixossarcomas, as células tumorais se arranjam de maneira aleatória por toda a matriz extracelular e os padrões neuronais não são observados (GROSS *et al.*, 2009).

Outra variante observada, é a subclassificada na medicina humana como neurofibrossarcoma. Estestumores quase sempre se formam a partir de grandes troncos nervosos do pescoço ou de extremidades (ROSAI, 2004).

Quando é observado o crescimento progressivo e dor em um neurofibroma previamente diagnosticado, suspeita-se de transformação maligna, principalmente em pacientes humanos que apresentam evidências de neurofibromatose (LESLIE; CHEUNG, 1987). Esta doença, uma desordem multissistêmica humana, possui um paralelo em bovinos de abate (MAXIE; YOUSSEF, 2007). Aqui, ela é citada, pois a ocorrência de múltiplos neurofibromas pode estar associada a ela. Esta síndrome mista é composta pelo desenvolvimento de malformações, hamartomas, heterotipias e neoplasia de múltiplos órgãos (SUMMERS; CUMMINGS; DELAHUNTA, 1995). A pele pode ser afetada, porém as lesões costumam estar restritas aos nervos profundos da parede torácica e vísceras (MAXIE; YOUSSEF, 2007).

Além disso, o desenvolvimento de TMBNP na neurofibromatose tem sido associado com deleções no cromossomo 17p e mutações no gene p53 (MENON *et al.*, 1990). O prognóstico nestes casos é tido com baixa taxa de sobrevida (LESLIE; CHEUNG, 1987).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção das amostras

Um estudo retrospectivo foi realizado nos arquivos do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2012. Foram selecionados os casos do arquivo de exames anatomopatológicos de cães que constavam com o diagnóstico de tumor de bainha de nervo periférico benigno ou maligno. Destes, foram revisados o histórico, descrição macroscópica, se presente, e microscópica. Como critério de permanência das amostras na pesquisa, utilizaram-se as características histológicas descritas por Hendrick *et al* (1998). Concomitantemente realizou-se um levantamento do que aconteceu com estes animais após o diagnóstico da neoplasia ser firmado: (a) houve cura do animal até o presente momento, (b) se o animal morreu, quando e se a causa pôde ser relacionada ao tumor, (c) o tumor recidivou, (d) foi feito tratamento adjuvante, (e) não houve retorno do paciente ou (f) foi realizada a eutanásia.

Quanto ao histórico dos caninos, observaram-se a raça, o sexo, a idade (dividida em faixas-etárias de 4-7 anos, 8-11 anos, 12-16 anos e não informada) e a localização da neoplasia. Esta última foi dividida como segue: tumores com localização não especificada em uma região anatômica da pele ou do tecido subcutâneo, foram classificados como pele; o restante foi classificado como membro torácico; membro pélvico; massas envolvendo a cabeça até a última vértebra cervical como cabeça e pescoço; da região cervical à sacral, ventral e dorsal, como tórax e abdômen; e cauda. Dados referentes ao tempo de evolução do tumor e o tamanho na época em que foi feita a exérese, foram analisados, quando disponíveis.

3.2 Histologia

As amostras selecionadas do arquivo eram compostas por material embocado em parafina. Novos cortes histológicos de 3µm de espessura foram realizados e corados pela hematoxilina e eosina (HE) e coloração de tricrômio de Masson (Kit EP-11-2013, Easy Path) para análise microscópica e quantificação de tecido conjuntivo intratumoral, respectivamente. Atribuíram-se cruzes de acordo com a quantidade de tecido conjuntivo pericelular das células tumorais:

- a) +: quando até 30% das células neoplásicas eram envoltas por tecido conjuntivo (coloração azul), caracterizou marcação discreta;
- b) ++: quando 30 a 80% das células neoplásicas eram envoltas por tecido conjuntivo, caracterizou marcação moderada;
- c) +++: quando mais de 80% das células neoplásicas eram envoltas por tecido conjuntivo, caracterizou marcação acentuada.

Utilizou-se ainda a coloração de azul de toluidina, em cortes de tecidos que apresentaram infiltrado inflamatório, com a finalidade de evidenciar os mastócitos nos cortes que apresentaram características semelhantes às descritas como de neurofibromas, na literatura.

3.3 Classificação histológica

As amostras foram classificadas como tumores benignos/malignos de acordo com os fatores sugeridos por Cullen, Page e Misdorp (2002):

- a) Cápsula ou delimitação;
- b) Anisocitose e anisocariose (discreta, moderada ou acentuada);
- c) Índice mitótico;
- d) Celularidade da neoplasia;
- e) Invasão a tecidos adjacentes;
- f) Necrose intratumoral

Foi observada e descrita, também a manifestação das estruturas de corpos de Verocay, padrão Antoni A e Antoni B.

3.4 Imuno-histoquímica

Utilizaram-se anticorpos anti-vimentina, anti-proteína S-100, anti-actina, anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP), anti-von Willebrand (Fator VIII), anti-neurofilamento e anti-Ki-67. Fragmentos das neoplasias embebidos em blocos de parafina foram cortados a 3µm de espessura e aderidos em lâminas positivadas (StarFrost[®] Microscope Slides, Beveled Edge). Os cortes foram desparafinizados em xilol e rehidratados em graduações decrescentes de álcool até água deionizada. Utilizou-se o método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase.

O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos em solução 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.), em metanol, durante 15 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica, assim como os dados referentes a cada anti-corpo utilizado e a diluição realizada estão sumarizados na tabela 2.

Para a diminuição das ligações inespecíficas, as lâminas foram tratadas com leite desnatado (Molico[®]) 5% em água deionizada, durante 20 minutos.

Tabela 2- Anticorpos, recuperação antigênica, diluição e referência comercial utilizadas na imuno-histoquímica de tecidos de cães diagnosticados com tumores de bainha de nervo periférico no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, durante o período de 2000-2012.

Anticorpo	Recuperação antigênica	Diluição	Referência comercial
Policlonal, anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP)	Tris EDTA pH 9,0 panela de pressão 100°C, 10'	1:500	Z0334, Dako, Carpinteria, CA, EUA
Monoclonal, anti-actina humana	Tris EDTA pH 9,0 panela de pressão 120°C, 20'	1:100	M0851, Dako, Carpinteria, CA, EUA
Policlonal, anti-proteína S-100	Tampão citrato pH 6,0 panela de pressão 96°C, 20'	1:200	Z0311, Dako, Carpinteria, CA, EUA
Monoclonal, anti-vimentina, clone V9	Tampão citrato pH 6,0 panela de pressão 96°C, 20'	1:200	18-002, Zymed
Policlonal, anti-fator von Willebrand humano	Tampão citrato pH 6,0 panela de pressão 125°C, 3'	1:800	A0082, Dako, Carpinteria, CA, EUA
Monoclonal, anti-Ki-67 humano, clone MIB-1	Tampão citrato pH 6,0 panela de pressão 125°C, 7'	1:150	M7240, Dako, Carpinteria, CA, EUA
Policlonal, anti-neurofilamento bovino H 200kDa	Tripsina 0,1%, 37°C, 10' e tampão citrato pH 6,0, 2' microondas	1:500	AHP245, AbD Serotec, Oxford, RU

Após a incubação dos cortes no anticorpo primário durante uma hora, a 37°C, os mesmos foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, Dako), 20 minutos cada etapa.

As reações para GFAP, actina, vimentina, Von Willebrand, Ki-67 e neurofilamento foram reveladas com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB, K3468, Dako) por um minuto, contra-corados com hematoxilina de Harris por 40 segundos, desidratadas em soluções crescentes de álcool até o xilol, seguidas de montagem em meio resinoso (Entellan[®], Merck Millipore). Para S-100, utilizou-se o cromógeno AEC (AEC, ready-to-use, K3464, Dako), por cinco minutos, contra-corado com hematoxilina de Mayer por um minuto, seguido de montagem em meio aquoso (Faramount Aqueous Mounting Medium, ready-to-use, S32025, Dako). Como controles positivos utilizaram-se cortes de cérebro sem alterações de cães para GFAP e neurofilamento. Para S-100 e vimentina, utilizou-se um TBNP, para actina carcinoma de próstata canino, para Von

Willebrand hemangiossarcoma e para Ki-67 utilizou-se tonsila sem alteração de cão. Como controle negativo, cortes dos mesmos controles positivos foram utilizados, porém incubados com PBS, substituindo o anticorpo primário.

3.4.1 Classificação imuno-histoquímica

A imunorreatividade foi interpretada, para todos os anticorpos com excessão do Ki-67, da seguinte forma:

- a) +++: marcação positiva em mais de 80% das células tumorais com distribuição difusa, visível em campo de maior aumento (400x), classificada como acentuada;
- b) ++: marcação positiva entre 30-80% das células tumorais com distribuição focal, visível ao aumento de 400x, classificada como moderada;
- c) +: marcação positiva de até 30% das células tumorais, isoladas ou formando grupos, classificada como discreta;
- d) -: marcação negativa.

Quanto a IHQ para Ki-67, foram contados os núcleos de células tumorais marcados em 10 campos de grande aumento (400x), calculada a média e atribuído o índice de proliferação celular.

3.5 Prognóstico

Os fatores utilizados como determinantes no prognóstico foram :

- a) Recidiva local;
- b) Tumor benigno ou maligno;
- c) Sexo;
- d) Anisocitose e anisocariose;
- e) Índice mitótico;
- f) Proliferação celular determinada pela IHQ Ki-67;
- g) Necrose intratumoral;
- h) Invasão a tecidos adjacentes;
- i) Localização tumoral;

Todos estes fatores foram relacionados com o diagnóstico de recidiva do tumor, e analisados estatisticamente, com a metodologia descrita a seguir.

3.6 Análise Estatística

Atribuiu-se porcentagem simples à quantidade de tumores de bainha de nervo periférico diagnosticados, em relação aos tumores de pele, assim como às principais raças diagnosticadas, sexo, idade, localização do tumor e as características histológicas e imuno-histoquímicas.

Quanto ao prognóstico, a distribuição de frequência e as estatísticas descritivas foram realizadas para caracterizar a ocorrência de recidiva dos tumores (software R, package MASS and Epicalc). Algumas variáveis foram categorizadas: Ki-67 (0-|2; 2-|4; 4-|6; 6-|8; 8-|10; 10-|12; ≥ 12 média de núcleos marcados) e idade (4-5; 6-7; 8-9; 10-11; 12-13; 14-16 anos). A análise estatística foi realizada através de um modelo de regressão logística multivariada (software R, package Epicalc). A variável dependente foi definida como a ocorrência ou não de recidiva (sim ou não).

O modelo foi construído começando com uma análise univariada para cada fator de risco ofertado. As variáveis independentes com P-valor < 0.20 foram selecionadas e usadas para a construção do modelo multivariado. As variáveis que passaram no modelo univariado foram testadas para controle de confundidor e multicolinearidade. Subsequentemente, o modelo foi desenvolvido através de um processo de construção manual passo a passo do tipo *forward*.

4 RESULTADOS

4.1 Amostras selecionadas

Entre janeiro de 2000 e dezembro de 2012, foram recebidos 43.908 materiais para exame anatomopatológico de diversas espécies de animais domésticos, exóticos e silvestres. Destes, 13.307 corresponderam a materiais de cães, desses 4.291 (32% dos materiais de cães) corresponderam a alguma alteração cutânea (neoplásica, inflamatória, autoimune, parasitária, fúngica, bacteriana e/ou viral). Diagnosticaram-se 2.984 tumores (69% das alterações de pele) cutâneos em caninos, com um total de 70 tumores de bainha de nervo periférico, correspondendo a 2,34% das neoplasias de pele de cães (Tabela 3).

Tabela 3- Total de exames anatomopatológicos (Ap) realizados em diversas espécies; em cães; de pele de cães e tumores de bainha de nervo periférico (TBNP) de pele de cães diagnosticados por ano pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre 2000-2012.

Ano	Total de Ap	Total Ap cães	Total Ap pele de cão	Total tumores de pele de cães	TBNP
2000	1323	327	69	44	3
2001	1508	303	78	56	0
2002	1402	327	72	52	0
2003	3123	312	95	61	0
2004	2196	531	186	123	0
2005	3680	632	260	170	0
2006	4186	729	238	144	1
2007	4839	918	225	137	1
2008	4265	1172	339	221	3
2009	3851	1450	443	330	8
2010	4009	1909	673	528	11
2011	4963	2377	773	599	25
2012	4563	2320	840	519	18
Total	43908	13307	4291	2984	70

Destes 70, o maior número de diagnósticos de TBNP foi em cães sem raça definida (SRD) (42,85%, 30/70), seguidos pelos animais das raças Pastor Alemão (10%, 7/70) e Poodle (7%, 5/70). As raças Boxer, Teckel, Labrador, Rottweiler e raça não informada (NI) tiveram a mesma representação (4,28%, 3/70 cada), assim como Akita, Cocker Spaniel, Fox Paulistinha e Husky Siberiano (2,85%, 2/70 cada), e Bichon Frise,

Chow Chow, Dogue Alemão, Pinscher e Pit Bull (1,42%, 1/70 cada). Quanto ao sexo, 39 neoplasias foram diagnosticadas em fêmeas (55,71%), 29 em machos (41,42%) e em dois casos (2,85%) não havia informação do sexo no protocolo. Os animais tinham entre 4-7 anos (12,85% -9/70), 8-11 anos (54,28% -38/70), 12-16 anos (22,85% -16/70), e idade não informada (10%, 7/70). Em relação ao tempo de evolução, este dado foi relatado em 26/70 (37,14%) casos, variando de 3 semanas a 3 anos.

Quanto à localização da neoplasia, 2/70 (2,85%) não tinham localização específica e foram classificados como pele. Nos membros torácicos, foram observados 28/70 (40%), nos membros pélvicos 20/70 (28,57%), além de 5/70 (7,14%) na cabeça e pescoço, 14/70 (20%) tórax e abdômen e 1/70 (1,42%) na cauda.

Foram pesquisados ainda, junto aos médicos veterinários clínicos, o que aconteceu com os cães após a excisão do tumor. Entre os casos, houve recidiva em 17 (24%), deste, sete eram tumores benignos (14%) e 10 tumores malignos (47%). Nove caninos morreram, desses dois foram eutanasiados o primeiro, 24 meses após o primeiro diagnóstico de TBNP, por apresentar metástase pulmonar e massa hepática, e o segundo, um mês após a retirada do tumor, devido à dor crônica. Os outros seis cães que morreram (animais 8, 18, 20, 21, 52 e 56) quatro possuíam diagnóstico de TBBNP. A relação da morte destes animais não pôde ser confirmada com as lesões aqui estudadas. Já o animal de número 61, foi encaminhado ao SPV-UFRGS para realização de necropsia, com diagnóstico de tumor maligno de bainha de nervo com metástase pulmonar (Tabela 4).

Outros 37 animais que puderam ser acompanhados, não apresentaram recidivas até o momento, e os médicos veterinários responsáveis por estes casos relatam que os retornos ocorrem para consultas de rotina, como vacinações ou outras enfermidades.

