

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE TUMORES
CUTÂNEOS DAS BAÍNHAS DOS NERVOS PERIFÉRICOS
EM CANÍDEOS

SÍLVIA GONÇALVES TEIXEIRA

Dissertação de Mestrado em Oncologia

Porto, 2013

Sílvia Gonçalves Teixeira

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE TUMORES CUTÂNEOS DAS BAÍNHAS DOS NERVOS PERIFÉRICOS EM CANÍDEOS

**Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em
Oncologia submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do
Porto.**

Orientador – Professora Doutora Fátima Gärtner

Categoria – Professora Catedrática

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto e Instituto de
Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do
Porto

Co-Orientador – Dra. Irina Amorim

Categoria – Doutoranda em Ciências Veterinárias

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto e Instituto de
Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do
Porto

Ao meu filho V.

Agradecimentos

Dedico as próximas linhas a todos os que tornaram possível a sua escrita, este trabalho, que me apoiaram e nunca me permitiram os pensamentos derrotistas.

À Comissão Organizadora do Mestrado em Oncologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, por esta oportunidade. Um obrigado especial ao Professor Doutor Carlos Lopes pela nossa primeira conversa.

À Professora Doutora Fátima Gärtner, orientadora deste trabalho, e que prontamente me aceitou no seu laboratório. Obrigada pela oportunidade, por acreditar e não me deixar desistir. Agradeço ainda pela orientação técnico-científica e por toda a paciência e tempo que disponibilizou a mim, ao trabalho e à revisão desta tese.

À Irina, co-orientadora desta tese, que sem comos, nem quando, nem porquês se pôs do meu lado e me levou para a linha da frente. Obrigada por me teres contagiado com a tua garra e me teres feito ver que depois da maternidade tudo para nós é possível! Um beijinho muito grande.

A todos os elementos do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, por manifestarem sempre a vossa simpatia e pelo apoio técnico ao meu trabalho. Obrigada ainda por todas as conversas e todos os momentos de descontração que não me deixaram parar de lutar. Desculpem qualquer coisa menos boa. Para vocês um beijinho muito grande.

A todos os meus amigos, em especial à Ana S. por tudo! A todos os outros, um grande abraço por me terem ouvido, por se terem rido, obrigada.

Aos meus pais, por todo o carinho e por tentarem perceber o que nem sempre consegui explicar. Obrigada do fundo do coração. Ao meu irmão, Gonçalo, por ser ele. Aos três um abraço bem grande.

A ti, Carlos, por estares sempre comigo. Um beijo enorme pela força, por achares que consigo e dizeres que o melhor está sempre para vir. Ao nosso filho V., que lutou comigo e em mim sem porquês, por me fazer a mãe mais feliz do Mundo. Amo-vos.

Resumo

À semelhança do que acontece nos seres humanos, tem vindo a registar-se um aumento da incidência de neoplasias nos animais de companhia sendo que, no cão, a pele é o local mais comum para a sua ocorrência. Nos tumores cutâneos caninos de origem mesenquimatosa estão incluídos os tumores das bainhas dos nervos periféricos (TBNP), benignos e malignos.

A histogénese dos TBNP em canídeos não é ainda abordada com rigor e clareza pela comunidade científico-profissional e mesmo após longos anos de investigação, a dificuldade em caracterizar e classificar este tipo de neoplasias tem vindo a persistir.

Assim, no sentido de contribuir para uma melhor e mais correta caracterização destas lesões, 40 TBNP caninos (17 casos benignos e 23 casos malignos) foram submetidos a um painel imunohistoquímico composto pelos seguintes marcadores: S-100, vimentina, GFAP, desmina, α -actina, NSE e Ki-67.

Adicionalmente, foram também estudados alguns dados dos animais (raça, idade, sexo), determinados parâmetros clínicos (tamanho, número e localização das lesões) e alguns registos relativos ao seu *follow-up*.

A nossa investigação discute a extrema dificuldade na classificação dos TBNP caninos, com base no mero estudo da sua histogénese ou análise imunohistoquímica contudo, ressalva outras importantes conclusões que poderão ser relevantes enquanto auxiliares de diagnóstico e para efeitos de prognóstico em medicina veterinária: as lesões TBNP malignas apresentam dimensões significativamente superiores às benignas; as lesões TBNP malignas apresentam na sua generalidade sobreexpressão de S-100, comparativamente com as benignas bem como, índices de proliferação celular significativamente mais elevados.

Abstract

Similarly to what is seen in humans, an increase incidence of neoplasms in pets is being noticed and in dogs, the skin is the most common site for its occurrence. Peripheral Nerve Sheath Tumors (PNST) are cutaneous tumors with mesenchymal origin that occur in dogs and can exhibit benign and malignant biological behaviour.

Even after many years of research, the histogenesis of PNST in dogs is still not fully elucidated and the difficulty in characterizing and classifying this type of neoplasms still persists.

In order to contribute to a better and more correct characterization of these lesions, 40 canine PNST (17 benign and 23 malignant cases) were subjected to an immunohistochemical panel with the following markers: S-100, Ki-67, Vimentin, GFAP, Desmin, α -actin and NSE.

In addition, we also studied some characteristics of the animals included in the sample (breed, age, sex), certain clinical parameters (size, number and location of lesions) and some data related to its follow-up. Our research discusses the extreme difficulty in classifying canine PNST, based merely in the study of its histogenesis or immunohistochemical analysis, however it highlights other important conclusions that may be usefull for diagnostic and prognostic purposes in veterinary medicine: malignant PNST present dimensions significantly higher than the benign ones; in general, malignant PNST exhibit an overexpression of S-100 compared to benign lesions, as well as cellular proliferation indexes are significantly higher.

Índice

Resumo

Abstract

INTRODUÇÃO	1
Neoplasias das Bainhas dos Nervos Periféricos	4
Sinais Clínicos e Diagnóstico	5
Tumores Benignos das Bainhas dos Nervos Periféricos	6
Neurofibroma	7
Schwannoma	9
Perineurioma	12
Tumores Malignos das Bainhas dos Nervos Periféricos	13
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Material	18
Métodos	18
Dados Clínicos	18
Avaliação Macroscópica	18
Avaliação Histológica	19
Estudo Imunohistoquímico	20
Análise Estatística	24
RESULTADOS	27
Dados Clínicos	27
Avaliação Histológica	29
Avaliação Imunohistoquímica	32
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	43
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Índice de figuras

Figura 1 - Ilustração esquemática da organização estrutural de um feixe nervoso.	3
Figura 2 - Ilustração esquemática dos recetores cutâneos nervosos.	4
Figura 3 - Ilustração esquemática dos corpúsculos de Verocay.	7
Figura 4 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 31. H&E: 100x.	30
Figura 5 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 8. H&E: 100x.	30
Figura 6 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 15. H&E: 40x.	31
Figura 7 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 6. IHQ: S-100, 100x.	33
Figura 8 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 31. IHQ: S-100, 200x.	34
Figura 9 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 8. IHQ: ki-67, 200x.	35
Figura 10 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 28. IHQ: Vimentina, 200x.	36
Figura 11 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 20. IHQ: Vimentina, 200x.	37
Figura 12 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 12. IHQ: GFAP, 200x.	38
Figura 13 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 38. IHQ: GFAP, 200x.	38
Figura 14 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 10. IHQ: Desmina, 200x.	39
Figura 15 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 39. IHQ: Desmina, 200x.	30
Figura 16 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 22. IHQ: α -actina, 200x.	40
Figura 17 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 8. IHQ: α -actina, 200x.	40
Figura 18 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 34. IHQ: NSE, 200x.	41
Figura 19 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 5. IHQ: NSE, 200x.	41

Índice de quadros

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para o estudo IHQ e suas características.	22
Quadro 2 – Metodologia utilizada para a avaliação da imunoreatividade dos diferentes marcadores.	24
Quadro 3 - Dados epidemiológicos e clínicos dos 40 animais incluídos na amostra em estudo.	28
Quadro 4 - Resultados histológicos e imunohistoquímicos obtidos com os diferentes anticorpos.	32

Lista de siglas, abreviaturas e acrónimos

a - Anos

B - Benigno

cm - Centímetros

D - Desconhecido

DAB - 3,3' - *Diaminobenzidine tetrahydrochloride*

DP - Desvio padrão

GFAP - *Glial fibrillary acidic protein*

H&E - Hematoxilina-eosina

ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

IHQ - Imunohistoquímica

IP - Índice de proliferação

M - Maligno

m - Membros

n - Número de observações

NF1 - Neurofibromatose 1

NF2 - Neurofibromatose 2

NSE - *Neuron specific enolase*

OMS - Organização Mundial de Saúde

ON - *Overnight*

p - Nível de significância estatística

pH - Potencial de hidrogénio

PP - Painel de pressão

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SRD - Sem raça definida

t - Tronco

TBNP - Tumores das bainhas dos nervos periféricos

TBS - *Triphosphate buffered saline*

TC - Tampão citrato

UP - Universidade do Porto

χ^2 - Teste de Independência do Qui-Quadrado

μm - Micrómetros

♂ - Macho

♀ - Fêmea

® - Marca registada

% - Porcento

°C - Graus Celsius

INTRODUÇÃO

Introdução

A **pele** é o maior e mais visível órgão do corpo, constituindo uma barreira anatômica e fisiológica entre o animal e o ambiente. Providencia proteção contra danos físicos, químicos e microbiológicos e adicionalmente, é sinérgica com os sistemas de órgãos internos, refletindo processos patológicos que são primários noutros órgãos ou partilhados com outros tecidos. A pele não é apenas um órgão com os seus próprios padrões de reação, é também um espelho que reflecte o ambiente interno do organismo, e ao mesmo tempo o Mundo caprichoso ao qual está exposta (Scott *et al.*, 2001).

Tanto a pele como o sistema nervoso derivam da ectoderme, o folheto externo do embrião, que durante a sua evolução e de forma bastante simplista, dobra-se sobre si mesmo formando o tubo neural. A parte externa vai originar a pele e a parte interna vai originar o sistema nervoso. Portanto, desde muito cedo que a pele apresenta uma íntima ligação com o sistema nervoso, enviando-lhe constantemente informações sobre o meio externo.

A pele é um tecido complexo que apresenta um sistema neurológico cutâneo sofisticado e peculiar, bem como estruturas sensoriais aferentes especializadas capazes de eliciar a sensação de dor, vibração, calor, frio, toque, pressão, etc. Apesar de menos popular, o sistema sensorial cutâneo também proporciona capazmente o desenvolvimento de atividades eferentes. Tudo isto se processa através de terminações nervosas que existem na pele, responsáveis pela conexão entre o sistema nervoso central e periférico.

O sistema nervoso periférico (SNP) leva as informações dos órgãos sensoriais para o sistema nervoso central e do sistema nervoso central (SNC) para os órgãos efetores (músculos e glândulas). O nervo é o elemento primordial do SNP. A sua estrutura consta de um feixe de fibras nervosas envolvido por tecido conjuntivo, composto na sua maior parte por colagénio.

Classicamente, as fibras nervosas são constituídas por um axónio e células circundantes. Nas fibras nervosas periféricas, a célula de Schwann é a responsável pela formação da bainha de mielina (Junqueira e Carneiro, 2008). De um modo mais simplista, o conjunto do axónio e da bainha de mielina formam uma fibra nervosa.

A condução de impulsos nervosos pelos axónios é facilitada pela organização estrutural dos nervos periféricos (Topp e Boyd, 2006). Esta informação parte do corpo celular de um neurónio e vai ser transmitida ao neurónio seguinte. Devido à distância entre os corpos celulares e as terminações nervosas dos neurónios, os axónios são isolados, agrupados e protegidos por três camadas de tecido conjuntivo (Topp e Boyd, 2006).

O tecido conjuntivo que reveste cada axónio individualmente denomina-se endoneuro. No endoneuro, a relação entre os axónios e as células de Schwann é muito próxima. A mielinização dos axónios é assegurada pelas células de Schwann, e assegura uma rápida condução do impulso nervoso (Stewart, 2003; Topp e Boyd, 2006). Ao longo de um axónio mielinizado, existem regiões desprovidas de bainha de mielina, que separam uma célula de Schwann mielinizante de outra, às quais se dá a designação de nódulos de Ranvier. O espaço entre axónios é preenchido por tecido conjuntivo frouxo de fibras de colagénio, fibroblastos, alguns mastócitos e macrófagos, e líquido endoneural (Topp e Boyd, 2006).

O perineuro é composto por várias camadas de células perineurais, intercaladas por fibrilas de colagénio e fibras elásticas. Esta estrutura altamente especializada é responsável por agrupar os feixes de axónios em fascículos (Stewart, 2003; Topp e Boyd, 2006). Estas camadas de colagénio e de células perineurais mantêm a homeostasia do líquido endoneural que rodeia as fibras nervosas (Stewart, 2003).

Os fascículos nervosos são mantidos juntos e agrupados pelo epineuro. O epineuro é a camada mais externa de tecido conjuntivo e inclui fibrilas de colagénio e fibras elásticas, bem como fibroblastos, mastócitos e células adiposas (Topp e Boyd, 2006). Esta é a estrutura que envolve o nervo periférico no seu todo, garantindo a sustentação e proteção das fibras nervosas contra danos externos (Figura 1).

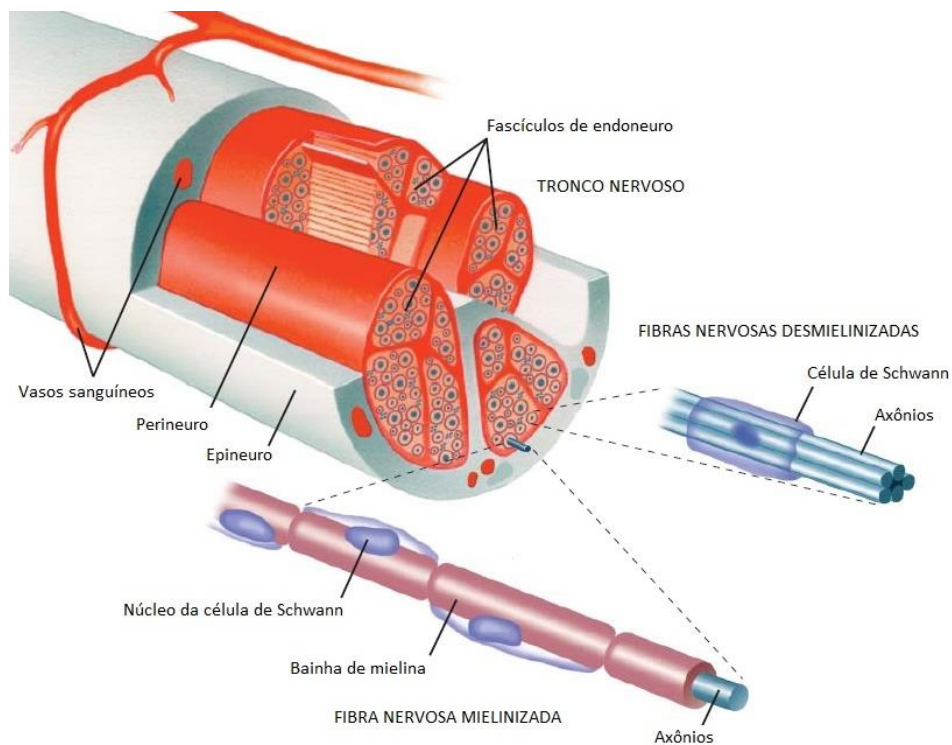


Figura 1 - Ilustração esquemática da organização estrutural de um feixe nervoso

(Fonte: http://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acpmedicine/5390/doencas_do_sistema_nervoso_periferico_%E2%80%93%93_colin_h_chalk.htm).

Como órgão sensorial por excelência, a pele tem, ao longo de toda a sua extensão, vários recetores sensoriais, capazes de detetar diferentes estímulos.

Antes de o estímulo ser conduzido ao sistema nervoso central, a sua transdução num sinal elétrico acontece numa fibra nervosa sensitiva do órgão recetor, no caso, a pele.

Os recetores sensoriais cutâneos são classificados, conforme a presença ou ausência de tecido conjuntivo em volta das terminações nervosas, em encapsulados ou não encapsulados (Junqueira e Carneiro, 2008).

As terminações nervosas não encapsuladas incluem as terminações nervosas livres e os corpúsculos de Merkel. As terminações nervosas livres localizam-se na derme e epiderme e percebem estímulos mecânicos, térmicos, e ainda estímulos nocivos, suscetíveis de causar dor (Meyers *et al.*, 2013). Por seu lado, os corpúsculos de Merkel são recetores mecânicos, que respondem ao toque prolongado e a pressão. Estes encontram-se na base dos folículos pilosos e na derme da pele glabra (Meyers *et al.*, 2013) (Figura 2).

Os corpúsculos de Meissner, por seu lado, são exclusivos das papilas dérmicas da pele glabra, localizando-se preferencialmente nas pontas dos dedos das mãos e dos pés. Os corpúsculos de Meissner são recetores encapsulados sensíveis a um toque ténue e a vibração de baixa frequência (Meyers *et al.*, 2013). Por último, os corpúsculos de Ruffini, assim como os corpúsculos de Pacini são também dois mecanorecetores encapsulados que se localizam na derme profunda da pele glabra (Figura 2). Os corpúsculos de Ruffini são sensíveis à pressão prolongada, enquanto os corpúsculos de Pacini são mais sensíveis à pressão nas partes profundas do corpo, bem como à vibração de alta frequência (Meyers *et al.*, 2013).

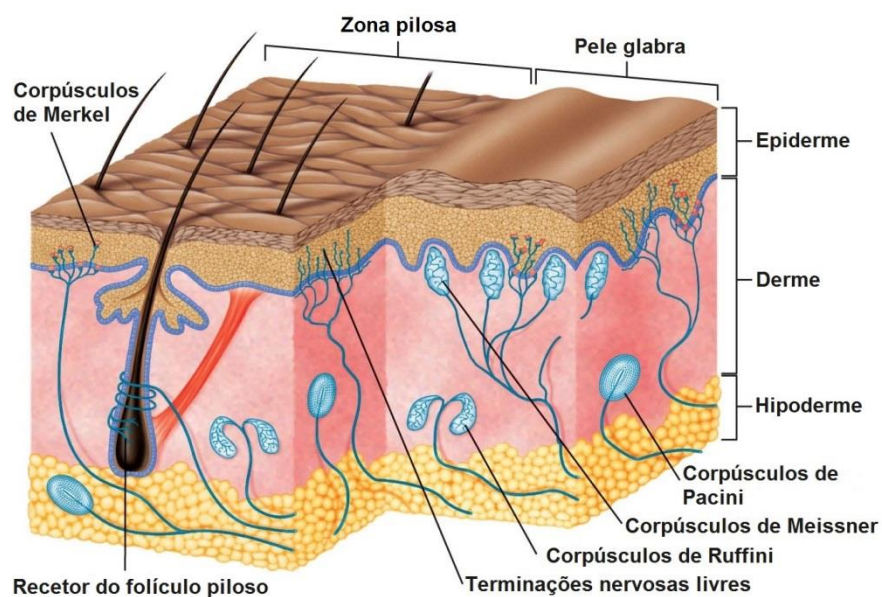


Figura 2 - Ilustração esquemática dos recetores cutâneos nervosos

(Fonte: <http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/Somatosensation/Somatosensation/Receptors.html>).