Tabela 4-Dados referentes aos cães diagnosticados com tumor de bainha de nervo periférico na pele e tecido subcutâneo, no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2000-2012.

	Raça	Sexo	Idade (anos)	Localização	Recidiva	Observações
TBBNP						
1	SRD	M	10	membro torácico	NI	
2	SRD	F	8	membro torácico	NI	
3	SRD	F	NI	tórax e abdômen	NI	
4	Chowchow	M	8	membro torácico	NI	
5	Rottweiler	M	7	tórax e abdômen	NI	
6	SRD	F	10	membro torácico	NI	
7	Pastor Alemão	M	10	tórax e abdômen	Não	
8	SRD	F	15	membro pélvico	Sim	Óbito 12 meses após diagnóstico
9	SRD	F	10	membro torácico	Não	
10	Fox terrier	F	7	membro pélvico	Não	
11	SRD	F	10	tórax e abdômen	Não	
12	Akita	M	NI	cauda	NI	
13	SRD	F	11	membro torácico	Não	
14	Akita	NI	9	cabeça e pescoço	NI	
15	SRD	F	12	tórax e abdômen	Sim	Eutanásia 24 meses após diagnóstico
16	Rottweiler	F	10	membro torácico	Não	
17	SRD	F	8	membro torácico	Não	
18	Husky	M	13	cabeça e pescoço	Sim	Óbito 24 meses após diagnóstico
19	Teckel	F	10	cabeça e pescoço	Não	Eutanásia 30 dias após, pela dor crônica
20	SRD	F	13	tórax e abdômen	Sim	Óbito 2 meses após o diagnóstico
21	Pastor Alemão	F	10	membro torácico	Não	Óbito 6 meses após o diagnóstico
22	SRD	F	15	tórax e abdômen	Não	

	Raça	Sexo	Idade (anos)	Localização	Recidiva	Observações
23	SRD	M	5	tórax e abdômen	Não	
24	Bichon Frisé	F	NI	membro torácico	Não	
25	SRD	F	11	membro pélvico	Não	
26	SRD	F	10	membro torácico	Sim	
27	Labrador	F	4	membro pélvico	Não	
28	Poodle	M	10	membro pélvico	Não	
29	Cocker	F	10	membro torácico	Não	
30	Boxer	F	11	membro pélvico	Não	
31	SRD	F	11	membro torácico	Sim	Amputação do dígito
32	SRD	F	8	pele	Não	
33	SRD	F	10	membro pélvico	Não	
34	NI	F	10	membro torácico	Não	
35	Pit Bull	M	7	cabeça e pescoço	Não	
36	Boxer	M	10	membro torácico	NI	
37	Poodle	M	8	membro torácico	NI	
38	NI	M	NI	membro pélvico	NI	
39	SRD	M	11	membro posterior	Não	
40	Pastor Alemão	M	8	tórax e abdômen	NI	
41	Labrador	F	8	membro pélvico	Não	
42	SRD	M	13	membro torácico	Não	
43	Dachshund	F	10	tórax abdômen	Não	
44	NI	F	NI	membro anterior	Não	
45	Pastor Alemão	M	8	membro pélvico	Não	
46	SRD	F	NI	membro pélvico	Não	
47	SRD	F	11	membro torácico	Sim	
48	Cocker	F	12	membro pélvico	Não	

	Raça	Sexo	Idade (anos)	Localização	Recidiva	Observações
49	SRD	F	6	membro torácico	Não	
TMBNP						
50	SRD	F	12	pele	NI	
51	Pastor Alemão	M	11	membro torácico	NI	
52	Pinscher	F	12	membro torácico	Sim	Óbito por causa indeterminada
53	SRD	F	11	membro pélvico	Não	
54	Pastor Alemão	M	5	membro pélvico	Não	
55	Dogue Alemão	F	4	cabeça e pescoço	Sim	Recidiva no focinho
56	Husky	M	15	tórax e abdômen	Sim	Óbito 3 anos após primeiro diagnóstico
57	Rottweiler	M	11	membro torácico	Não	
58	SRD	M	9	tórax e abdômen	Sim	
59	SRD	M	11	membro torácico	Sim	
60	SRD	M	11	membro torácico	Não	
61	Poodle	M	9	membro torácico	Sim	Óbito com metástase pulmonar 2 meses após diagnóstico
62	Labrador	M	9	tórax e abdômen	Sim	
63	Boxer	NI	NI	membro posterior	Sim	
64	SRD	F	15	membro torácico	Não	
65	Poodle	M	14	membro torácico	NI	
66	SRD	M	16	membro pélvico	Sim	
67	Fox terrier	M	14	membro pélvico	Não	
68	Teckel	M	14	membro pélvico	NI	
69	Poodle	F	15	tórax e abdômen	Sim	
70	Pastor Alemão	F	6	membro anterior	Não	

TBBNP= tumor benigno de bainha de nervo periférico; TMBNP= tumor maligno de bainha de nervo periférico; SRD= sem raça definida; F= fêmea; M= macho; NI= não informado.

4.2 Classificação histológica

4.2.1 Tumores benignos da bainha de nervo periférico

Microscopicamente, 49/70 (70%) dos tumores analisados apresentaram características histológicas benignas, com predomínio de dois padrões. O primeiro (61,42% - 43/49), diz respeito aos tumores localizados principalmente na derme e no tecido subcutâneo. Quando possível observar, todos apresentaram delimitação e uma delicada cápsula de tecido conjuntivo, além de moderada celularidade (FIGURAS 2 e 3).

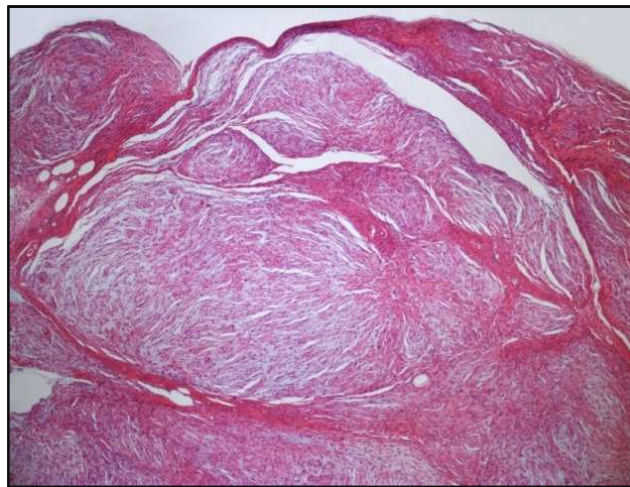


Figura 2- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Moderada celularidade tumoral, Obj. 4.HE.

Eram formados predominantemente, se não exclusivamente, fusiformes a alongadas formando feixes paralelos em diversas direções, por vezes redemoinhos (FIGURAS 4 e 5), separadas por um delicado estroma fibroso.

As áreas denominadas de Antoni A foram observadas em 22/43 (51,16%) TBBNP, e em sete desses havia corpos de Verocay, caracterizado por feixes de células fusiformes que se entrecruzam com material acelular fibrilar eosinofílico central (FIGURA 6). Padrão Antoni A associada a áreas com células distribuídas frouxamente numa matriz mucinosa determinadas como padrão Antoni B, ocorreu em 17/43 (39,53%) e exclusivamente padrão Antoni B somente em 4/43 (9,3%) das amostras. As células que formavam as áreas com padrão Antoni A, possuíam formato fusiforme a alongado, limites celulares moderadamente distintos. O citoplasma era abundante, palidamente eosinofílico de aspecto finamente fibrilar. O núcleo, único, variava de fusiforme a oval, localizados centralmente e paracentralmente na célula, que possuía

cromatina finamente pontilhada. O nucléolo era único e basofílico. Possuíam em sua maioria moderada anisocitose e anisocariose. Já as células que compoem o padrão Antoni B eram caracterizadas por células arredondadas, com contorno estrelado, espaços intercelulares amplos, arranjadas frouxamente em meio a uma matriz mixoide (FIGURA 7). O citoplasma era escasso, eosinofílico e fibrilar. O núcleo era arredondado a oval, formados por uma cromatina grosseiramente pontilhada e nucléolo indistinto. A quantidade de colágeno pericelular foi menor no padrão Antoni B do que no Antoni A. As figuras de mitose observadas por campo de grande aumento (400x) variaram de menos de uma (18/43) até uma (25/43).

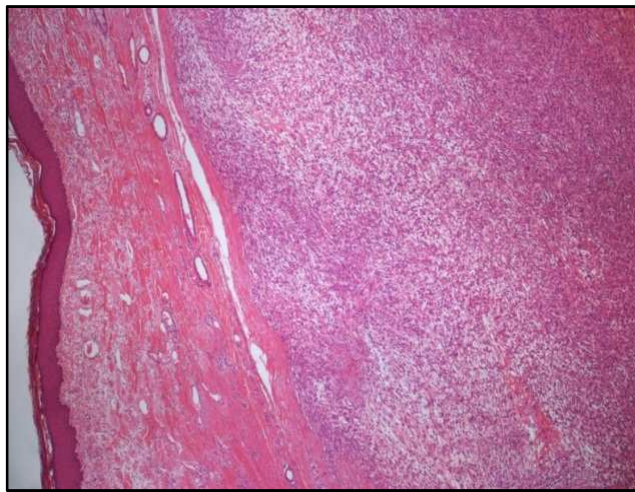


Figura 3- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Massa bem delimitada na derme, Obj. 4. HE.

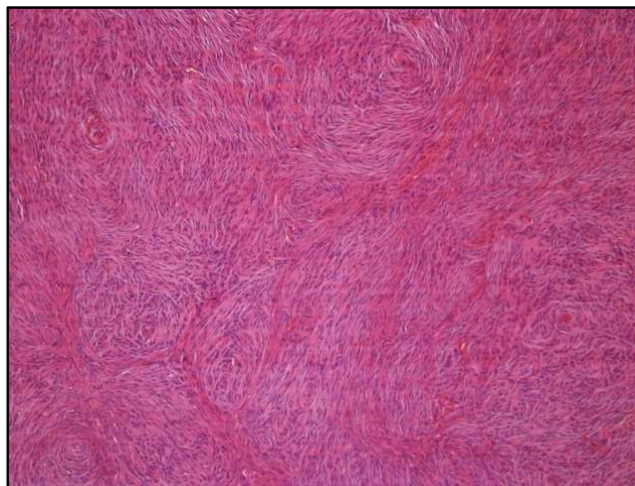


Figura 4- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Células fusiformes e alongadas organizadas em feixes – Padrão Antoni A. Obj.10, HE.

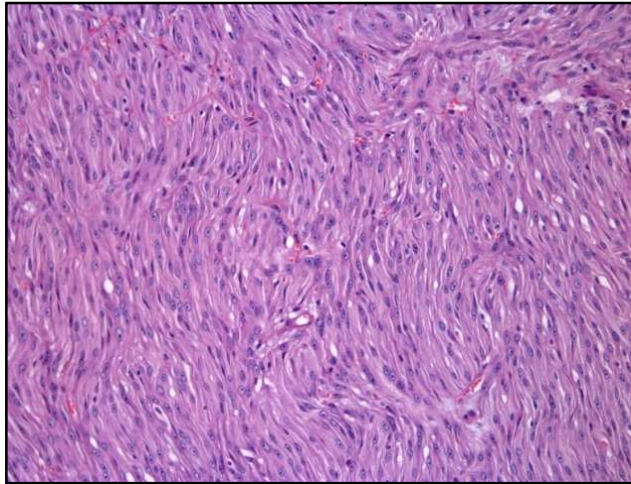


Figura 5- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni A. Células fusiformes e alongadas, organizadas em feixes paralelos. Obj.20. HE.

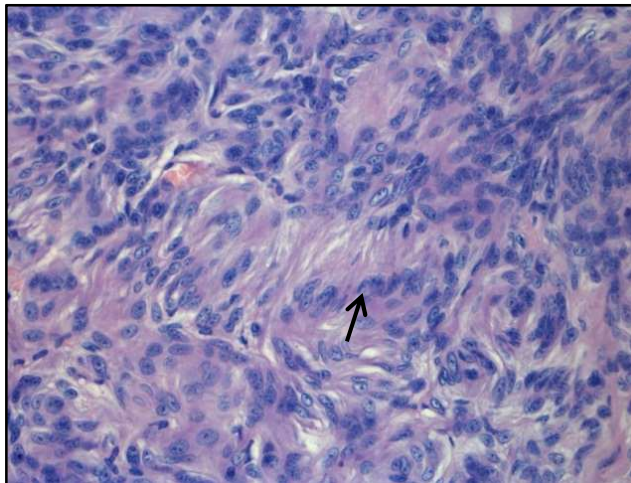


Figura 6- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Feixes de células fusiformes que se entrecruzam com material acelular fibrilar central - Corpo de Verocay (seta). Obj. 40. HE.

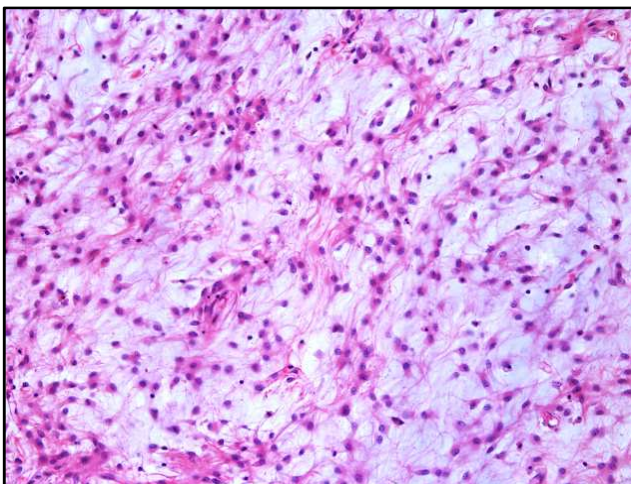


Figura 7- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni B. Células arredondadas, com contorno estrelado, e espaços intercelulares amplos, arranjadas frouxamente em uma matriz mucinosa. Obj. 20x. HE.

Necrose intratumoral foi observada em 15/43, sem invasão aos tecidos adjacentes. Infiltrado perivascular moderado predominantemente linfocitário foi identificado em 11/43

Na coloração de TM evidenciou-se tecido conjuntivo perivascular e pericelular em diferentes proporções (FIGURAS 8 e 9): 24/43 possuíam discreta quantidade de tecido conjuntivo pericelular (FIGURA 10, e em 19/43 moderada quantidade (FIGURA 11 e12) De maneira geral em áreas com padrão Antoni B, houve pequena quantidade de tecido conjuntivo (FIGURA 13). Além disso, observou-se depósito de material fibroso, ao redor de vasos no interior das lesões (9/43).

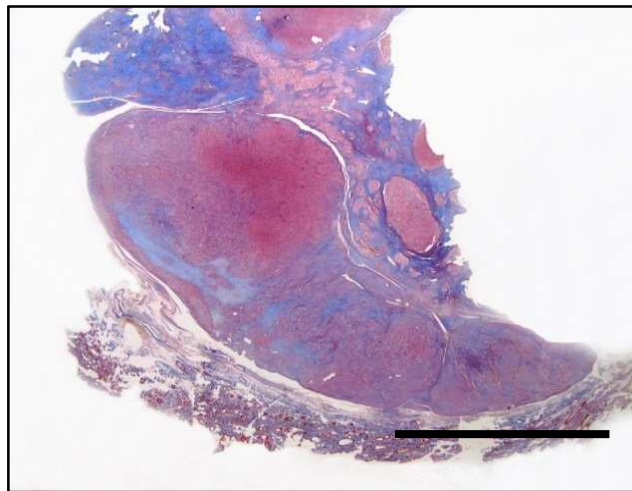


Figura 8- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imagem submacroscópica demonstrando variações na quantidade de tecido conjuntivo (azul) intra tumoral, Barra 1cm. Tricrômio de Masson (TM).

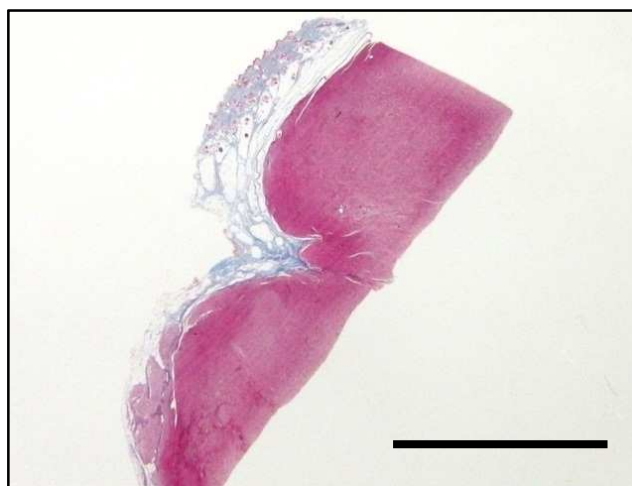


Figura 9- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imagem submacroscópica demonstrando variações na quantidade de tecido conjuntivo intra tumoral, Barra 1cm. TM.

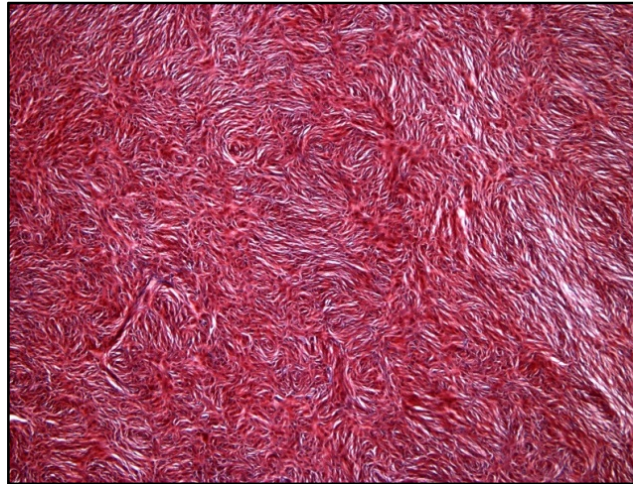


Figura 10- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Discreta quantidade de tecido fibrovascular circundando células tumorais, Obj. 10. TM.

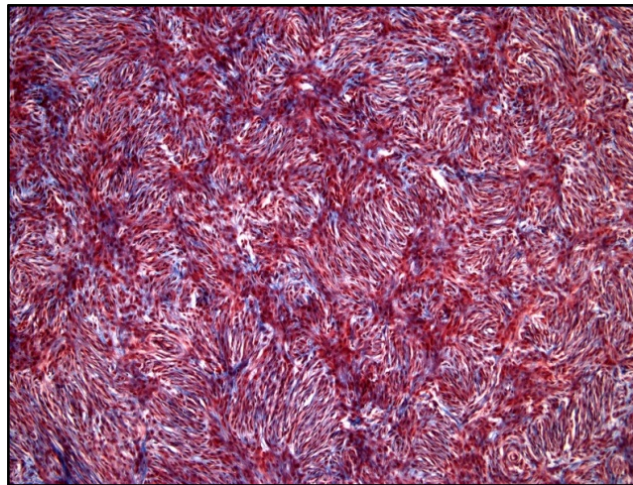


Figura 11- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni A. Moderada quantidade de tecido fibrovascular circundando células tumorais (azul), Obj. 10. TM.

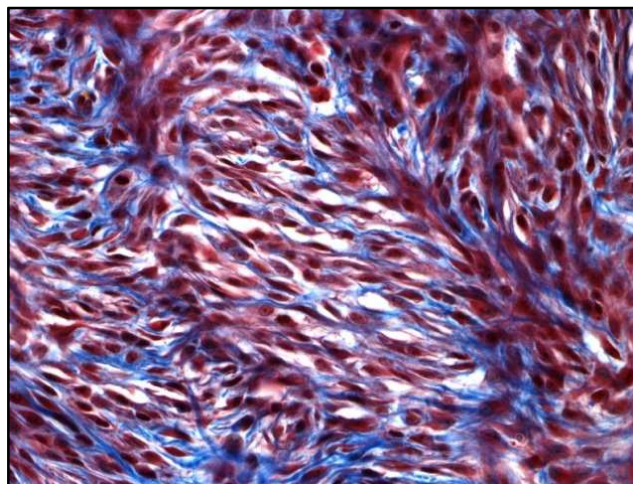


Figura 12- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Moderada quantidade de tecido fibrovascular pericelular tumoral (azul), Obj. 40. TM.

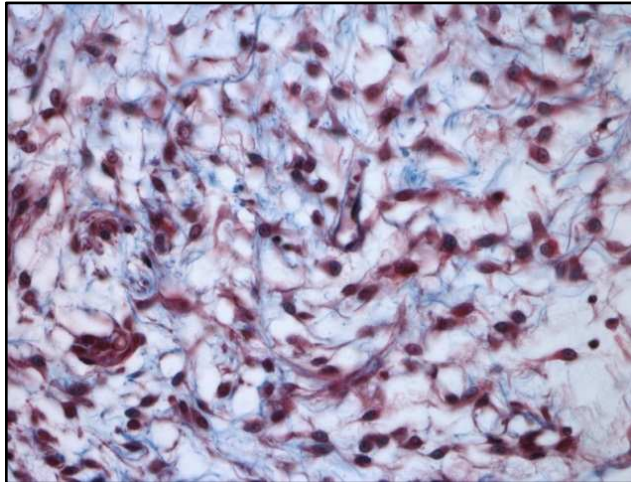


Figura 13- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Padrão Antoni B com pequena quantidade de tecido fibrovascular pericelular, Obj. 40. TM.

Outro padrão histológico observado nos TBBNP, correspondeu a 6/49 (12,24%) dos tumores. As lesões não apresentavam delimitação aparente, proliferando-se logo abaixo do epitélio e possuíam moderada celularidade (FIGURA 14). As células eram fusiformes, formavam feixes em diversas direções e circundadas por abundante quantidade de tecido fibrovascular (FIGURA 15), evidenciado na coloração de TM (FIGURAS 16, 17 e 18).

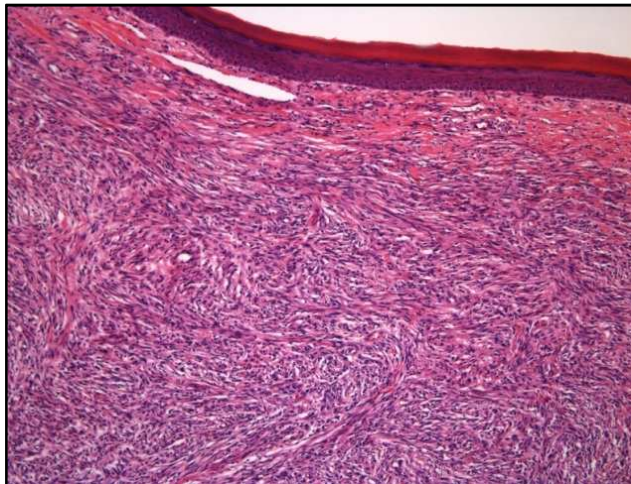


Figura 14- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Lesão proliferativa não delimitada na derme, moderada celularidade. Obj. 10. HE.

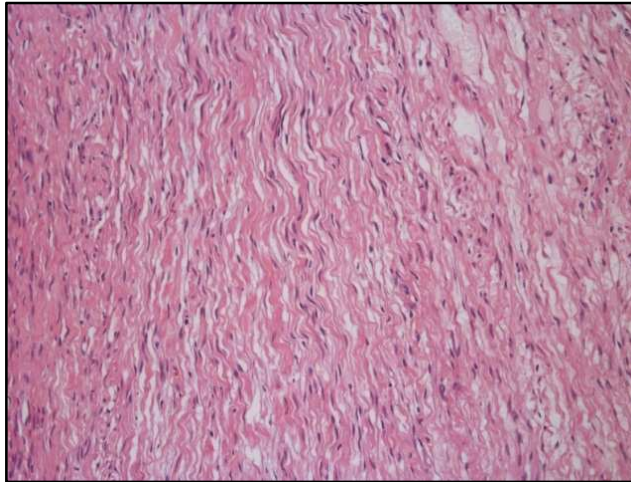


Figura 15- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Tumor de células fusiformes, formando feixes e circundadas por abundante quantidade de tecido fibrovascular. Obj. 20. HE.

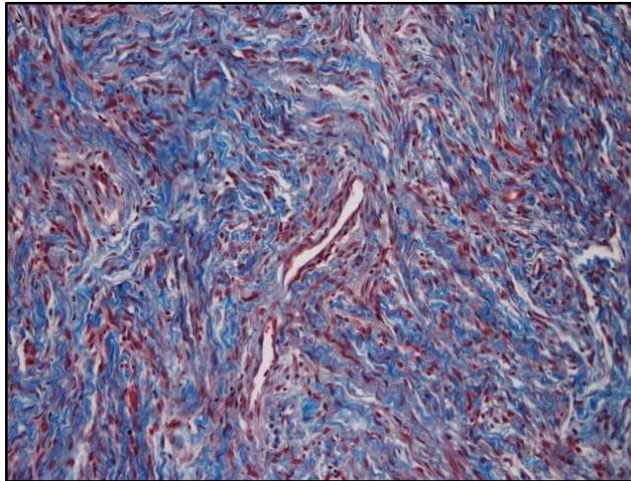


Figura 16- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Tumor de células fusiformes, formando feixes em diversas direções e circundadas por abundante quantidade de tecido fibrovascular. Obj. 20. TM.

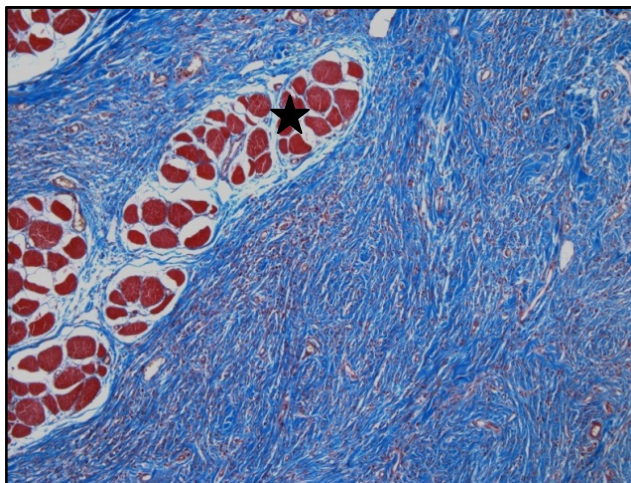


Figura 17- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Tecido muscular normal (estrela) envolto por células neoplásicas com grande quantidade de tecido conjuntivo. Obj.10. TM.

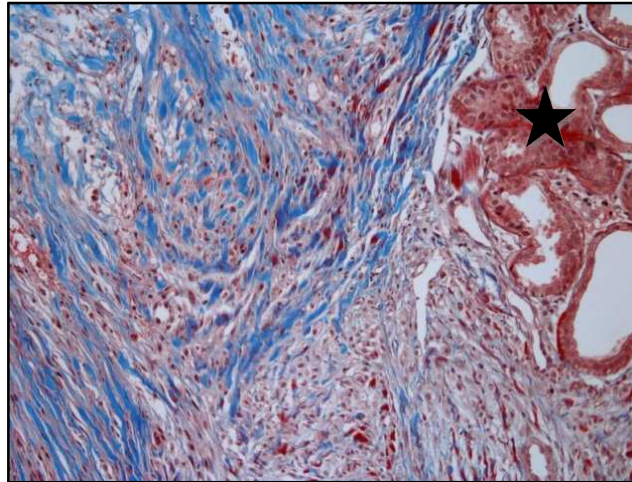


Figura 18- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Glândulas sudoríparas (estrela) circundadas por células neoplásicas e moderada quantidade de tecido conjuntivo. Obj. 20x. TM.

As células eram fusiformes, alongadas e serpiginosas, com citoplasma escasso, palidamente eosinofílico e bordos indistintos. O núcleo acompanha o formato da célula, e é hipercromático. Em dois dos tumores foi possível observar padrão Antoni A que ocupa menos de 30% das lesões (FIGURAS 19 e 20). As figuras de mitoses foram escassas a raras. Em todas estas lesões, observou-se infiltrado inflamatório mononuclear, com mastócitos (média de três por campo de maior aumento) evidenciados na coloração de azul de toluidina

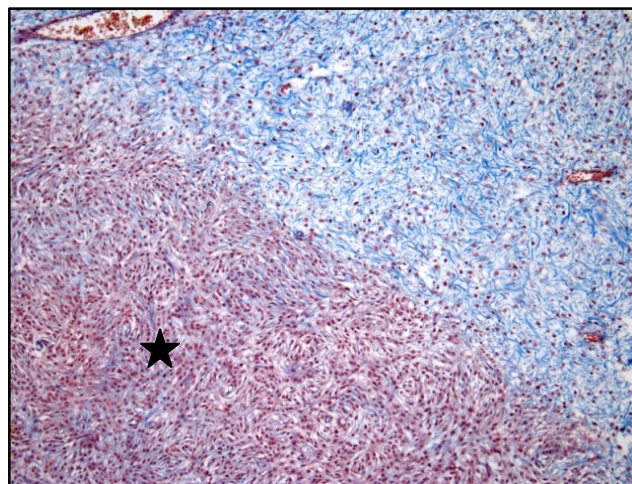


Figura 19- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área de transição entre padrão Antoni A de células tumorais (estrela), e área de células tumorais envoltas por abundante quantidade de tecido conjuntivo (azul). Obj. 10. TM.