Neoplasias das bainhas dos nervos periféricos

À semelhança do que acontece nos seres humanos, tem vindo a registar-se um aumento da incidência de neoplasias nos animais de companhia, sendo que a pele é o local mais comum de ocorrência de neoplasias no cão (Scott *et al.*, 2001).

O diagnóstico de tumores de origem mesenquimatosa é muito frequente em animais domésticos, e em particular no cão, constituindo aproximadamente 50% de todas as neoplasias cutâneas nesta espécie (Scott *et al.*, 2001; Goldschmidt e Hendrick, 2002). Para tal contribui, além do aumento da esperança média de vida, o facto de cada vez

mais, ao longo dos últimos anos, os cães passaram a ser elementos integrantes de muitas famílias. As alterações que surgem na pele são facilmente detetáveis pelos proprietários que procuram auxílio quase imediato do médico veterinário. Desta feita, acredita-se que, nos últimos anos, 20 a 75% dos problemas que surgem em clínicas e hospitais veterinários são do foro dermatológico (Scott *et al.*, 2001).

As neoplasias cutâneas caninas são muito variadas. Os mastocitomas são uma das neoplasias mais comum nesta espécie, representando cerca de 10 a 15% de todos os tumores cutâneos (Gross *et al.*, 2005).

De entre os tumores cutâneos de origem mesenquimatosa estão incluídos os tumores das bainhas dos nervos periféricos (TBNP), benignos e malignos.

Os TBNP pertencem a um grupo muito heterogéneo de neoplasias e podem ter origem nas células de Schwann, células perineurais e fibroblastos. Este tipo de tumores ocorre tanto no Homem como no cão (Kleihues e Cavaneer, 2000).

Na medicina humana, e de acordo com a sua origem celular, os TBNP são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em schwannoma, neurofibroma, perineurioma e tumores malignos das bainhas dos nervos periféricos (Kleihues e Cavaneer, 2000; Weiss e Goldblum, 2001a; Huang *et al.*, 2006).

No entanto, em veterinária as semelhanças clínicas e morfológicas das lesões que compõem este grupo de neoplasias torna a classificação histopatológica dos TBNP bastante difícil e controversa. Este obstáculo deve-se, provavelmente à baixa incidência de TBNP na medicina veterinária e, portanto à falta de estudos relacionados com este grupo de neoplasias (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005). Assim, são genericamente designados de Tumores das Bainhas dos Nervos Periféricos. No que diz respeito ao comportamento biológico e morfológico, são divididos em benignos ou malignos (Hendrick *et al.*, 1998; Koestner *et al.*, 1999; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005).

Sinais clínicos e diagnóstico

O diagnóstico clínico dos TBNP não é, de facto, uma tarefa fácil para o médico veterinário. Este obstáculo deve-se, em parte, à falta de especificidade dos sintomas que o animal manifesta. De um modo geral, o animal apresenta uma massa palpável ao toque, com localização preferencial na região do tronco e membros. Assim, os sinais clínicos exibidos são comuns a muitas outras patologias diagnosticadas em medicina veterinária.

Habitualmente os sinais clínicos incluem dor severa, claudicação progressiva crónica dos membros e atrofia muscular, perda parcial dos movimentos de uma das extremidades, perda de força e coordenação musculares e ausência de reflexos. Alguns animais chegam mesmo a não estar conscientes dos seus movimentos e da sua postura, condição designada por défice da capacidade proprioceptiva.

Tumores benignos das bainhas dos nervos periféricos

Os TBNP benignos são neoplasias raras no cão. Adicionalmente, em animais de grande porte, nomeadamente em equinos e bovinos, estas neoplasias são também pouco frequentes (Kameyama *et al.*, 2000; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Schöniger e Summers, 2009). Contudo, a incidência exata destes tumores é difícil de avaliar devido às semelhanças histopatológicas e imunofenóticas com outras neoplasias de células fusiformes (Gross *et al.*, 2005).

Esta neoplasia afeta maioritariamente cães adultos, com idade média entre 7.3 e 8.3 anos (Scott *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2005). Nenhuma raça está descrita como predisposta à ocorrência desta lesão no entanto, alguns autores sugerem que possa haver alguma predisposição do Fox Terrier (Scott *et al.*, 2001). As lesões surgem sob a forma de uma massa, usualmente solitária e circunscrita, de consistência variável, atingindo frequentemente 2 a 5 cm de diâmetro. Localizam-se sobretudo no tecido subcutâneo, podendo contudo expandir-se para a derme (Gross *et al.*, 2005).

Histologicamente, os TBNP caracterizam-se por um denso agregado de células de origem mesenquimatosa, com forma ovóide ou fusiforme alongada, dispostas em feixes ondulados, paliçada ou espirais concêntricas (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005). Este arranjo em espiral pode desenvolver-se em torno de vasos sanguíneos de diferentes calibres (Gross *et al.*, 2005). Este padrão morfológico do tipo Antoni A (Weiss e Goldblum, 2001a) é considerado o *hallmark* em TBNP benignos em humanos (Enzinger e Weiss, 1995). No cão, apesar de não ser tão frequente quanto no homem, esta configuração celular é muito característica destes tumores (Koestner e Higgins, 2002). Adicionalmente, a formação de corpúsculos de Verocay, descritos na medicina humana como uma dupla camada de células neoplásicas dispostas em paliçada, é extremamente rara nos animais domésticos, comparativamente com o homem (Goldschmidt e Hendrick, 2002).

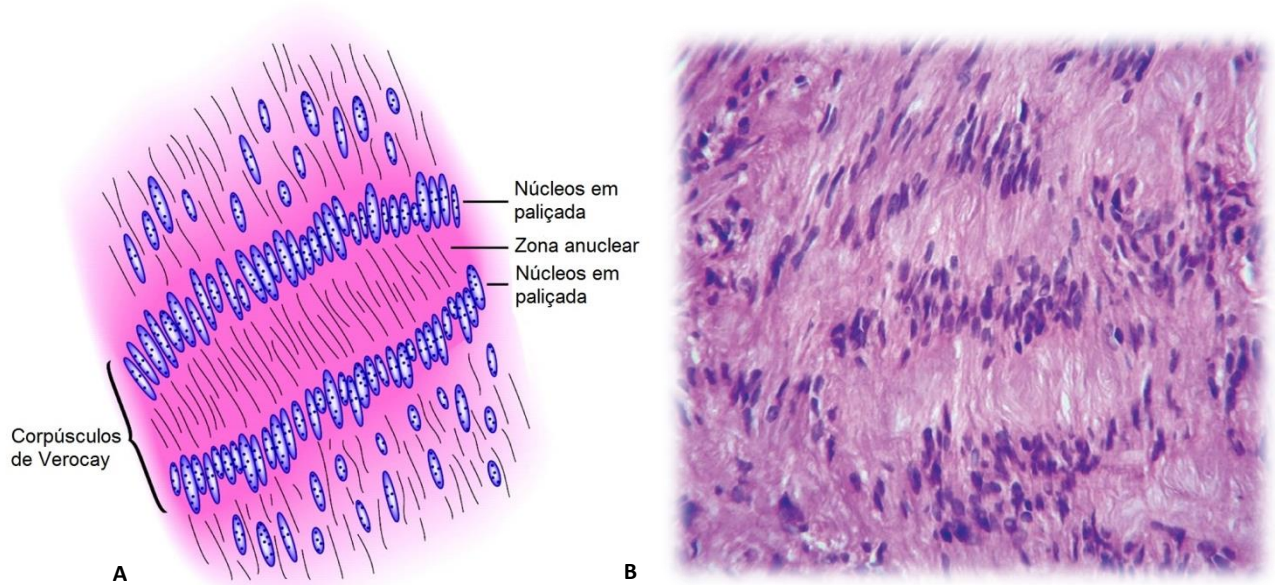


Figura 3 - Ilustração esquemática dos corpúsculos de Verocay

(Adaptado de **A:** Wippold II et al., 2007; **B:** Joshi, 2012).

Com menos frequência, podem surgir áreas de lesão contendo um reduzido número de células poligonais com pequenos núcleos hiper cromáticos, e distribuídas livremente numa matriz extracelular, denominadas, na medicina humana por padrão morfológico do tipo Antoni B (Kuwamura *et al.*, 1998; Koestner e Higgins, 2002).

O **neurofibroma** é o tumor das bainhas dos nervos periféricos de comportamento benigno mais comum, sendo diagnosticado com muita frequência na prática clínica em humanos (Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). O neurofibroma com localização cutânea é o mais comum e ocorre esporadicamente na maioria dos casos (Scheithauer *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2012), ainda que aproximadamente 10% dos casos diagnosticados estão associados com neurofibromatose de tipo 1 (NF1 ou doença von Recklinghausen's) (Huang *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2012).

A NF1 é uma doença genética autossômica dominante bastante comum, que afeta 1 em 3500 indivíduos mundialmente (Riccardi *et al.*, 1992; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Na origem desta patologia está uma mutação no gene *NF1* que, em condições normais codifica a neurofibromina, uma proteína supressora destas neoplasias cuja perda funcional resulta no desenvolvimento de neurofibromas benignos que podem progredir para a malignidade (Cichowski e Jacks, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002). O neurofibroma cutâneo é próprio da NF1, sucedendo em praticamente todos os indivíduos com a doença (Weiss e Goldblum, 2001a; Le *et al.*, 2009). Estes tumores surgem habitualmente na puberdade, e aumentam em tamanho e em número com a idade e

durante a gravidez, sugerindo a componente hormonal na progressão da neoplasia (Ferner, 2007; Lakkis e Tennekoon, 2000).

O neurofibroma cutâneo é um tumor benigno que surge sem cápsula, mas bem circunscrito numa matriz extracelular rica em fibras nervosas e de colagénio. As lesões são variavelmente compostas por células de Schwann e fibroblastos, e outros elementos locais como células perineurais, células endoteliais, linfócitos e um elevado número de mastócitos (Kleihues e Cavenee, 2000; Staser *et al.*, 2010). Apesar de ainda não estar identificada como tal, acredita-se que a célula de Schwann é a célula de origem do neurofibroma (Cichowski e Jacks, 2001; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). A existência de verdadeiros neurofibromas em animais domésticos é questionável (Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005; Ahmadi *et al.*, 2012). Dessa forma, na literatura veterinária existe apenas um estudo que relata a existência do neurofibroma plexiforme no cão (Schöniger e Summers, 2009).

O **neurofibroma plexiforme** afeta aproximadamente 30% dos indivíduos com NF1, e é considerado a característica patognomónica da doença, embora muito raramente possa ocorrer na ausência da doença (Ferner, 2007; Marocchio *et al.*, 2006). Na maior parte dos casos, o neurofibroma plexiforme é uma lesão congénita, envolvendo um ou vários fascículos nervosos, que frequentemente surgem das ramificações dos grandes nervos (Rodríguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Tal como acontece nas outras formas desta lesão e, apesar de não estar totalmente esclarecido, acredita-se que o neurofibroma plexiforme tem origem nas células de Schwann (Cichowski e Jacks, 2001; Le *et al.*, 2011; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

Do ponto de vista clínico, o neurofibroma plexiforme cutâneo é uma lesão benigna, usualmente presente desde o nascimento, que se apresenta geralmente não circunscrita. O seu padrão de crescimento involgar representa, por meio de disfunção orgânica e/ou neuronal, risco de vida para o indivíduo (Lakkis e Tennekoon, 2000; Ferner, 2007).

Habitualmente e na sua forma clássica, o diagnóstico de neurofibroma decorre sem grande dificuldade.

Na medicina veterinária, como já foi referido, os critérios para o diagnóstico do neurofibroma não estão estabelecidos. Esta lesão é classificada, conjuntamente com o schwannoma e o perineurioma como TBNP benigno (Schöniger e Summers, 2009; Ahmadi *et al.*, 2012). O facto de o comportamento biológico destas lesões ser idêntico dificulta a sua classificação. Adicionalmente, e ao contrário do que acontece no homem, a existência de verdadeiros neurofibromas em animais domésticos é discutível (Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005; Ahmadi *et al.*, 2012). Contudo, alguns autores usam a designação neurofibroma em animais, baseada no sistema de classificação em humanos

(Schöniger e Summers, 2009; Nielsen *et al.*, 2010; Fattahian *et al.*, 2012). Desta feita, a existência de variantes de neurofibroma, em diferentes espécies animais, idênticas às relatadas no homem, levam estes autores a acreditar ser possível estabelecer uma subclassificação dos TBNP benignos na medicina veterinária (Schöniger e Summers, 2009; Schöniger *et al.*, 2011).

No homem, o **schwannoma** é o segundo tumor mais comum com origem nas bainhas dos nervos periféricos. Esta lesão é responsável por aproximadamente 5% de todas as neoplasias dos tecidos moles (Huang *et al.*, 2006; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Os schwannomas com localização cutânea são pouco frequentes e normalmente envolvem a derme e o tecido subcutâneo. Tumores com localização exclusiva na derme são muito raros (Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

Macroscopicamente, os schwannomas apresentam-se sob a forma de uma lesão nodular, encapsulada e bem circunscrita, de consistência mole e usualmente solitária. Contudo, apesar de pouco comum, podem surgir múltiplas lesões associadas a diferentes quadros clínicos (Rodríguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

A neurofibromatose de tipo 2 (NF2) é uma doença hereditária autossômica dominante, na qual os indivíduos afetados desenvolvem múltiplas lesões. O schwannoma vestibular em particular, é o fenótipo da doença e afeta indivíduos mais jovens, comparativamente ao schwannoma esporádico (Gutmann *et al.*, 1999; McMenamin *et al.*, 2001).

Neuroma acústico é a designação mais comum para **schwannoma vestibular** (Propp *et al.*, 2006). Na medicina humana, o “schwannoma acústico” é a terceira denominação para este tipo de neoplasias (Ottinger *et al.*, 2009).

Embora de incidência rara, acredita-se que o schwannoma vestibular representa a maioria das neoplasias das bainhas dos nervos periféricos com localização intracraniana (Propp *et al.*, 2006).

O schwannoma vestibular é uma lesão benigna, na grande maioria dos casos de crescimento lento, que ocorre no ouvido interno dos indivíduos, em particular, no nervo auditivo, que liga o ouvido ao cérebro. Localizadas no oitavo nervo craniano, este tipo de lesões compromete as suas funções, nomeadamente a audição e o equilíbrio dos indivíduos afetados. Na condição de NF2, os indivíduos desenvolvem frequentemente o schwannoma vestibular em ambos os ouvidos.

Acredita-se que a grande responsável pela condição seja uma hiperproliferação de células de Schwann, que em condições normais envolvem e suportam as fibras nervosas. À medida que a neoplasia cresce, a pressão exercida no referido nervo do

ouvido interno resulta, na maioria das vezes, na perda de audição (Celis-Aguilar *et al.*, 2012), zumbido nos ouvidos e tonturas consequentes da perda de equilíbrio. Estes sintomas podem ver-se agravados com o crescimento da lesão, nomeadamente quando a pressão é exercida no nervo da face, causando paralisia facial no lado onde a lesão está localizada. Em casos mais extremos, e quando o tumor se torna ainda maior, acaba por pressionar estruturas mais próximas do cérebro, tornando-se um risco para a vida dos indivíduos afetados.

Na medicina veterinária, apenas está descrita a existência de um schwannoma acústico na espécie canina (Ottinger *et al.*, 2009). Todavia, o comportamento maligno associado à referida lesão difere daquele descrito no Homem, no qual é geralmente benigno (Ottinger *et al.*, 2009).

Tanto na forma esporádica, como no schwannoma vestibular, na sua base estão mutações no gene *NF2* (Gutmann *et al.*, 1997; Hitotsumatsu *et al.*, 1997; Gutmann *et al.*, 1998; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

O gene *NF2* é um gene supressor tumoral que codifica uma proteína, designada merlina, produzida no sistema nervoso, e em particular nas células de Schwann. Esta proteína tem uma elevada homologia com um grupo de moléculas que fazem a ligação entre a membrana e o citoesqueleto das células (Scherer e Gutmann, 1996; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Apesar de a sua função exata ser ainda desconhecida, acredita-se que, nas células de Schwann, a merlina possa modular a sua forma e crescimento, assim como a comunicação intercelular (Scherer e Gutmann, 1996).

A manifestação da doença resulta da perda funcional desta proteína (Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Desta feita, a regulação do crescimento e divisão celular ficam comprometidos. Particularmente, nas células de Schwann, esta disfuncionalidade favorece uma multiplicação celular rápida e descontrolada, e a formação de tumores característicos da NF2.

Na ausência de NF2, a ocorrência de múltiplos schwannomas subcutâneos é indicativo de schwannomatose (Jacoby *et al.*, 1997). Esta é uma doença genética rara, usualmente espontânea, embora menos frequentemente possa ter uma componente familiar. Todavia, e ao contrário do que acontece na NF2, mutações germinativas no gene *NF2* não são as responsáveis pela manifestação da doença (Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Os schwannomas característicos da schwannomatose são o resultado de mutações somáticas ou adquiridas em células de origem do tumor (Buckley *et al.*, 2005). A schwannomatose foi recentemente reconhecida como a terceira demonstração relevante de neurofibromatose, embora a sua etiologia permaneça por explicar. Os indivíduos com a doença desenvolvem schwannomas múltiplos, clínica e geneticamente diferentes do schwannoma vestibular, típico da NF2. Porém, a dificuldade em obter um

diagnóstico preciso de schwannomatose persiste, provavelmente devido à baixa incidência da doença (Chen *et al.*, 2013).

O schwannoma é uma neoplasia benigna com origem nas células de Schwann.