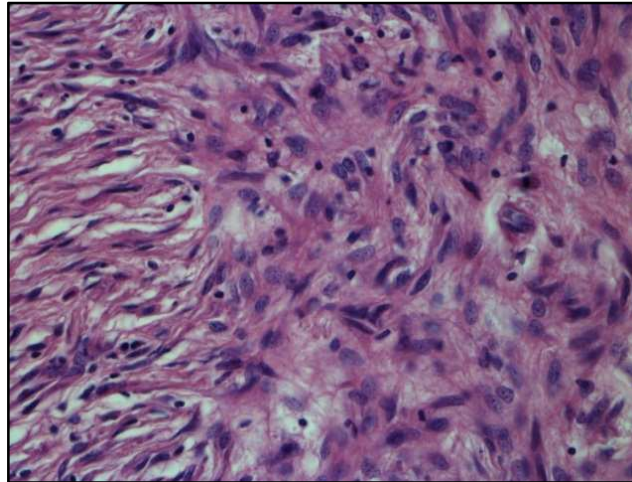


Figura 20- Tumor benigno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área de padrão Antoni A, formado por células fusiformes dispostas em paliçada e células alongadas e arredondadas em diversas direções. Obj. 40. HE.

4.2.2 Tumores malignos de bainha de nervo periférico

Dos 70 tumores analisados, 21 (30%) apresentavam características histológicas compatíveis com TMBNP. Estes, localizavam-se no tecido subcutâneo, com uma das amostras possuindo cápsula visível no corte e o restante eram não delimitados, invadindo os tecidos adjacentes que incluem a derme superficial e a profunda, pânículo adiposo e tecido muscular (FIGURA 21). Invariavelmente, os tumores apresentavam alta celularidade (FIGURA 22), e eram compostos por células organizadas ocasionalmente em feixes, redemoinhos e/ou formando lóbulos de células bem agrupadas, envoltas, quando possível observar, por um fino estroma fibrovascular. O padrão de arranjo Antoni A ocorreu isolado em 10/21 (47,61%) lesões, associada ao padrão Antoni B em 7/21 (33,33%), e nenhum desses arranjos em 4/21 (19,04%). Entre as áreas compadrão Antoni A, em quatro casos identificaram-se corpos de Verocay. As células neoplásicas eram fusiformes a redondo, muitas vezes com os limites indistintos. O citoplasma era eosinofílico, e variava de homogêneo a granular. O núcleo variou de fusiforme a redondo, muitas vezes excêntrico, com cromatina grosseiramente pontilhada e nucléolo único e evidente, muitas vezes magenta (FIGURA 23). Em dois TMBNP observaram-se células multinucleadas (FIGURA 24). As células neoplásicas exibiram acentuada (12/21) a moderada (9/21) anisocitose e anisocariose. O número de mitoses variou de uma a três por campo de grande aumento (400x). Outras alterações histológicas observadas foram: necrose intra tumoral em 13/21, focos de hemorragia em

3/21, ulceração da epiderme em 2/21, e depósito de material fibrótico ao redor de vasos do interior das massas em 6/21.

A coloração de TM evidenciou discretamente o fino estroma fibrovascular pericelular em 15/21 (71,42%) (FIGURA 25) que apresentam discreto tecido pericelular positivo, em 5/21 (23,8%) com moderado e 1/21 (4,76%) com acentuado tecido conjuntivo pericelular.

Na Tabela 4 estão resumidas as informações de cada animal diagnosticado com TMBNP.

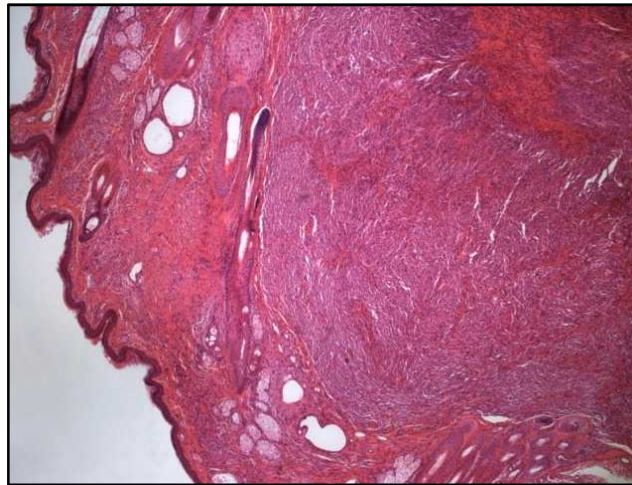


Figura 21- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Invasão de células neoplásicas na derme, ao redor de anexos epiteliais. Obj. 4. HE.

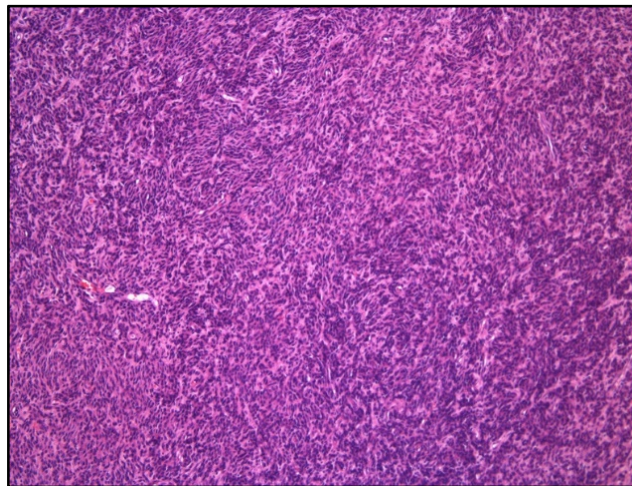


Figura 22- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Alta celularidade tumoral. Obj. 10. HE.

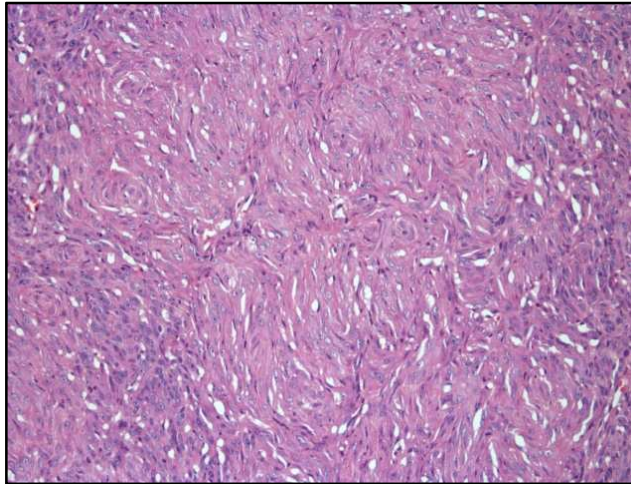


Figura 23- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área com células tumorais, dispostas em paliçada, apresentando citoplasma eosinofílico pálido e bordos indistintos. Obj. 20. HE.

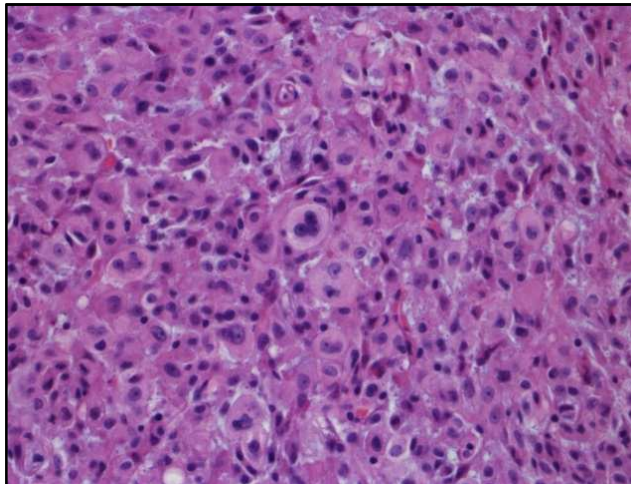


Figura 24- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Área tumoral de células arredondadas, algumas multinucleadas. Obj. 40. HE.

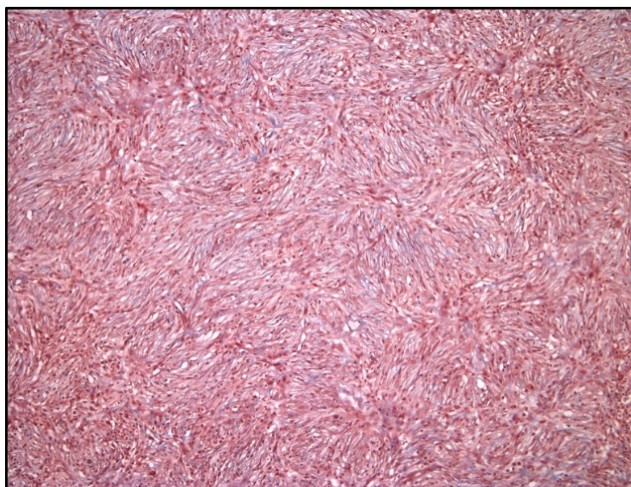


Figura 25- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Células tumorais dispostas em paliçada contendo pouco tecido fibrovascular pericelular. Obj. 20. TM.

Tabela 5- Aspectos histológicos dos tumores de bainha de nervo periférico na pele e tecido subcutâneo de cães, diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2000-2012.

	Antoni A	Antoni B	Corpos de Verocay	Pleomorfismo celular	Mitoses	Invasão a tecidos adjacentes	Necrose	Tricrômio de Masson
TBBNP								
1	X	-	-	++	<1	Não	Sim	++
2	X	-	-	++	<1	NP	Não	+
3	X	-	-	++	<1	NP	Sim	+
4	X	X	X	++	1	NP	Não	++
5	X	-	-	++	1	NP	Não	+++
6	X	X	X	++	<1	Não	Sim	++
7	X	-	X	++	<1	Não	Sim	++
8	X	-	X	++	1	NP	Não	+
9	X	-	-	++	1	NP	Não	+
10	-	-	-	++	1	Não	Não	+
11	X	X	-	++	1	Não	Não	+
12	X	-	-	++	1	NP	Sim	+
13	-	X	-	++	<1	NP	Sim	+
14	X	-	-	++	>2	NP	Não	+
15	X	-	-	++	<1	Não	Não	++
16	X	-	-	++	>2	Não	Sim	+
17	X	-	X	+++	<1	Não	Não	+
18	-	-	-	++	>2	Sim	Não	++
19	X	-	-	++	1	Não	Não	+
20	X	X	X	++	1	Não	Não	++
21	-	X	-	+	<1	Não	Sim	++
22	X	-	-	++	<1	Não	Sim	++

	Antoni A	Antoni B	Corpos de Verocay	Pleomorfismo celular	Mitoses	Invasão a tecidos adjacentes	Necrose	Tricrômio de Masson
23	-	-	-	++	<1	Não	Sim	+++
24	-	-	-	++	<1	NP	Não	+
25	X	X	-	++	1	NP	Sim	+
26	-	-	-	+	<1	NP	Não	++
27	X	X	-	+	<1	NP	Não	+
28	X	-	-	++	1	Não	Sim	++
29	X	X	-	++	<1	Não	Sim	++
30	X	X	-	++	<1	NP	Não	++
31	X	-	-	++	1	NP	Não	+
32	X	-	-	++	>2	Não	Não	+
33	X	-	-	++	1	Não	Não	+
34	X	-	-	++	1	NP	Sim	+
35	-	-	-	++	1	NP	Sim	+++
36	X	X	-	++	<1	NP	Não	++
37	X	-	-	++	1	Não	Não	++
38	X	-	-	++	1	Não	Sim	+
39	X	X	-	+	<1	Não	Não	++
40	X	X	-	++	1	Sim	Não	++
41	X	-	-	++	1	Não	Não	+
42	X	X	-	++	1	Não	Não	++
43	X	X	-	++	<1	Não	Sim	+
44	X	X	X	++	<1	Não	Sim	++
45	X	X	-	++	1	NP	Não	+
46	X	X	-	++	<1	Não	Não	++
47	X	-	-	++	<1	Não	Não	+
48	X	-	-	++	1	Não	Não	+

	Antoni A	Antoni B	Corpos de Verocay	Pleomorfismo celular	Mitoses	Invasão a tecidos adjacentes	Necrose	Tricrômio de Masson
49	X	X	-	++	<1	Não	Sim	++
TMBNP								
50	X	-	-	++	1	NP	Sim	+
51	X	X	X	+++	1	Não	Não	+
52	X	-	-	++	1	NP	Sim	+
53	-	X	-	++	1	Sim	Não	+
54	X	-	-	+++	>2	Não	Sim	++
55	X	X	X	+++	1	Sim	Não	+
56	X	X	-	+++	1	NP	Sim	++
57	-	X	-	+++	>2	Sim	Sim	+
58	X	-	-	++	>2	Não	Não	+
59	X	-	-	++	>2	Não	Sim	+++
60	X	X	-	++	1	Sim	Sim	++
61	-	-	-	+++	1	Não	Não	+
62	-	-	-	+++	>2	NP	Não	+
63	X	X	-	+++	1	Sim	Não	+
64	X	-	-	+++	1	Não	Não	+
65	-	-	-	+++	1	NP	Sim	++
66	X	X	-	+++	>2	NP	Sim	++
67	X	-	-	+++	>2	NP	Não	+
68	-	-	-	+++	1	NP	Sim	+
69	X	X	X	+++	<1	Sim	Sim	+
70	X	X	X	++	1	Sim	Sim	+

+ = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; TM= Tricrômio de Masson; TBBNP= tumor benigno de bainha de nervo periférico; TMBNP= tumor maligno de bainha de nervo periférico; TM = Tricrômio de Masson; X= presença; - = ausência; NP= não foi possível determinar.

Dos animais que apresentaram recidiva do tumor, amostras da lesão de um destes animais (cão 47) receberam o mesmo tratamento que as demais neste trabalho. Na histologia deste, observou-se um pleomorfismo celular mais acentuado do que o observado na primeira biópsia (FIGURA 26). Além disso, observaram-se extensas áreas de necrose intratumoral.

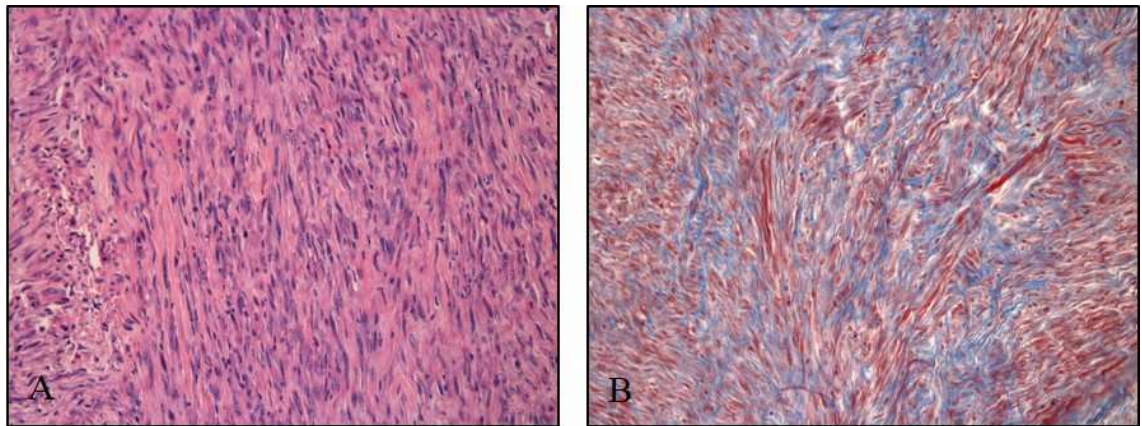


Figura 26- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, tecido subcutâneo, membro torácico, cão 47. A: proliferação de células neoplásicas fusiformes e alongadas, dispostas em diversas direções, circundadas por moderada quantidade de tecido conjuntivo. Obj. 20. HE. B: evidenciação das fibras de tecido conjuntivo (azul) pericelulares das células neoplásicas (vermelho). Obj. 20. TM.