Do ponto de vista histológico, dois padrões de crescimento celular distintos podem ser observados nesta lesão. O schwannoma clássico apresenta áreas altamente celulares, onde os núcleos estão dispostos em paliçada, formando os corpúsculos de Verocay. No homem, esta disposição ordeira de células em fileira dupla é típica do padrão Antoni tipo A e está intimamente associada ao schwannoma (Joshi, 2012).

Por outro lado, o tecido Antoni B apresenta áreas de baixa densidade celular, organizadas livremente num estroma mixomatoso. A presença de células inflamatórias dispersas, em particular mastócitos, bem como de múltiplos vasos sanguíneos dilatados, são características importantes destas regiões que, muitas vezes não são mais do que degenerações de tecido Antoni A (Enzinger e Weiss, 1995; Koestner e Higgins, 2002; Joshi, 2012; Rodriguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Embora possam surgir em simultâneo, as regiões Antoni A e B aparecem geralmente bem demarcadas uma da outra e, em alguns casos, pode ser observada uma zona mista, de transição, onde as ambas as áreas se fundem (Wippold II *et al.*, 2007; Joshi, 2012).

Como já foi referido, uma grande controvérsia acerca da nomenclatura destas neoplasias permanece nos dias de hoje. Tal deve-se quer à escassez de trabalhos no âmbito dos TBNP, quer ao facto de os estudos já publicados serem bastante confusos relativamente às possíveis origens destas neoplasias.

Em medicina veterinária, o termo schwannoma é usado na clínica e refere-se a tumores em que a origem das células neoplásicas se restringe exclusivamente a células de Schwann (Hendrick *et al.*, 1998; Goldschmidt e Hendrick, 2002). Todavia, o uso deste termo é algo generalista e controverso, uma vez reconhecida a necessidade de um diagnóstico diferencial entre os TBNP e outros tumores de células fusiformes, microscopicamente muito semelhantes (Gross *et al.*, 2005). No entanto, em animais de grande porte, nomeadamente no gado, os autores classificam frequentemente estas lesões de acordo com a classificação estabelecida na medicina humana. Por essa razão, nestes casos, pode encontrar-se na literatura o termo schwannoma (Stoica *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2007; Schöniger *et al.*, 2011; Ahmadi *et al.*, 2012). O schwannoma, tal como o neurofibroma é uma neoplasia benigna das bainhas do nervo periférico. Contudo, a transformação maligna do schwannoma é, relativamente ao neurofibroma, uma ocorrência muito mais rara (Woodruff *et al.*, 1994; Kurtkaya-Yapıcıer *et al.*, 2003; Gupta e Maniker, 2007).

O híbrido neurofibroma-schwannoma foi recentemente descrito por Nielsen *et al.*, 2010 em bovinos. Os autores observaram lesões que exibiam características de ambas

as neoplasias. Todavia, na maioria dos casos foi patente o claro predomínio da componente schwannoma. Nestas regiões, ambos os padrões morfológicos Antoni A e Antoni B estavam representados, e a transição para áreas representativas de neurofibroma acontecia de forma abrupta, sendo identificadas duas áreas bem distintas (Nielsen *et al.*, 2010).

O **perineurioma** é considerado um tumor das bainhas dos nervos periféricos extremamente raro, de carácter benigno, composto exclusivamente por células neoplásicas perineurais (Macarenco *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

De acordo com a sua localização, duas formas distintas podem ser reconhecidas: intraneural e extraneural (Macarenco *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). O perineurioma intraneural é raro e afeta, em exclusivo, o nervo periférico (Macarenco *et al.*, 2007; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Por sua vez, o perineurioma extraneural surge mais frequentemente no tecido subcutâneo, embora possa também ocorrer em tecidos moles e menos frequentemente, restringir-se à derme (Robson e Calonje, 2000; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

O perineurioma extraneural é uma neoplasia da bainha dos nervos periféricos benigna e, ao contrário do neurofibroma e do schwannoma, parece não ter associação com a neurofibromatose. Esta é uma lesão normalmente bem circunscrita e sem cápsula, de consistência firme, que afeta maioritariamente adultos, embora tenha sido já descrita em crianças e cuja aparente ausência de predileção sexual parece ser debatida (Kleihues e Cavane, 2000; Macarenco *et al.*, 2007).

Do ponto de vista histológico, o perineurioma extraneural é constituído por células fusiformes alongadas, com o núcleo ondulado, envoltas por um estroma usualmente rico em colagénio, embora por vezes com uma componente mixóide (Macarenco *et al.*, 2007).

O perineurioma é composto exclusivamente por células perineurais. Contudo, e embora seja uma situação muito pontual, podem surgir células de Schwann e fibroblastos. Desta feita, o diagnóstico diferencial de outras neoplasias das bainhas dos nervos periféricos benignas, como o neurofibroma e o schwannoma torna-se imperativo. Ainda assim, a grande maioria dos casos pode ser facilmente diferenciada ao nível da morfologia. Quando não é possível, considera-se a imunohistoquímica uma ferramenta bastante útil (Macarenco *et al.*, 2007). Os perineuriomas consistem inteiramente de células perineurais diferenciadas imunoreactivas para o marcador EMA (Kleihues e Cavane, 2000).

Apesar de a sua ocorrência ser extremamente rara, há relatos da ocorrência de perineurioma intraneural em veterinária, nomeadamente em canídeos e em *Gallus gallus*

domesticus (Koestner e Higgins, 2002; Toyoda *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2006). No que diz respeito ao perineurioma extraneural, pelo que nos foi permitido saber, não existem relatos da sua ocorrência em animais domésticos (Toyoda *et al.*, 2005). Aliada ao facto de, mais uma vez, o comportamento biológico desta neoplasia ser idêntico ao dos TBNP supracitados, esta é também uma das razões pela qual uma classificação correta e definitiva deste grupo de neoplasias se tem revelado difícil.

As neoplasias benignas das bainhas dos nervos periféricos distanciam-se das suas formas malignas pela presença de uma população de células monomórficas. Adicionalmente, a presença de número considerável de figuras de mitose, bem como a invasão do tecido adjacente não são características das lesões benignas. Aliás, uma proliferação de carácter infiltrativo é muito frequentemente observada em neoplasias malignas das bainhas dos nervos periféricos (Gross *et al.*, 2005).

Tumores malignos das bainhas dos nervos periféricos

À semelhança do que acontece na forma benigna, o TBNP de carácter maligno é uma neoplasia cutânea de incidência rara no cão e também no gato (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005; Schulman *et al.*, 2009). Ainda que com menor frequência, esta é uma neoplasia que ocorre igualmente em animais de grande porte (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Todavia, e em conformidade com os seus análogos, a precisa incidência desta neoplasia é difícil de estimar devido à partilha de características histomorfológicas com outras neoplasias. Em particular, esta neoplasia mostra-se, quanto ao fenótipo, muito próxima do hemangioperiocitoma canino (Pérez *et al.*, 1996; Hendrick *et al.*, 1998; Sawamoto *et al.*, 1999; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Gross *et al.*, 2005). Por outro lado, a confirmação do diagnóstico requer uma avaliação imunohistoquímica da lesão, que não era considerada procedimento de rotina no passado, e por isso, a verdadeira incidência deste grupo de lesões é desconhecida (Bergmann *et al.*, 2009).

Do ponto de vista clínico, muitas são também as parecenças com os homólogos benignos. O TBNP maligno é uma neoplasia que surge frequentemente no tecido subcutâneo de cães adultos, predisposta à raça Golden Retriever, com uma idade média de 9 anos (Gross *et al.*, 2005). Esta lesão surge quase sempre localizada no tronco ou membros do animal, sob a forma de uma massa não encapsulada, podendo medir mais de 2 cm de diâmetro (Gross *et al.*, 2005). Embora seja uma neoplasia que acomete, na grande maioria das vezes a pele, pode surgir noutras localizações do corpo do animal (Kostov *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011a).

Histologicamente, o TBNP maligno é constituído por uma população pleomórfica de células fusiformes, dispostas em pequenos feixes entrelaçados num estroma rico em colagénio (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002). Ao contrário do que acontece nas formas benignas desta neoplasia, a disposição clássica em paliçada está usualmente ausente, sendo que grupos celulares mais densos são frequentemente observados.

Pelo facto de, independentemente do comportamento biológico, o grau de pleomorfismo dos TBNP ser variável, a diferenciação histológica baseada neste parâmetro pode tornar-se difícil (Nielsen *et al.*, 2010). No cão, este aspecto não é tão evidente. Nesta espécie, a lesão maligna compreende áreas altamente celulares, muito heterogéneas. Desta forma, e muito embora partilhem muitas características morfológicas com as formas benignas, nos TBNP malignos os padrões de crescimento celular, Antoni A e Antoni B são menos evidentes (Gross *et al.*, 2005).

No homem, o TBNP maligno cutâneo é raro, representando 2% de todas as neoplasias de células fusiformes de carácter maligno na pele (Thomas *et al.*, 2009).

A transformação maligna dos TBNP benignos foi descrita na espécie humana (Weiss e Goldblum, 2001b). O neurofibroma, e em particular o neurofibroma plexiforme, é reconhecido como sendo o principal precursor dos TBNP malignos. Esta associação é menos comum quando a localização da neoplasia é cutânea (Allison *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2009).

O TBNP maligno está fortemente associado à NF1 (Thomas *et al.*, 2009). De facto, os indivíduos com neurofibroma plexiforme associado à NF1 apresentam um risco de aproximadamente 10% de vir a desenvolver um TBNP maligno (Lakkis e Tennekoon, 2000; Ferner, 2007).

O TBNP maligno cutâneo é, ao contrário do que acontece no cão, e comparativamente ao seu homólogo com localização nos tecidos moles profundos, muito pouco comum (Thomas *et al.*, 2009). Por definição, esta é uma lesão que se localiza predominantemente na derme ou no tecido subcutâneo e, do ponto de vista clínico, apresenta um crescimento variável (Thomas *et al.*, 2009).

Histologicamente, o TBNP maligno é geralmente composto por áreas de densidade variável de células fusiformes hiper Cromáticas, envolvidas num estroma predominantemente mixóide, à semelhança do neurofibroma convencional (Thomas *et al.*, 2009).

O diagnóstico do TBNP maligno é bastante difícil e controverso, dado que estas são lesões aparentemente com diferentes origens celulares e cuja histogénese dos vários componentes permanece por esclarecer (Rodriguez *et al.*, 2012; Le *et al.*, 2011).

Como se sabe, o uso de critérios histológicos no diagnóstico dos TBNP tem vindo a limitar, se não impedir o correto diagnóstico destas lesões. Este entrave deve-se, tal como já foi referido, à baixa incidência destas neoplasias nos animais. Por outro lado, as semelhanças clínicas e histomorfológicas que apresentam agravam esta situação.

A utilização de métodos imunohistoquímicos tem sido cada vez mais frequente, facilitando o diagnóstico de muitas neoplasias de animais domésticos (Scott *et al.*, 2001). No entanto, a aplicação de técnicas imunohistoquímicas em medicina veterinária acarreta algumas limitações, nomeadamente a escassez de anticorpos específicos para os tecidos animais (Ruiz *et al.*, 2005).

A técnica de imunohistoquímica é usada no diagnóstico e em investigação em patologia humana desde há várias décadas (Ruiz *et al.*, 2005). Por essa razão, a maioria dos anticorpos específicos de marcadores celulares desenvolvidos nos últimos anos foram formulados para reconhecer antígenos humanos (Cassali *et al.*, 2001). Assim, e porque alguns anticorpos apresentam reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais, a medicina veterinária recorre aos marcadores humanos no diagnóstico clínico, bem como na investigação básica (Ruiz *et al.*, 2005).

A caracterização imunohistoquímica dos TBNP constituiu um dos objetivos do presente trabalho.

OBJETIVOS

Objetivos

A histogénese dos tumores das bainhas dos nervos periféricos em canídeos não é ainda abordada com rigor e clareza pela comunidade científico-profissional. De facto, a dificuldade em caracterizar e classificar estes tumores tem vindo a persistir, mesmo após longos anos de investigação.

O objectivo geral deste estudo foi contribuir para uma melhor e mais correta caracterização deste tipo de lesões, perspectivando uma rigorosa e uniforme caracterização deste grupo de neoplasias. Para tal, foram definidos como objetivos específicos deste trabalho:

- Caracterizar o comportamento biológico dos vários TBNP da série em estudo;
- Avaliar a imunoreatividade para os diferentes marcadores: S-100, Vimentina, GFAP, Desmina, α -actina, e NSE nas diferentes lesões;
- Avaliar e quantificar o índice de proliferação celular das células neoplásicas, com recurso ao anticorpo Ki-67.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e métodos

Material

Os tumores utilizados neste trabalho foram recebidos pelo Laboratório de Patologia Veterinária do ICBAS - UP, no período de 2000 a 2011. As amostras, provenientes de várias clínicas e hospitais veterinários de Portugal Continental, com predominância para a zona Norte, resultaram de exéreses cirúrgicas. A peça cirúrgica fazia-se acompanhar por uma ficha de requisição de análise que incluía a identificação do animal, bem como dados clínicos relevantes, se bem que muitas vezes incompletos. O material enviado para o laboratório encontrava-se já fixado em formaldeído tamponado a 10%, sendo o tempo de fixação desconhecido.

Métodos

Dados Clínicos

Os dados relativos à avaliação clínica, nomeadamente a identificação do animal (raça, sexo, idade) e a caracterização da lesão (localização, número e tamanho) foram obtidos sempre que possível com recurso às informações constantes na ficha de requisição e ao respetivo relatório histopatológico emitido. Sempre que os dados eram incompletos, foi estabelecido o contacto presencial, telefónico ou por email, com o clínico responsável pelo acompanhamento médico do animal, que nos facultou o máximo de informação disponível sobre o caso, incluindo o percurso do animal desde o diagnóstico até à data deste contacto.

Avaliação Macroscópica

Rececionadas as amostras no laboratório, procedeu-se a uma avaliação macroscópica das peças e respetiva descrição detalhada. Foram avaliados diferentes parâmetros macroscópicos, nomeadamente o tamanho, a consistência, a constituição, a cor, e os limites.

De seguida, as áreas de interesse foram seleccionadas pelo Interno de Patologia do laboratório, que efectuou pequenas secções para posterior avaliação microscópica.

Avaliação Histopatológica

As amostras foram processadas num processador automático de tecidos, modelo STP 120[®] da Micron[®] e incluídas em parafina, segundo a metodologia habitual. Foram efetuados cortes com 2µm de cada um dos tumores, para realização da coloração convencional hematoxilina-eosina, seguindo-se o procedimento:

1. Desparafinação em xilol durante 15 minutos.
2. Hidratação numa série de álcoois de concentração decrescente.
3. Lavagem em água destilada.
4. Coloração com hematoxilina durante 4 minutos.
5. Lavagem em água corrente.
6. Coloração com eosina durante 2 minutos.
7. Desidratação numa série de álcoois de concentração crescente, seguida de diafanização em xilol.
8. Montagem das lâminas com Entellan (Merck[®]) e lamela de vidro.

Os cortes foram analisados de forma independente por dois patologistas (Prof^a Fátima Gärtner e Dra. Irina Amorim) e classificados de acordo com os critérios morfológicos utilizados na medicina humana (Scheithauer *et al.*, 1999) e os esquemas de classificação para TBNP em canídeos (Koestner e Higgins, 2002). Nos casos em que as opiniões divergiram, recorreu-se a um microscópio multicabeças para se debater um resultado consensual.

O comportamento biológico das neoplasias foi determinado por meio da avaliação de alguns parâmetros vulgarmente utilizados, tais como: avaliação dos limites e zona marginal (encapsulada/parcialmente encapsulada/ sem cápsula), tipo de crescimento (expansivo/infiltrativo), morfologia (padrão de crescimento Antoni A e/ou Antoni B), atipia celular e nuclear (presença/ausência), necrose (presença/ausência) e atividade mitótica (baixa/moderada/elevada).

A proporção de cada padrão de crescimento (Antoni A ou Antoni B) foi avaliada semi-quantitativamente, de acordo com o método descrito por Gaitero *et al.*, 2008, e na seguinte escala: (-) ausência de um padrão de crescimento específico, (+) <25% do tumor apresenta o padrão de crescimento, (++) 25-50% do tumor exibe o padrão de crescimento, (+++) 50-75% do tumor exibe o padrão de crescimento, (++++) > 75% do tumor exibe o padrão de crescimento.

Estudo Imunohistoquímico

Para a análise imunohistoquímica foram realizados cortes seriados de cada um dos tumores com 2µm de espessura e colados em lâminas previamente revestidas com solução de Silane a 5% (3 – Aminopropyltriethosilane, Sigma®), de acordo com a metodologia convencional.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para o estudo IHQ e suas características.

Anticorpo	Clone	Marca	Tipo	Recuperação Antigénica	Diluição	Tempo e temperatura de diluição	Controlos Positivos
S-100	----	Dako® Denmark	Policlonal	----	1:500	ON, 4°C	Pele normal de cão/ melanoma canino
Ki-67	MIB - 1	Dako® Denmark	Monoclonal	PP em TC (pH 6)	1:500	ON, 4°C	Linfoma de alto grau
Vimentina	V9	Dako® Denmark	Monoclonal	PP em TC (pH 6)	1:500	ON, 4°C	Tecidos mesenquimatosos normais (tecido adiposo, conjuntivo, muscular)
GFAP	----	Millipore® California, USA	Policlonal	PP em TC (pH 6)	1:2000	ON, 4°C	Encéfalo de cão
Desmina	D33	Dako® Denmark	Monoclonal	PP em TC (pH 6)	1:20	ON, 4°C	Tecido muscular
α-actina	HHF35	Dako® Denmark	Monoclonal	PP em TC (pH 6)	1:300	ON, 4°C	Músculo liso
NSE	VI-H14	Imgenex® San Diego, USA	Monoclonal	PP em TC (pH 6)	1:500	On, 4°C	Porção endócrina do pâncreas (Ilhéus de Langerhans)

Legenda: PP - Panela de pressão; TC -Tampão citrato; ON – Overnight.

Procedimento

Para a realização da técnica de IHQ utilizou-se o kit **Novolink Max Polymer Detection System (1250 testes), Novocastra[®], Newcastle, UK**.