Ainda entre os diagnósticos de tumores malignos, um dos animais que foi diagnosticado com TMBNP morreu e foi encaminhado para necropsia (número 61 da Tabela 4). Na análise histológica dos órgãos, observou-se metástase pulmonar. A lesão, multifocal, consistia em áreas bem delimitadas, apresentando moderado pleomorfismo celular (FIGURA 27).

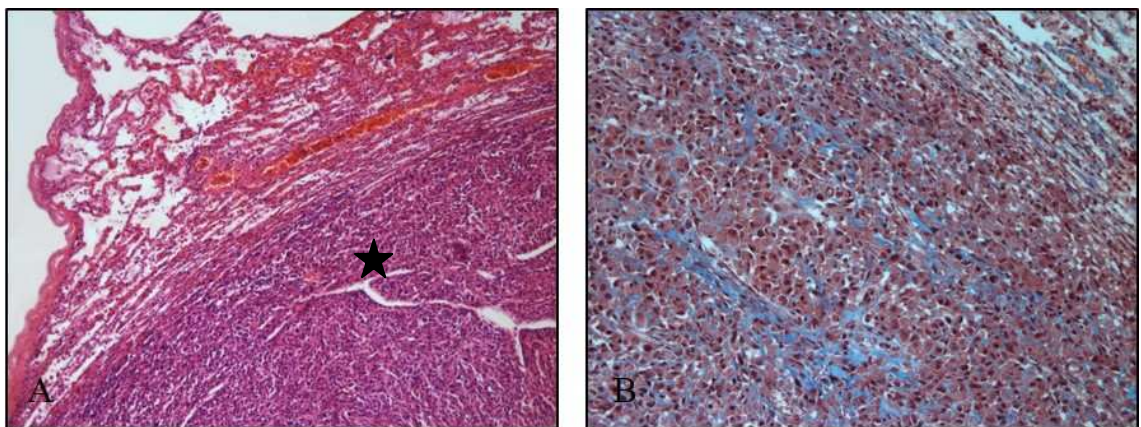


Figura 27- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pulmão, cão. A: área de metástase de tumor de células alongadas a arredondadas (estrela). Obj. 10. HE. B: área de metástase de tumor de células alongadas a arredondadas com moderada quantidade de tecido com conjuntivo pericelular (em azul). Obj. 20. TM

4.3 Imuno-histoquímica

A marcação na IHQ anti-vimentina ocorreu em todas as amostras, exceto na do cão 61. Essa marcação foi observada no citoplasma e em 43/70 (61,43%) das amostras ela foi acentuada, em 20/70 (28,57%) moderada, em 6/70 (8,57%) discreta e uma negativa (1,43%) (FIGURAS 28 a 31).

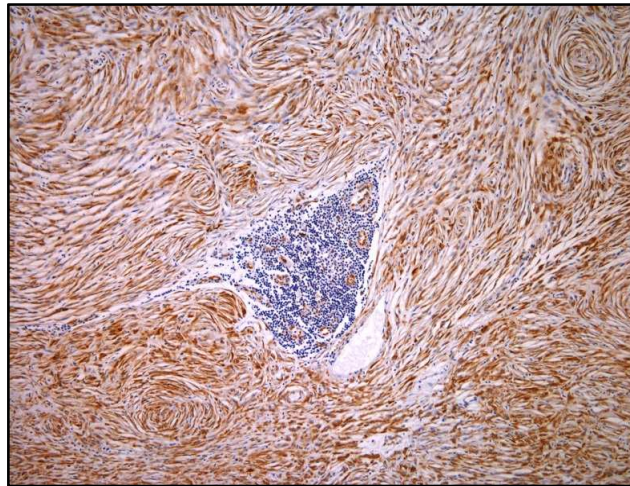


Figura 28- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcação citoplasmática difusa e acentuada de células neoplásicas fusiformes, dispostas em paliçada e por vezes redemoinhos, no centro, infiltrado inflamatório de linfócitos, Obj. 10. IHQ anti-Vimentina.

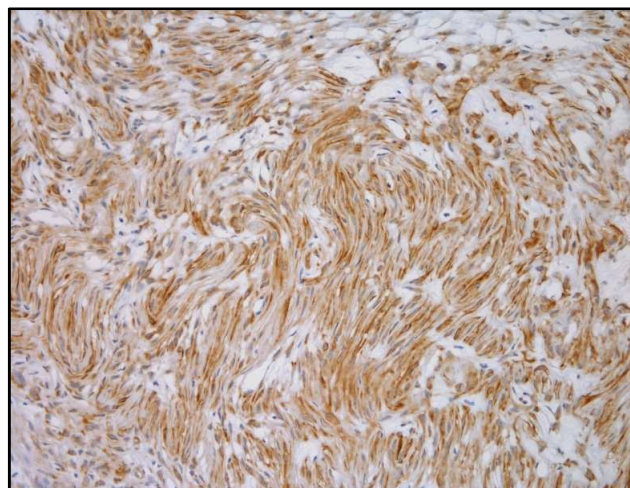


Figura 29- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcação citoplasmática difusa e moderada de células neoplásicas fusiformes dispostas em paliçada, Obj. 20. IHQ anti-Vimentina.

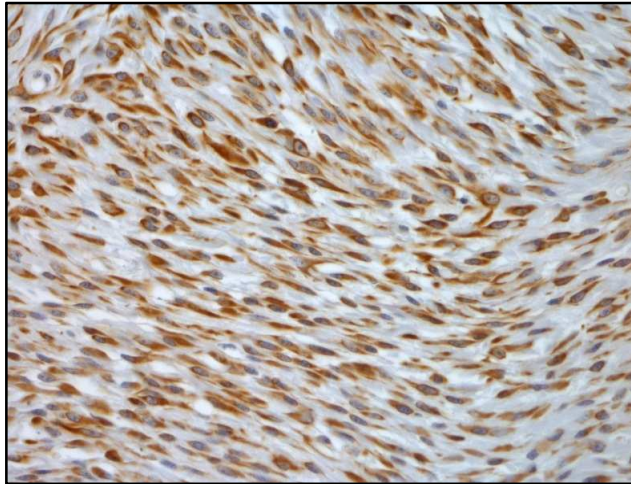


Figura 30- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcagem citoplasmática difusa e moderada de células neoplásicas fusiformes e alongadas, Obj. 40. IHQ anti-Vimentina.

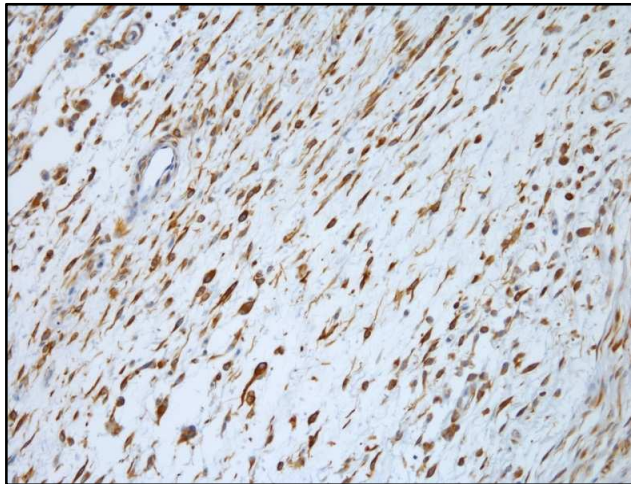


Figura 31- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Imunomarcagem citoplasmática de células neoplásicas dispostas em paralelo em matriz mucinosa (padrão Antoni B), Obj. 20. IHQ anti-Vimentina.

Quanto a IHQ para a proteína S-100, todas as amostras foram positivas, e a marcação ocorreu no citoplasma e núcleo, de maneira levemente granular, distribuída multifocalmente em células fusiformes e alongadas. A intensidade de marcação variou de acentuada (16/70 - 22,85%), moderada (41/70 - 58,58%) a discreta (13/70 - 18,57%) (FIGURAS 32 a 35).

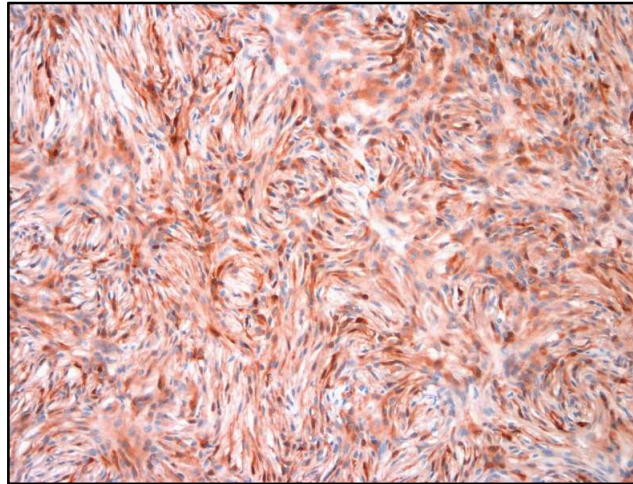


Figura 32- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação difusa e acentuada, citoplasmática e por vezes nuclear de células neoplásicas fusiformes. Obj. 10. IHQ anti-S-100.

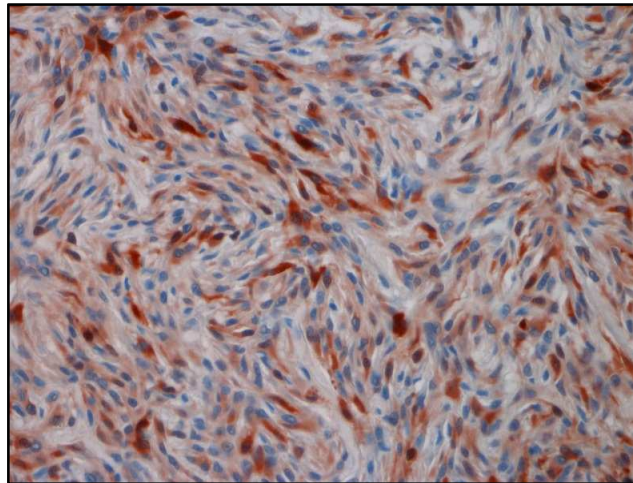


Figura 33- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação moderada, citoplasmática e por vezes nuclear de células neoplásicas fusiformes e alongadas. Obj. 20. IHQ anti-S-100.

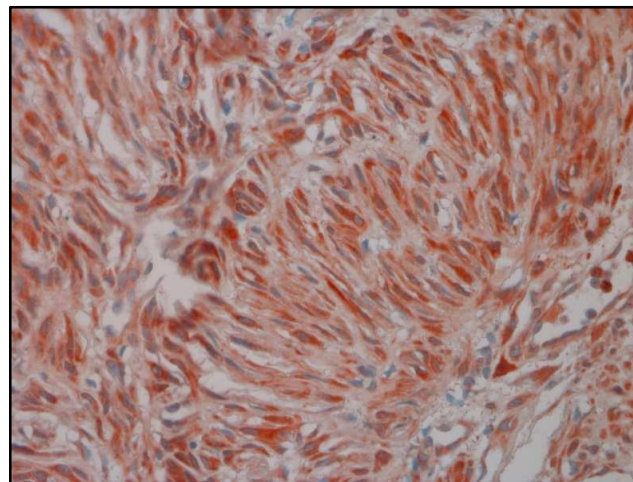


Figura 34- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação difusa e acentuada, citoplasmática e nuclear de células fusiformes e alongadas dispostas em paliçada e feixes. Obj. 40. IHQ anti-S-100.

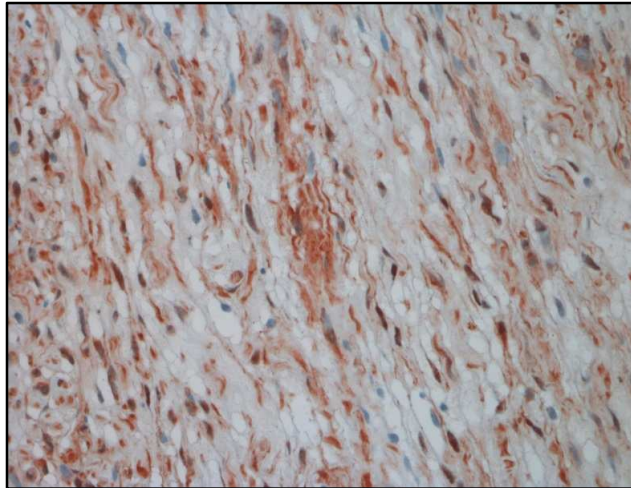


Figura 35- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação moderada a discreta, citoplasmática de células fusiformes e serpiginosas, em fundo de tecido conjuntivo não reativo à imuno-histoquímica utilizada. Obj. 20. IHQ anti-S-100.

Nas imuno-histoquímicas para GFAP, 26/70 (37,14%) foram positivas. A marcação ocorre intensamente, porém em raras células fusiformes e alongadas, de núcleo indistinto no interior da neoplasia. Quantitativamente, a marcação foi acentuada em 2/70 (2,85%) 8/70 (11,42%) com marcação moderada, 16/70 (22,85%) com marcação discreta e 44/70 (62,85%) negativas (FIGURAS 36 e 37). Dos tumores que foram positivo para IHQ para GFAP, seis ocorreram em tumores malignos e 20 em benignos.

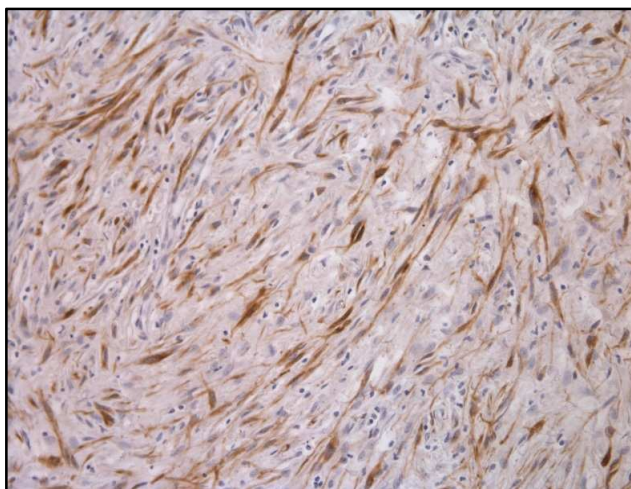


Figura 36- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação moderada, citoplasmática de células fusiformes e alongadas. Obj. 20. IHQ anti-GFAP.