1. Desparafinação em xilol durante 10 minutos.
2. Hidratação em série de álcoois de concentração decrescente (100%, 95% e 70%).
3. Lavagem em água destilada corrente.
4. Tratamento térmico para recuperação antigénica (Quadro 1).
5. Bloqueio da peroxidase endógena com **Peroxidase Block[®]**, durante 5 minutos.
6. Duas lavagens em TBS, 2x 5 minutos.
7. Incubação em **Protein Block[®]**, durante 5 minutos em câmara húmida, à temperatura ambiente.
8. Remoção do excesso do **Protein Block[®]** e incubação no anticorpo primário, em câmara húmida, ON, a 4°C (Quadro 1).
9. Duas lavagens em TBS, 2x 5 minutos.
10. Incubação em **Post Primary Block[®]**, durante 30 minutos em câmara húmida, à temperatura ambiente.
11. Duas lavagens em TBS, durante 5 minutos.
12. Incubação em **Polymer[®]**, durante 30 minutos em câmara húmida, à temperatura ambiente.
13. Duas lavagens em TBS, durante 5 minutos.
14. Incubação numa solução de tetra-hidroclorato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB).
15. Lavagem em água corrente, durante 10 minutos.
16. Contraste dos núcleos com hematoxilina, 6 mergulhos.
17. Diferenciação em água corrente, durante 10 minutos.
18. Desidratação numa série de álcoois de concentração crescente (70%, 95% e 100%) e diafanização em xilol.
19. Montagem em Entellan (Merck[®]).

Quantificação da imunoreatividade

As preparações foram observadas num microscópio Nikon Eclipse E600, e as imagens captadas numa câmara digital Nikon Digital Sight DS-5M acoplada a este aparelho. A imunoreatividade foi também independentemente avaliada por três

observadores. Nos casos em que as opiniões divergiram, recorreu-se a um microscópio multicabeças para se obter um resultado consensual.

Foram usados controlos positivos para todos os anticorpos, de acordo com o Quadro 1. Para controlos negativos, utilizou-se o tampão TBS em substituição do anticorpo primário, no procedimento anteriormente descrito.

S-100, Vimentina, GFAP, Desmina, α -actina e NSE

Para este grupo de anticorpos, a presença de imunoreatividade foi reconhecida pela presença de marcação granular de cor castanha no citoplasma das células neoplásicas. Dois parâmetros diferentes foram considerados: a percentagem de células imunoreactivas - Extensão; e a intensidade da marcação – Intensidade (Quadro 2). Foi usado o mesmo método de avaliação e quantificação de expressão em todos os casos.

Quadro 2 – Metodologia utilizada para a avaliação da imunoreatividade dos diferentes marcadores. (Adaptado de Amorim *et al.*, 2009).

Extensão	Intensidade
0: < 5%	0 - Ausente
1: 6 - 25%	1 - Fraca
2: 26 - 50%	2 - Moderada
3: 51 - 75%	3 - Intensa
4: 76 - 100%	

Depois de avaliados todos os casos no que diz respeito às variáveis definidas, foi determinado um score, que resultou do produto entre dois parâmetros (Extensão x Intensidade), sendo o seu valor mínimo 0 (zero) e o máximo 12 (doze). Após o cálculo do produto dos valores referentes à Extensão e à Intensidade da marcação, consideraram-se os seguintes resultados: <6 - negativo; \geq 6 - positivo. Importa salientar que o nosso trabalho não é o primeiro a usar este método em tumores de canídeos (Amorim *et al.*, 2009), sendo, no entanto, pioneiro ao usá-lo neste tipo de neoplasias.

Ki-67

A reação foi considerada positiva sempre que se observou marcação no núcleo das células neoplásicas, independentemente da sua intensidade. Depois da análise cuidada de todo o tumor, foram seleccionados 10 campos com positividade mais acentuada, evitando-se áreas de necrose. Utilizando uma objetiva de grande ampliação

(400x), foram contadas 1000 células nos 10 campos de grande ampliação. O índice proliferativo foi determinado pela razão entre o número de células marcadas e o número total de células contadas, sendo este valor percentual.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao sistema SPSS[®] (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, EUA), versão 19.0.

Os valores obtidos foram considerados significativos para um valor de $p < 0,05$.

A análise dos parâmetros descritivos das variáveis categóricas foi realizada através da obtenção das frequências absolutas e relativas das categorias em estudo. Para as diferentes variáveis foi efetuada uma análise estatística descritiva, com o cálculo da média, desvio padrão, máximo, mínimo e mediana.

Para determinar a existência de possíveis associações estatisticamente significativas entre o comportamento biológico da lesão (benigno ou maligno) e os parâmetros idade, raça e sexo perspectivou-se o Teste de Independência do Qui-Quadrado (χ^2).

O teste exacto de *Fisher* foi efetuado de modo a verificar a presença de associação estatisticamente significativa entre a expressão do marcador S100 e o comportamento biológico das lesões.

Para averiguar a existência de diferenças com significado estatístico no índice de proliferação celular (Ki-67) e dimensão das lesões entre casos malignos e benignos recorreu-se ao teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. De realçar que, para efeitos de tratamento estatístico, apenas foi considerada a maior dimensão das lesões.

RESULTADOS

Resultados

Dados clínicos

No presente trabalho foram estudados 40 tumores caninos das bainhas dos nervos periféricos pertencentes a 40 animais e agrupados de acordo com o seu comportamento biológico: 17 neoplasias benignas e 23 malignas.

À data do contacto com o médico veterinário assistente, vinte animais tinham morrido, sendo que destes, sete foram eutanaziados devido a progressão ou recorrência do tumor e os restantes treze morreram por outras razões não relacionadas com a neoplasia. Fomos informados ainda de que, seis animais pertencentes à série em estudo estão vivos e aparentemente saudáveis, dos quais dois apresentavam tumor maligno.

Nos catorze casos remanescentes não nos foi possível obter estes dados, uma vez que os animais não voltaram à clínica após a cirurgia.

Os dados epidemiológicos e clínicos relevantes para a caracterização das lesões, encontram-se resumidos no quadro 3.

Na presente série não se identificou predileção por qualquer tipo de raça, se bem que foi observada um número elevado de Boxers (n=7) e Caniches (n=5).

No que diz respeito ao sexo, dos 40 animais com tumor, 25 eram machos (62.5%) e 15 eram fêmeas (37.5%).

Os tumores em estudo pertenciam maioritariamente a animais adultos (62.5%), com idades compreendidas entre os 2 e os 14 anos, apresentando uma média etária de 9.55 ± 2.57 anos.

Relativamente a parâmetros clínicos, as lesões surgiam uniformemente localizadas no troco e membros e apresentavam uma dimensão média de 4.29 ± 2.84 cm. O tratamento estatístico destes dados revelou uma associação estatisticamente significativa entre a dimensão das lesões e o comportamento biológico dos tumores ($p < 0,05$). Os tumores malignos apresentavam um tamanho claramente superior, comparativamente com os benignos.

Quadro 3 - Dados epidemiológicos e clínicos dos 40 animais incluídos na amostra.

Caso Número	Comp. Biológico	Raça	Idade (a)	Sexo	Localização da lesão	Dimensão (cm)	Informação clínica Follow-up
1	M	Perdigueiro Português	9	♂	T	8X8	Eutanasiado 1 mês depois devido à progressão da neoplasia
2	M	São Bernardo	10	♀	m	10X10	Eutanasiado devido à neoplasia (progressão ou recidiva)
3	M	Pastor Alemão	4	♂	T	2,5X2x1,3	Morte (Outras causas)
4	M	SRD	12	♂	T	4,3X3x2,5	D
5	M	Perdigueiro Português	11	♂	T	3X3x3	D
6	M	Boxer	7	♀	T	6,5X6x1,7	Morte (Outras causas)
7	M	SRD	7	♂	T	3X3	Eutanasiado 3 meses depois devido à progressão da neoplasia
8	M	SRD	12	♀	T	14X11x8	Eutanasiado 17 meses depois devido à recorrência da neoplasia
9	M	SRD	9	♂	m	2,5X2	Aparentemente saudável
10	M	Boxer	8	♂	m	D	Morte (Outras causas)
11	M	SRD	12	♂	m	3X2x1,5	D
12	M	Husky Siberiano	7	♂	T	5X5	Morte (Outras causas)
13	M	Husky Siberiano	13	♀	m	4,5X4x3	D
14	M	Labrador Retriever	2	♂	T	3X3x1,8	Aparentemente saudável
15	M	SRD	12	♀	T	10,5X8x6	Eutanasiado 36 meses depois devido à recorrência da neoplasia
16	M	Boxer	13	♂	T	2X2x1,5	Morte (Outras causas)
17	M	Samoyedo	8	♀	m	8X6x1,5	Eutanasiado 3 meses depois devido à recorrência da neoplasia
18	M	Boxer	7	♂	m	4,5X3,5x2,5	Morte (Outras causas)
19	M	Dálmata	10	♀	m	4X2,5x2	D
20	M	Boxer	8	♀	m	4X2x1	D
21	M	Perdigueiro Português	10	♀	m	2,5X2x1,5	Morte (Outras causas)
22	M	Whippet	12	♂	m	9X6	Morte (Outras causas)
23	M	SRD	8	♀	m	4,3x2,7x2,2	D
24	B	Schnauzer Miniatura	13	♂	T	2,5X2,5	Aparentemente saudável
25	B	SRD	12	♀	m	4X3,5x2	D
26	B	SRD	9	♂	D	2X2	Eutanasiado 3 meses depois devido à progressão da neoplasia
27	B	Caniche	9	♂	D	3X2,5	Aparentemente saudável
28	B	X Rottweiler	8	♂	D	D	D
29	B	Pitbull	7	♂	m	3X3	D
30	B	Caniche	13	♀	T	1X1	Aparentemente saudável
31	B	Brittany Spaniel	8	♂	m	5X3,5x2,5	Aparentemente saudável
32	B	SRD	8	♂	m	4X2,8x1,5	D
33	B	Caniche	9	♂	T	4,5X4,5x4	D
34	B	SRD	10	♀	m	2X1x1	Morte (Outras causas)
35	B	Boxer	10	♂	T	2X2	Morte (Outras causas)
36	B	Pastor Alemão	14	♀	T	4X2x3,7	D
37	B	Caniche	13	♂	m	1,2X1,2	Morte (Outras causas)
38	B	Boxer	9	♂	T	2X1,5x1	Morte (Outras causas)
39	B	Caniche	10	♂	D	2,5X2,5	Morte (Outras causas)
40	B	Pastor Alemão	9	♀	m	2,2X2x1,5	D

Legenda: **M** - maligno; **B** - benigno; **SRD** - Sem Raça Definida; **a** - anos; ♂ - macho; ♀ - fêmea; **cm** - centímetros; **m** - membros; **T** - tronco; **D** – Desconhecido.