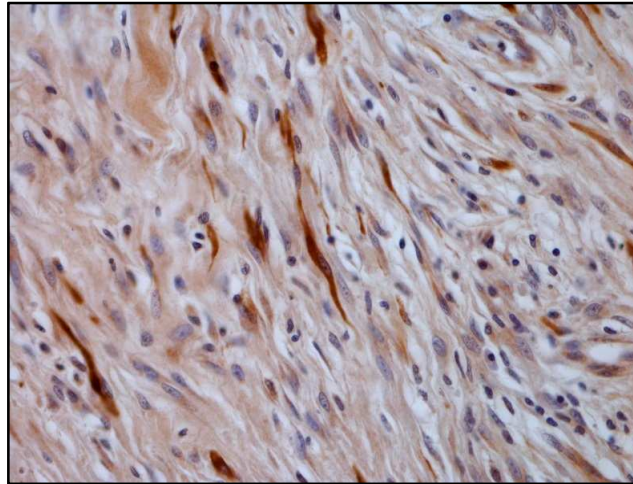


Figura 37- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação acentuada citoplasmática de múltiplas células fusiformes. Obj. 40. IHQ anti-GFAP.

Nenhuma amostra foi positiva para actina, e somente em um tumor houve marcação para Fator Von Willebrand (marcação focal em células fusiformes) (FIGURA 38).

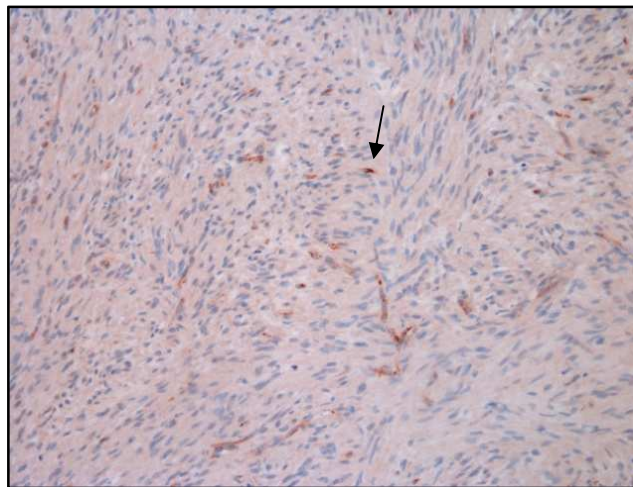


Figura 38- Tumor maligno de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação discreta em raras células tumorais (seta) e em vasos sanguíneos. Obj. 20x. IHQ anti-von Willenbrand.

Em 10 casos houve marcação na IHQ para neurofilamento, observada na periferia da lesão, ou entremeada a outras células que compõem o tumor, como fibroblastos. As células positivas eram alongadas, e a marcação foi acentuada e multifocal. Houve ainda marcação moderada em estruturas anucleadas, alongadas e finas (FIGURAS 39 e 40).

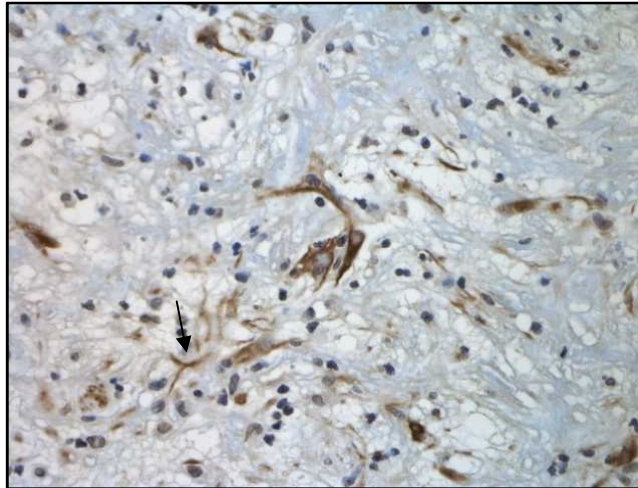


Figura 39- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação citoplasmática acentuada e focal de células alongadas, com citoplasma abundante, além de positividade em estruturas anucleadas, longas e finas (seta). Obj. 40. IHQ anti-Neurofilamento.

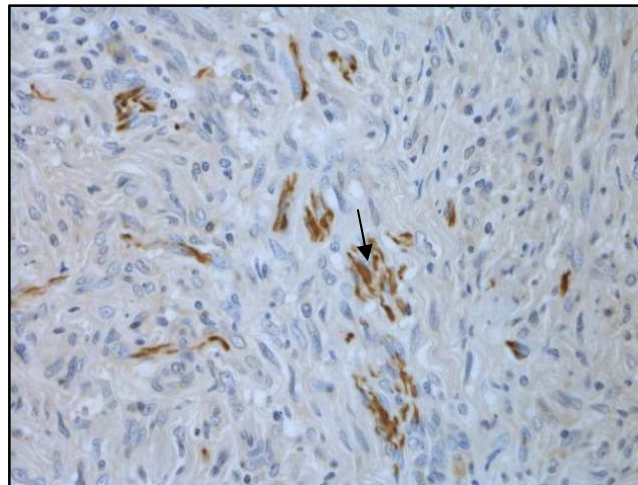


Figura 40- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação citoplasmática acentuada e focal de células alongadas, com citoplasma abundante, além de positividade em estruturas anucleadas, longas e finas (seta). Obj. 40. IHQ anti-Neurofilamento.

A média de núcleos celulares neoplásicos positivos para Ki-67, obtida a cada 10 campos de grande aumento variou de 0 a 13,8 nos tumores benignos (média geral de 2,15). Nos tumores malignos, a média variou de 0,6 a 13,7 (média geral 3,3) (FIGURA 41). Estes dados, e os dados das IHQ anteriores obtidas estão detalhadas na Tabela 6.

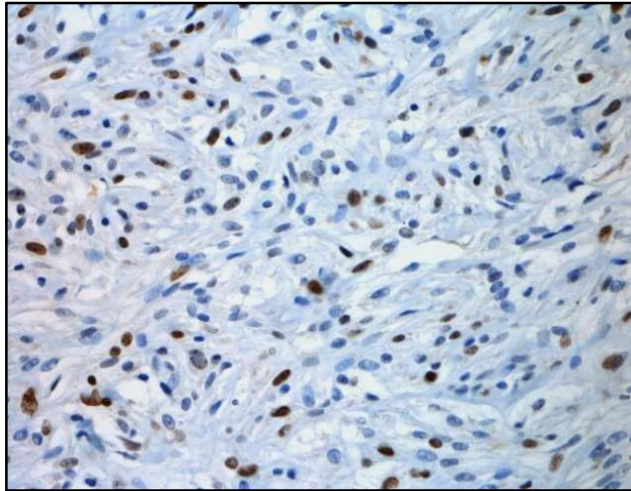


Figura 41- Tumor de bainha de nervo periférico, pele, cão. Marcação nuclear de células em proliferação. Obj. 40. IHQ anti-Ki-67.

Tabela 6- Imunomarcção das amostras de tumores de bainha de nervo periférico de cães, diagnosticados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre os anos 2000-2012.

	Vimentina	S-100	GFAP	Actina	Fator VIII	Neurofilamento	Ki-67*
TBBNP							
1	+++	++	-	-	-	-	0
2	++	+++	-	-	-	-	0
3	+++	+++	-	-	-	-	2
4	++	++	-	-	-	-	1,7
5	++	++	++	-	-	+	0,5
6	++	++	-	-	-	-	0
7	+++	++	-	-	-	-	1
8	++	++	-	-	-	-	5,6
9	+++	++	-	-	-	-	0
10	+	+	+	-	-	-	2,3
11	+++	+++	-	-	-	-	0
12	++	++	-	-	-	-	0
13	+++	+	-	-	-	-	0,6
14	+++	+	-	-	-	-	0
15	+++	+	-	-	-	-	1
16	++	++	+	-	-	-	1
17	++	+	-	-	-	-	1
18	+++	++	++	-	-	+	0
19	+	+++	+++	-	-	-	4
20	+++	++	++	-	-	-	2,8
21	+++	++	+	-	-	-	11,2
22	+++	++	-	-	-	-	0

	Vimentina	S-100	GFAP	Actina	Fator VIII	Neurofilamento	Ki-67*
23	+	++	-	-	-	+	0,8
24	+++	+++	-	-	-	-	0
25	+++	++	-	-	-	-	1
26	+++	+++	+	-	-	+	0
27	+++	+++	+	-	-	+	3,1
28	+++	+++	-	-	-	-	2,2
29	++	+++	-	-	-	-	11
30	++	+	-	-	-	-	4,9
31	+	++	-	-	-	-	7,3
32	+++	++	-	-	-	-	1,6
33	+++	+++	+	-	-	-	0
34	+++	+	++	-	-	-	0
35	+++	+	++	-	-	+	1,5
36	+++	++	++	-	-	-	0,2
37	+++	+++	-	-	-	-	13,8
38	+++	+	-	-	-	-	0
39	+++	++	+	-	-	-	0,4
40	+++	++	+	-	-	-	4,5
41	+++	++	-	-	-	+	0
42	+++	++	-	-	-	+	0,7
43	+++	+++	-	-	-	-	5,8
44	++	+	-	-	-	-	0
45	+++	++	+	-	-	-	0
46	+++	++	+	-	-	-	0
47	+++	++	+++	-	-	-	8
48	+++	+++	+	-	-	-	4
49	+++	++	+	-	-	-	0

	Vimentina	S-100	GFAP	Actina	Fator VIII	Neurofilamento	Ki-67*
TMBNP							
50	++	++	-	-	-	-	2
51	+++	++	-	-	-	-	1
52	+++	+++	-	-	-	-	3,7
53	++	++	+	-	-	+	3
54	+++	++	++	-	-	-	0,7
55	+++	+	-	-	-	-	13,7
56	++	++	-	-	-	-	0,6
57	++	++	-	-	-	-	1,8
58	+++	++	-	-	-	-	3
59	+++	++	-	-	-	-	3
60	+	++	-	-	-	-	1
61	-	+	-	-	-	-	3
62	+	+++	-	-	-	-	4
63	++	++	+	-	-	+	1
64	++	++	-	-	-	-	3,3
65	++	++	+	-	-	-	11,6
66	+++	++	+	-	+	-	1
67	+++	+	-	-	-	-	4
68	++	++	++	-	-	-	2,3
69	++	++	-	-	-	-	2,6
70	+++	+++	-	-	-	-	3

TBBNP= tumores benignos de bainha de nervo periférico; TMBNP= tumores malignos de bainha de nervo periférico; GFAP= proteína fibrilar glial ácida. *Valores médios obtidos a partir da contagem das células tumorais marcadas em 10 campos de grande aumento (40x), aleatórios.

O membro amputado do animal 47 apresentou marcação IHQ menos pronunciada para vimentina, comparada com a amostra recebida previamente. Na amostra da recidiva do tumor, a IHQ anti-neurofilamento foi positiva e a média de núcleos marcados pelo Ki-67 passou de oito para 3,3.

A metástase pulmonar do cão 61 apresentou marcação positiva moderada para vimentina, diferente do tumor primário que foi negativo. A IHQ anti-S-100 permaneceu com marcação discreta na metástase, e a média de núcleos marcados por Ki-67 foi de 0,5 no pulmão, enquanto que no tumor primário, foi detêrês.

4.4 Prognóstico

O prognóstico dos animais foi baseado tendo como base (variante dependente) os animais que tiveram recidiva do tumor. A partir de dados coletados junto aos médicos veterinários responsáveis por cada caso, pôde-se averiguar que dos 70 tumores pesquisados, 17 (24,28%) recidivaram, 37 (52,85%) não recidivaram. Em 16 casos não foi possível obter esta informação.

Na Tabela 7 estão sumarizados os resultados obtidos com as variáveis em relação à recidiva tumoral.

A Tabela 8 apresenta o modelo final da regressão logística. Como fator de risco para recidiva tumoral a variável significativa foi o tipo de tumor apresentado ($p=0.02808$). A variável idade através das análises foi classificada como confundidor sendo retida em todos os passos do modelo da seleção *forward*.

Desta forma, através das análises a chance de um animal que apresentar tumor do tipo maligno vir a desenvolver recidiva é 4,61 vezes maior em relação a um animal que apresenta tumor benigno.

Tabela 7- Distribuição das variáveis: tipo de tumor (benigno ou maligno), sexo, localização do tumor, média de núcleos marcados em Ki-67, anisocitose e anisocariose, mitoses, celularidade, necrose e invasão do tumor a tecidos adjacentes, em relação à categoria recidiva tumoral.

Variável	Categoria	n	Recidiva			
			Sim		Não	
			n	%	n	%
Tipo de Tumor	Benigno	37	7	18,92%	30	81,08%
	Maligno	17	10	58,82%	7	41,18%
Sexo	Fêmea	35	9	25,71%	26	74,29%
	Macho	18	7	38,89%	11	61,11%
	Não informado	1	1	100,00%	0	
Localização	Cabeça/Pescoço/Pele/Cauda	20	6	30,00%	14	70,00%
	Membro Torácico	18	3	16,67%	15	83,33%
	Membro Pelvico	11	6	54,55%	5	45,45%
	Tórax e Abdômen	5	2	40,00%	3	60,00%
Ki-67 (nº de células)	0 -2	30	6	20,00%	24	80,00%
	2 -4	12	6	50,00%	6	50,00%
	4 -6	7	2	28,57%	5	71,43%
	6 -8	1	1	100,00%	0	0,00%
	8 -10	1	1	100,00%	0	0,00%
	10 -12	2	0	0,00%	2	100,00%
	≥12	1	1	100,00%	0	0,00%
Anisocitose/ Anisocariose	Discreta / Moderada	42	11	26,19%	31	73,81%
	Acentuada	12	6	50,00%	6	50,00%
Mitoses*	<1	18	2	11,11%	16	88,89%
	1	27	9	33,33%	18	66,67%
	>2	9	6	66,67%	3	33,33%
Necrose	Sim	20	6	30,00%	14	70,00%
	Não	34	11	32,35%	23	67,65%
Invasão	Não foi possível identificar	13	5	38,46%	8	61,54%
	Não	30	8	26,67%	22	73,33%
	Sim	11	4	36,36%	7	63,64%

* observadas por campo de 40x.

Tabela 8- Modelo de regressão logística multivariada relacionada ao fator de risco para a ocorrência de recidiva tumoral em relação à idade do animal e ao tipo de tumor diagnosticado (tumor maligno).

Variável	Modelo			Valor de P
	<i>Odds ratio</i>	95%IC		
Idade*	1.26	1.03	1.55	0.06373
Tipo de Tumor (maligno)	4.61	1.47	14.45	0.02808

* Confundidor

5 DISCUSSÃO

Existem poucas informações a respeito da epidemiologia dos TBNP em cães. Estima-se que estas lesões ocorram em incidências que variam de 0,5% a 2,41% entre as neoplasias mesenquimais cutâneas de cães (SOUZA *et al.*, 2006; PAKHRIN *et al.*, 2007). Conforme observado nesta pesquisa, a incidência é baixa, cerca 2,34% de todos os tumores de pele de cães diagnosticados pelo SPV-UFRGS.

O número de animais diagnosticados com tumores de pele tem crescido na rotina do SPV-UFRGS, comparado ao relatado por Meirelles *et al.* (2010). Este fato pode estar relacionado ao crescente estreitamento de laços entre os proprietários e seus animais, que convivem mais perto e podem observar alterações, como o aparecimento de tumores (SOUZA *et al.*, 2006). Além disso, um maior esforço para diferenciar, diagnosticar, tratar e definir um prognóstico adequado tem sido feito em relação aos tumores mesenquimais (WILLIAMSON; MIDDLETON, 1998; CHIJIWA; UCHIDA; TATEYAMA, 2004; GAITERO *et al.*, 2008). Ainda, no SPV-UFRGS, tem-se observado o aumento do número de biopsias ano a ano, o que pode influenciar o aumento de casos de determinadas doenças.

Pré-disposição racial relacionada ao desenvolvimento de tumores é reconhecida em cães há muitos anos (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002). No que diz respeito à predisposição racial aos TBNP, há grande prevalência de animais sem raça definida (MEIRELLES *et al.*, 2010). Já Goldschmidt e Shofer (1992) relatam que pode haver predisposição de animais da raça Golden Retriever aos TMBNP, enquanto Scott *et al.* (2001) sugerem a predisposição de Fox Terriers aos *schwannomas* subcutâneos. Gaitero *et al.* (2008) sugerem que em algumas localidades pode existir predileção por algumas raças de cães, o que leva ao maior diagnóstico de determinadas doenças nestes animais. Os cães da raça Pastor Alemão, criada amplamente na região Sul do Brasil, tiveram maior incidência, seguidos dos animais sem raça definida (SOCIEDADE BRASILEIRA CÃES PASTORES ALEMÃES, 2013).

Em relação ao sexo, as fêmeas foram mais acometidas que os machos (55,71% e 41,42% respectivamente). Gaitero *et al.* (2008) sugeriram também uma maior incidência em fêmeas. Em cães, ainda não foi comprovada uma relação hormonal que possa explicar uma possível relação entre o sexo com maior incidência de TBNP, entretanto, na medicina humana, especula-se o envolvimento de hormônios do

crescimento no desenvolvimento de neurofibromas durante a puberdade e ao desenvolvimento da neurofibromatose durante a gravidez (FISHBEIN *et al.*, 2007).

A faixa etária predominante encontrada foi composta por animais entre 8 – 11 anos de idade, seguidos pelos de 12 – 16 anos de idade. Estas informações estão de acordo com outros autores, que relatam uma incidência predominante em animais de meia idade (VIOTT *et al.*, 2007; GAITERO *et al.*, 2008). A relação idade x neoplasia em animais domésticos é amplamente discutida. O acúmulo de danos genéticos durante o tempo, função imunológica diminuída, e um longo tempo de intervalo entre a transformação maligna de uma única célula e a emergência de um neoplasma clinicamente detectável podem ser explicações independentes ou interdependentes para o aumento na incidência de tumores no último terço de vida do animal (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

No que diz respeito à localização dos tumores, os TBNP costumam envolver principalmente os membros de cães (CHIJIWA; UCHIDA; TATEYAMA, 2004); GAITERO *et al.*, 2008), localizados nos maiores nervos (HUNG *et al.*, 2010). Nesse estudo, os membros torácicos e pélvicos foram os locais mais afetados.

Microscopicamente, as lesões correspondem aos relatos na literatura de casos de TBNP em cães (HENDRICK *et al.*, 1998). A distinção de fatores que se sobrepõem ou coexistem em determinadas lesões, assim como a determinação da malignidade, fazem parte de um procedimento diagnóstico adequado (ROSAI, 2004). Aqui, a histologia associada à imuno-histoquímica, permitiu que o diagnóstico fosse firmado e a partir de dados coletados junto aos médicos veterinários responsáveis pelos atendimentos e aos proprietários dos animais pôde ser realizada a avaliação prognóstica.

Na histologia dos tumores benignos, observam-se dois padrões histológicos predominantes. O primeiro compõe a forma “clássica” dos schwannomas, com células fusiformes dispostas em paliçada ou redemoinhos, moderadamente celulares numa matriz fibrinoide delicada. Estes, muitas vezes são considerados difíceis de diferenciar das variantes malignas, uma vez que os tumores benignos apresentarem áreas extensas de necrose e pleomorfismo celular (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Apesar disto, foi possível identificá-los pelo discreto pleomorfismo, por não infiltrarem tecidos adjacentes e possuírem os padrões Antoni A e B mais evidentes. A razão pela qual as células de Schwann se organizam nesses padrões não está clara, porém tem-se observado que neoplasias inicialmente arrançadas no padrão Antoni A podem mudar

para o padrão B após múltiplas transplantações, e por isso, o padrão B poderia representar uma forma primitiva, ou um estado anaplásico (KRINKE, 2011).

No segundo padrão histológico observado nas lesões benignas é demonstrado um arranjo diferente, que pode ser comparado aos neurofibromas caracterizados na literatura médica humana (ROSAI, 2004). Estas neoplasias possuem células longas, dispostas em paralelo ou em diversas direções e que dificilmente formam ninhos. Além disso, são formadas por diferentes componentes celulares, menos homogêneos do que os schwannomas (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Estes componentes podem ser evidenciados pela coloração de TM e pela IHQ. Na primeira, observa-se variável quantidade de tecido conjuntivo pericelular, com tendência a um acúmulo maior do que nos schwannomas. Na IHQ, pode-se valer de marcadores neurais, como o neurofilamento. Nos neurofibromas, este tende a ser positivo entre as células neoplásicas intratumorais, exatamente pelo comportamento de divulsionar os nervos envolvidos na lesão, ao contrário dos schwannomas, que tendem a comprimir o nervo adjacente. Por isso, quando ocorre a marcação positiva para neurofilamento, ela ocorre na periferia, e não no centro da lesão (ROSAI, 2004). Outra marcação positiva observada nesta variante dos TBNP, é na coloração de azul de toluidina. Segundo Cavanagh (1990), mastócitos são vistos nos espaços endoneurais, e o número destas células inflamatórias aumenta quando ocorre alguma injúria ao sistema nervoso periférico. Na pesquisa realizada por Viott *et al.* (2007), os tumores diagnosticados como schwannoma apresentaram mastócitos restritos a poucas áreas, enquanto os neurofibromas possuíam altas concentrações destes.

Em relação ao comportamento invasivo dos neurofibromas, é possível observar na histologia, o “englobamento” de estruturas normais adjacentes, como observado em dois casos, onde havia glândulas e tecido muscular, também descritos em outros trabalhos (RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

Ainda na IHQ, dois marcadores são amplamente utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária, a vimentina e a proteína S-100. A vimentina é o filamento intermediário típico das células mesenquimais, e marcam difusamente nos TBBNP (MELLO; ALVES, 1999; GROSS *et al.*, 2009).

Um dos casos relatados como TMBNP foi negativo na IHQ para vimentina. Isso se deve, pois embora os tecidos normais marquem consistentemente, as células neoplásicas são menos uniformes nos padrões de marcação. Apesar da origem clonal da maioria dos neoplasmas, no momento em que eles são reconhecidos clinicamente,

muitos são compostos por uma população heterogênea de células com padrões de expressão gênica diferentes devido a progressão tumoral. A heterogenicidade tumoral leva a expressões inconsistentes de proteínas (presença de antígeno) e por isso, a padrões de marcação inconsistentes. Neoplasias pobremente diferenciadas são menos prováveis de expressar as proteínas típicas de células de origem do tumor (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

Na IHQ para vimentina, os TBBNP que apresentaram outros tipos celulares, como fibroblastos, a tendência da marcação foi difusa e acentuada das células neoplásicas, sem marcar o restante do tumor, que é composto por células normais do sistema nervoso periférico. Amarcção positiva para proteína S-100, embora não tão acentuada quanto a vimentina, constitui um ferrameta de diagnóstico diferencial importante para fibrossarcomas, que não marcam esta proteína (GROSS *et al.*, 2009). A proteína S-100, além de ser encontrada em uma grande variedade de células normais – melanócitos, subpopulações de histiócitos, condrócitos, adipócitos, músculo cardíaco e esquelético, células de Schwann, entre outras – pode também expressar-se nos tumores correspondentes. Duas de suas maiores utilidades são a positividade citoplasmática e nuclear, usualmente extensa, em virtualmente todos os melanomas, e na evidenciação de diferenciação para bainha de nervo periférico (MELLO; ALVES, 1999). De acordo com estas informações, os schwannomas desta pesquisa tenderam a marcar difusamente vimentina e proteína S-100, porém com intensidade variável. Como uma neoplasia benigna, os schwannomas são facilmente diferenciados dos melanomas na própria histologia.

As células de Schwann não produzem colágeno, são positivas para proteína S-100 e circundadas por lâmina basal. Outros marcadores foram sugeridos para estas células, como anticorpos para proteínas específicas de mielina. Porém, células de Schwann neoplásicas não produzem mielina, e com isso, a utilização destes marcadores pode gerar diagnósticos falso-negativos (KRINKE, 2011).

Entre os diagnósticos diferenciais de TBNP mais citados na literatura, ohemangiopericitoma é um dos mais importantes. Estes, diferenciam-se por serem mais celulares, na maior parte dos casos. O predomínio de núcleos fusiformes com nucléolos pequenos torna o diagnóstico de TBBNP mais consistente, visto que os hemangiopericitomas possuem núcleos mais redondos (GROSS *et al.*, 2009).

Na IHQ os hemangiopericitomas demonstram marcação para diversos anticorpos, como vimentina, actina, desmina, fator VIII, S-100, enolase específica

neuronal e GFAP. Assim como Gaitero *et al.* (2004), o que chamou a atenção no estudo destes pesquisadores, foi que 80% dos hemangiopericitomas apresentaram marcação positiva em actina, e negativa em todos dos TBNP, estando de acordo com marcações observadas nesse trabalho. Em cães, os TMBNP também possuem histomorfologia similar aos hemangiopericitomas (HENDRICK *et al.*, 1998). Em contraste a estes, os TMBNP possuem espirais menos proeminentes, e a maioria possui colágeno esclerótico com mais frequência do que capilares. As células fusiformes são mais delicadas, e possuem mais matriz fibrilar intercelular ou mucinosa do que os hemangiopericitomas (HENDRICK *et al.*, 1998). Além dessas diferenças, IHQ para actina dos tumores benignos, os malignos não apresentaram marcação positiva, o que seria esperado dos hemangiopericitomas (GAITERO *et al.*, 2004).

Outro diagnóstico diferencial mais críticos relacionados ao TMBNP são os melanomas melanóticos. IHQ para S-100 é amplamente utilizada para confirmar o diagnóstico em humanos e em animais (RAMOS-VARA *et al.*, 2000). Entre os fatores especulados para que os TBNP e melanomas compartilhem certas características, está no fato de que tanto melanócitos quanto células de Schwann possuem a mesma origem embrionária, da crista neural (BANKS, 1992). Isso também explicaria a ocorrência, rara, de células melanocíticas em TBNP (MENNEMEYER *et al.*, 1979; PATNAIK; ERLANDSON; LIEBERMAN, 1984; FETSCH; MICHAEL; MIETTINEN, 2000). Choi e Kusewitt (2003) demonstraram que schwannomas costumam ser negativos para marcadores usualmente utilizados para melanomas, que não S-100, como Melan-A e proteína tirosinase-2. Assim, erros de interpretação podem facilmente ocorrer quando apenas um anticorpo é utilizado. Um painel de anticorpos é mais provável de prover informações úteis e acuradas (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002). Fixação adequada, utilização de controles e técnicas de marcação consistentes são essenciais para uma interpretação apropriada da imuno-histoquímica (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

Fatores técnicos como a concentração do anticorpo primário e condições de incubação podem afetar a proporção de células tumorais que serão marcadas. Com frequência, existe variação na proporção de células marcadas em diferentes locais do mesmo neoplasma. Os resultados são interpretados como positivos quando pelo menos uma proporção de células que possuem claramente origem neoplásica são marcadas com anticorpos apropriados (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002).

Entre os outros marcadores utilizados na IHQ, a GFAP, um filamento intermediário característico dos astrócitos (MELLO; ALVES, 1999), apresentou

marcação positiva e de intensidade variável tanto nos tumores benignos, quanto nos malignos. Em humanos, Kawahara *et al.* (1988) relatam a ocorrência desta marcação especialmente em tumores localizados em regiões mais internas do corpo dos pacientes. Este fato não converge com os resultados obtidos nesta pesquisa, onde os tumores localizam-se principalmente em membros.

Algumas pesquisas relacionadas à marcação de GFAP constaram que os TBBNP são positivos do que TMBNP, o que poderia tornar este filamento útil em distinguir estas variantes (ENZIGER; WEISS, 2001; GAITERO *et al.*, 2004).

Uma teoria ainda recente em tumores em humanos, é a ocorrência de tumores híbridos e a positividade de GFAP nestes. A maioria dos TBNP, especialmente os benignos, exibem características morfológicas e imunofenotípicas distintas, que permitem uma determinação clara em um tipo diagnóstico, predominantemente neurofibroma, schwannoma e perineuroma. Ocasionalmente são relatados tumores que são difíceis de especificar em apenas uma categoria (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Estes podem apresentar uma conformação celular de base (frequentemente schwannoma), e associado a isto, características de outros TBNP, como schwannoma + perineuroma e schwannoma + neurofibroma, ou pode ocorrer a colisão de padrões diferentes de tumores (SPINNER *et al.*, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Em duas amostras de TBBNP, pertencentes ao segundo grupo histológico descrito, apresentavam características focais de schwannoma (cães 5 e 47), porém, adicionado a elas, uma estrutura predominante de neurofibroma, além de marcação positiva para GFAP. Além de humanos, tumores híbridos já foram diagnosticados em cães (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009), gatos (SCHULMAN *et al.*, 2009) e bovinos (NIELSEN; JENSEN; LEIFSSON, 2011).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi encontrada reatividade para o fator VIII em uma área limitada de um dos tumores malignos (cão 66). E de acordo com Morphopoulos *et al.* (1996) e Mello e Alves (1999) este resultado pode representar diferenciação vascular da neuroectoderme neoplásica.

Em relação à proliferação celular, acredita-se que quanto maior a atividade proliferativa de um tumor, pior será seu comportamento biológico (MELLO; ALVES, 1999). Quanto a métodos imuno-histoquímicos, utilizamos o marcador nuclear Ki-67, amplamente difundido na medicina humana e veterinária. Este, é expresso durante a fase proliferativa do ciclo celular. Em tumores, a marcação provê uma medida de crescimento tumoral, que basicamente é um indicador da atividade mitótica das células

(LINDEN *et al.*, 1992). Nesta pesquisa, a quantidade de núcleos marcados variou de 0 a mais de 13, tanto nos tumores benignos quanto no malignos. O esperado, era que o índice de proliferação dos tumores benignos permanecesse menor do que nos malignos (GHILUSI *et al.*, 2009). Porém, estas variações podem ocorrer pois os TBNP tratam-se de neoplasias agressivas, que facilmente se expandem ao longo de nervos, especialmente por poderem se apresentar na forma desencapsulada. Esta forma se localiza principalmente no tecido subcutâneo e, ocasionalmente, emite projeções delicadas a partir do tecido tumoral que se estendem até a gordura adjacente, ao longo dos planos fasciais. Isso explica a alta taxa de recidiva observada após a excisão desses tumores (GROSS *et al.*, 2009). Comparando as médias de marcação obtidas com Ki-67 em tumores benignos e malignos, os últimos apresentaram média maior que a dos primeiros, porém esta diferença não foi significativa estatisticamente.

Mesmo com o resultado similar das médias de proliferação celular entre tumores benignos e malignos, foi possível estabelecer através da análise estatística, que o risco de um animal com tumor maligno apresentar recidiva é 4,61 vezes maior que o animal com tumor benigno. Na literatura, tanto o diagnóstico de neoplasia maligna, quanto a recidiva são classificados com prognóstico reservado a ruim (STARK *et al.*, 2001).

Existe ainda a possibilidade da utilização de outros marcadores imunohistoquímicos que auxiliem no estabelecimento de um prognóstico, como o p53 e as chaperonas, além de marcadores com maior especificidade para a origem celular e/ou que possibilitem a diferenciação entre tumores benignos e malignos (KINDBLOM *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 2001; ZOU *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÕES

Os tumores de bainha de nervo periférico cutâneos desta pesquisa apresentaram as seguintes características:

- Localização predominante em membros;
- Cães com idade entre 8-11 anos foram mais acometidos;
- Fêmeas foram mais acometidas que machos;
- O padrão histológico Antoni A foi mais observado nos tumores benignos;
- Diversos marcadores imuno-histoquímicos auxiliam no diagnóstico de TBNP, e os que apresentaram maior sensibilidade foram anti-vimentina e anti- proteína S-100.
- Os animais que apresentam tumor maligno possuem 4,61 vezes mais chance de recidiva.

REFERÊNCIAS

- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo : Manole, 1992. 658p.
- BRADLEY, R. I.; WITHROW, S. J.; SNYDER, S. P. Nerve sheath tumors in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 18, n. 6, p. 915-921, 1982.
- BREHM, D. M. *et al.* A retrospective evaluation of 51 cases of peripheral nerve sheath tumors in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 4, p. 349-359, 1995.
- CALDERWOOD, S. K. *et al.* Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 3, p. 164-172, 2006.
- CARROLL, S. Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 3, p. 321-348, 2012.
- CASADEI, S. *et al.* Cellular schwannoma. A clinicopathologic, DNA flow cytometric, and proliferation marker study of 70 patients. **Cancer**, v. 5, n. 75, , p. 1109-1119, 1995.
- CAVANAGH, J. B. Peripheral Nervous system. In: WELLER, R. O. (Ed). **Nervous system, muscle and eyes**. 3.ed. Londres: Churchill Livingstone, 1990. p. 533-543.
- CHIJIWA, K.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 307-318, 2004.
- CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p.3-44.
- DE LAHUNTA, A. Letter to the editor – feline nerve sheath tumors versus feline peripheral nerve sheath tumors. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 4, p. 758, 2010.
- DICARLO, E. F. *et al.* The purely epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumor. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 10, n. 7, p. 478-490, 1986.
- ENZIGER, F. M.; WEISS, S. W. Soft tissue tumors. In: WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R. (Org.) **Enzinger and Weiss's soft tissue tumors**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 2001. p. 1405-1417.
- FETSCH, J. F.; MICHAEL, M.; MIETTINEN, M. Pigmented (melanotic) neurofibroma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 19 lesions from 17 patients. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 3, p. 331-343, 2000.
- FISHBEIN, L. *et al.* In vitro studies of steroid hormones in neurofibromatosis 1 tumors and Schwann cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 46, n. 7, p. 512-523, 2007.
- FROSCH, M. P.; ANTHONY, D. C.; GIROLAMI, U. O sistema nervoso central. In: KUMAR, V. *et al.* (Eds). **Robins & Cotran: patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2010. p. 1287-1352.
- GAITERO, L. *et al.* Canine cutaneous spindle cell tumours with features of peripheral nerve sheath tumours: a histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, v.139, n. 1, p. 16-23, 2008.

- GERDES, J. *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.
- GHILUSI, M. *et al.* Preliminary study regarding the utility of certain immunohistochemical markers in diagnosing neurofibromas and schwannomas. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, n. 2, p. 195-202, 2009.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. Cutaneous tumours of neural differentiation. In: GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. (Eds). **Skin tumours of the dog and cat**. Oxford: Pergamon Press, 1992. 316p.
- GOLDSCHMIDT, M.H. *et al.* **Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1998. 106p.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p. 45-117.
- GROSS, T. L. *et al.* **Doenças de pele do cão e do gato: diagnóstico clínico e histopatológico**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2009. 904p.
- HAUCK, M.L. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. (Org.). **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. p.305-320.
- HARGIS, A. M.; GINN, P. E. The integument. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Org.). **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. p.1107-1261.
- HÉBERT-BLOUIN, M. *et al.* Multinodular/plexiform (multifascicular) schwannomas of major peripheral nerves: an underrecognized part of the spectrum of schwannomas. **Journal of Neurosurgery**, v. 2, n. 112, p. 372-383, 2010.
- HENDRICK, M. J. *et al.* **Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals**. Washington: Armed Forces of Pathology, 1998. 62p.
- HUNG, Y. W. *et al.* Surgical excision for challenging upper limb nerve sheath tumours: a single centre retrospective review of treatment results. **Hong Kong Medical Journal**, v. 16, n. 4, p. 287-291, 2010.
- JOHNSON, T. L. *et al.* Immunohistochemical characterization of malignant peripheral nerve sheath tumors. **Surgical Pathology**, v. 4, p. 121-135, 1991.
- JOSHI, R. Learning from eponyms: Jose Verocay bodies, Antoni A and B áreas, Nils Antoni and schwannomas. **Indian Dermatology Online Journal**, v.3, n.3, p.215-219. 2012.
- KALDRYMIDOU, H. *et al.* Prevalence, distribution and factors associated with the presence and the potential for malignancy of cutaneous neoplasms in 174 dogs admitted to a clinic in Northern Greece. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.49, n.2, p.87-91, 2002.
- KAWAHARA, E. *et al.* Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in peripheral nerve sheath tumors. A comparative study of immunoreactivity of GFAP,

vimentin, S-100 protein, and neurofilament in 38 schwannomas and 18 neurofibromas. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 12, n. 2, p. 115-120, 1988.

KEY, G.; KUBBUTAT, M. H.; GERDES, J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. **Journal of Immunological Methods**, v. 177, n. 1-2, p. 113-117, 1994.

KINDBLOM, L. *et al.* Immunohistochemical and molecular analysis of p53, MDM2, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in benign and malignant peripheral nerve sheath tumours. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 427, n. 1, p.19-26, 1995.

KING, R.; BUSAM, K.; ROSAI, J. Metastatic malignant melanoma resembling malignant peripheral nerve sheath tumor: report of 16 cases. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 23, n. 12, p. 1499-1505, 1999.

KOESTNER, A.; HIGGINS, R. J. Tumors of the nervous system. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Ames : Iowa State Press, 2002. p.697-738.

KRAUSZ, T.; AZZOPARDI, J. G.; PEARSE, E. Malignant melanoma of the sympathetic chain: with a consideration of pigmented nerve sheath tumours. **Histopathology**, v. 8, n. 5, p. 881-894, 1984.

KRINKE, G. J. Neuropathological analysis of the peripheral nervous system. In: BOLON, B.; BUTT, M. T. (Eds.). **Fundamental neuropathology for pathologists and toxicologists: principles and techniques**. Hoboken: Wiley, 2011. p.365-384.

KUNTZ, C. A. *et al.* Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue saromas in dogs: 75 cases (1986-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 9, p.1147-1151, 1997.

LESLIE, M. D.; CHEUNG, K. Y. P. Malignant transformation of neurofibromas at multiple sites in a case of neurofibromatosis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 63, p. 131-133, 1987.

LINDEN, M. D. *et al.* Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 97, suppl. 1, p. 4-13, 1992.

MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. Neoplastic diseases of the nervous system. In: MAXIE, M. G. (Ed). **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. Londres: Saunders Elsevier, 2007. p. 446-457.

MCENTEE, M. C.; DEWEY, C. W. Tumors of the nervous system. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R. L. (Org.). **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013.p. 583-595.

MEIRELLES, A. E. W. B.*et al.* Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.968-973, 2010.

MELLO, E.S.; ALVES, V.A.F. Glossário dos principais marcadores imuno-histoquímicos. In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. (Org.). **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270p.

MELLO, E. S.; ALVES, V. A. F. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Org.). **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270p.

- MENNEMEYER, R. P. *et al.* Melanotic schwannoma. Clinical and ultrastructural studies of three cases with evidence of intracellular melanin synthesis. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 1979.
- MENON, A. G. *et al.* Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5435-5439, 1990.
- MORPHOULOS, G. D. *et al.* Malignant peripheral nerve sheath tumour with vascular differentiation: a report of four cases. **Histopathology**, v. 28, n. 5, p. 401-410, 1996.
- MURPHY, S. Skin neoplasia in small animals: 1. Principles of diagnosis and management. **In Practice**, v. 28, n. 5, p.266-271, 2006.
- NIELSEN, A. B. *et al.* Immunoreactivity of bovine schwannomas. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v. 137, n. 4, p.224-230, 2007.
- NIELSEN, A. B.; JENSEN, H. E.; LEIFSSON, P. S. Immunohistochemistry for 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphohydrolase in 63 bovine peripheral nerve sheath tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 7, p. 796-802, 2011.
- OMI, K. *et al.* An immunohistochemical study of peripheral neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, anaplastic glioma, schwannoma and neurofibroma in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 111, n. 1, p. 1-14, 1994.
- OREN, M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 51, p. 36031-36034, 1999.
- ORTIZ-HIDALGO, C.; WELLER, R. O. Peripheral Nervous System. In: MILLS, S. E. (Ed.). **Histology for pathologists**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 241-271.
- OWEN, L. N. Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, 1980.
- PAKHRIN, B. *et al.* Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v.8, n.3, p.229-236, 2007.
- PATNAIK, A. K.; ERLANDSON, R. A.; LIEBERMAN, P. H. Canine malignant melanotic schwannomas: a light and electron microscopic study of two cases. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p.483-488, 1984.
- PATNAIK, A. K. *et al.* Malignant nerve-sheath tumor with divergent and glandular differentiation in a dog: a case report. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 3, p.406-410, 2002.
- PAVARINI, S. P. *et al.* Malignant peripheral nerve sheath tumor as a cause of chronic cardiac insufficiency in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.55, n.7, p.1-6, 2013.
- RAMOS-VARA, J. A. *et al.* Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.
- RODRIGUEZ, F. J. *et al.* Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 3, p. 295-319, 2012.

- ROSAI, J. Soft tissues. In: ROSAI, J. **Rosai and Ackerman's surgical pathology**. 9. ed. Londres: Mosby Elsevier, v. 2, 2004. 2977p.
- SCHÖNIGER, S.; SUMMERS, B. A. Localized, plexiform, diffuse, and other variants of neurofibroma in 12 dogs, 2 horses, and a chicken. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 904-915, 2009.
- SCHÖNIGER, S. *et al.* Cutaneous schwannomas in 22 horses. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 433-442, 2011.
- SCHULMAN, F. Y. *et al.* Feline peripheral nerve sheath tumors: histologic, immunohistochemical, and clinicopathological correlation (59 tumors in 53 cats). **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 46, n. 6, p. 1166-1180, 2009.
- SOARES, M. A. **Casuística de neoplasias da pele e tecido subcutâneo**. Viseu: ISPV, 2010. Originalmente apresentado como trabalho de conclusão de curso, Instituto Superior Politécnico de Viseu, Portugal, 2010. 129p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA CÃES PASTORES ALEMÃES. Consultas ao banco de dados – canis. Disponível em <<http://www.sbcpa.com.br>> acessado em 11 Out 2013.
- SOUZA, T. M. *et al.* Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-560, 2006.
- SPINNER, R. J. *et al.* Colocalized cellular schwannoma and plexiform neurofibroma in the absence of neurofibromatosis. Case report. **Journal of Neurosurgery**, v. 107, n. 2, p. 435-439, 2007.
- STARK, A. M. *et al.* Malignant peripheral nerve sheath tumours – report of 8 cases and review of the literature. **Acta Neurochirurgica**, v. 143, n. 4, p. 357-364, 2001.
- SUGHRUE, M. E.; LEVINE, J.; BARBARO, N. M. Pain as a symptom of peripheral nerve sheath tumors: clinical significance and future therapeutic directions. **Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury**, v.3, n. 6, 2008.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. St. Louis : Mosby, 1995.527p.
- TAYLOR, C. R.; SHI, S.; BARR, N. J. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: DABBS, D. J. (Ed.) **Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications**. 3. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. p.1-41.
- TELLECHEA, O.; REIS, J. P.; BAPTISTA, A. P. Mixoma dérmico das bainhas nervosas (neurotecoma). **Acta Médica Portuguesa**, v. 5, n. 2, p. 97-99, 1992.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002.532p.
- UNICAMP – ANATOMIA PATOLÓGICA. Disponível em <<http://anatpat.unicamp.br/bineurofibroma.html>>acessado em 19 Set 2013.
- VEAZEY, R. S. *et al.* Malignant schwannoma in a goat. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 5, n. 3, p. 454-458, 1993.
- VIOTT, A. M. *et al.* Aspectos histoquímicos e imunoistoquímicos nos neoplasmas do sistema nervoso periférico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1145-1153, 2007.

- VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.
- VOLL, J. *et al.* Exérese de schwannoma por meio da técnica de hemilaminectomia dorsolateral cervical cranial. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 183-186, 2006.
- WATABE, K. *et al.* Tactile-like corpuscles in neurofibromas: immunohistochemical demonstration of S-100 protein. **Acta Neuropathologica**, v. 61, n. 3-4, p.173-177, 1983.
- WATANABE, T. *et al.* Malignant peripheral nerve sheath tumours: high Ki67 labelling index is the significant prognostic indicator. **Histopathology**, v. 39, n. 2, p. 187-197, 2001.
- WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R. Benign tumor of the peripheral nerves. In: WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R. (Org.) **Enzinger and Weiss's soft tissue tumors**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 2001a. p.1111-1208.
- WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R. Malignant tumor of the peripheral nerves. In: WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R. (Org.) **Enzinger and Weiss's soft tissue tumors**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 2001b.p.1209-1235.
- WILLIAMSON, M. M.; MIDDLETON, D. J. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. **Veterinary Dermatology**, v.9, n.1, p.43-48, 1998.
- YANG, I.; FANG, S.; PARSA, A. T. Heat shock proteins in glioblastomas. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 111-123, 2010.
- ZACHARY, J. F. Nervous system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Org.). **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. p. 833-971.
- ZOU, C. *et al.* Clinical, pathological, and molecular variables predictive of malignant peripheral nerve sheath tumor outcome. **Annals of Surgery**, v. 249, p. 1014-1022, 2009.