Avaliação Histológica

Histologicamente, todas as lesões são genericamente constituídas por proliferação neoplásica de células mesenquimatosas de densidade variável, dispostas em paliçada ou em novelos e suportadas por matriz extracelular, ora laxa ora densa. As células neoplásicas são fusiformes a estreladas, exibindo núcleos alongados a ovóides, por vezes com um ou mais nucléolos evidentes e citoplasma acidófilo de limites irregulares e pouco definidos.

No que diz respeito ao padrão morfológico das lesões, os dois tipos de padrão de crescimento (Antoni A/Antoni B) foram identificados na generalidade da amostra (26/40). Em todos os casos foram observadas áreas altamente celulares, dispostas em paliçada ou em espiral, onde núcleos redondos e escuros se apresentavam de forma alongada a fusiforme, de forma análoga ao padrão morfológico Antoni A, no Homem. Observou-se este padrão morfológico em exclusivo em 14 casos da nossa amostra (Figura 4).

Também foram observadas áreas de densidade celular mais baixa, nas quais as células tendem a surgir de forma mais difusa e dispostas aleatoriamente na matriz de colagénio, assemelhando-se ao denominado padrão Antoni B, na medicina humana (Figura 5). Contudo, nenhuma das lesões analisadas apresentava exclusivamente este padrão de crescimento.

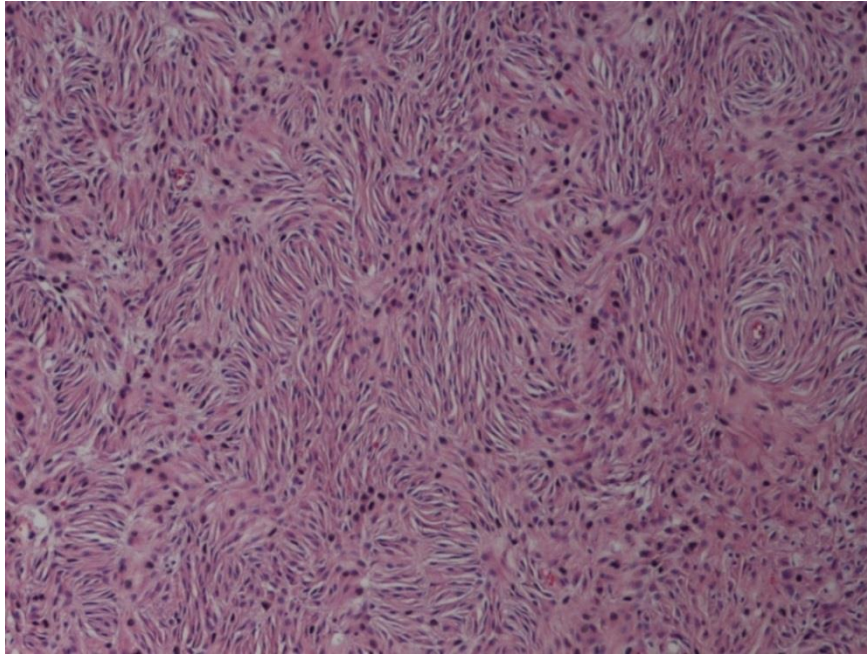


Figura 4 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 31. H&E: 100x. Na figura observa-se uma proliferação de células neoplásicas de origem mesenquimatosa, dispostas em feixes ondulados, em paliçada ou em espirais concêntricas, característica do padrão de crescimento Antoni A.

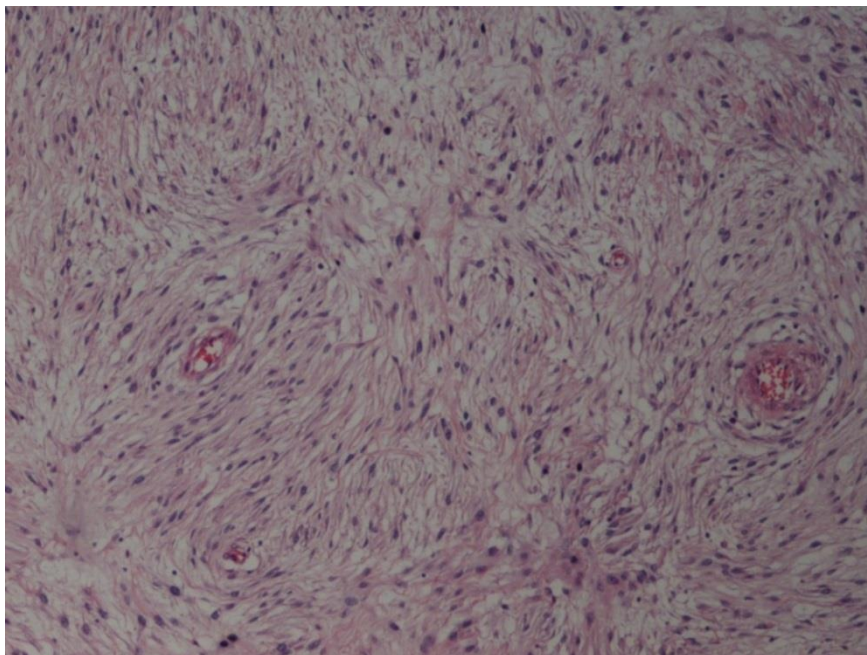


Figura 5 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 8. H&E: 100x. Na figura observa-se uma proliferação de células neoplásicas de origem mesenquimatosa, dispostas em feixes multidireccionais, por entre matriz extracelular laxa, característica do padrão de crescimento Antoni B.

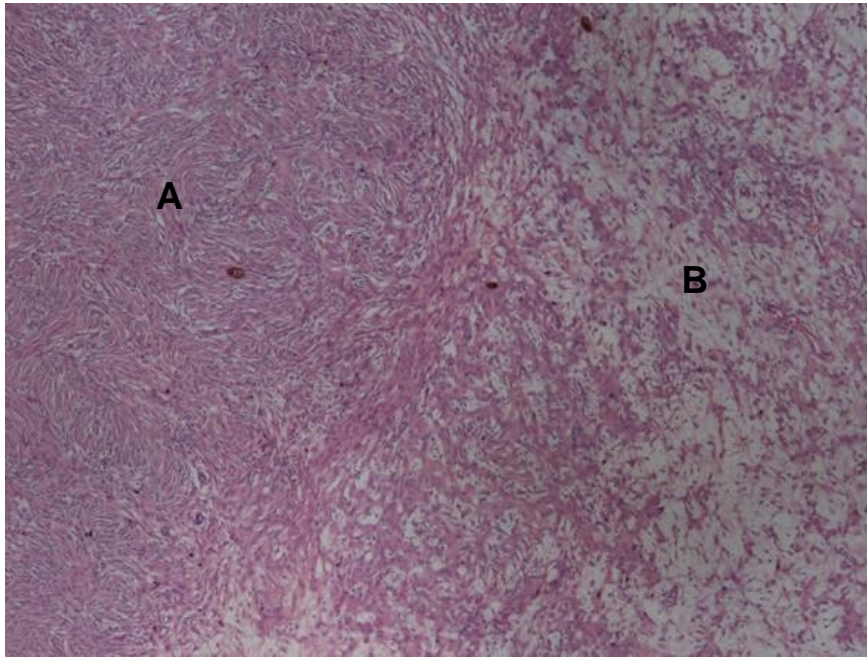


Figura 6 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 15. H&E: 40x. Na figura observa-se uma proliferação de células neoplásicas de origem mesenquimatosa, adoptando ambos os padrões histológicos descritos nos TBNP (A: Antoni A e B: Antoni B).

Avaliação Imunohistoquímica

Os resultados da avaliação IHQ encontram-se resumidos no Quadro 4.

Quadro 4 - Resultados histológicos e imunohistoquímicos obtidos com os diferentes anticorpos.

Caso Número	Comp. Biológico	Padrão histológico		Score S-100	Score Vimentina	Score GFAP	Score Desmina	Score α -actina	Score NSE	IP Ki-67 (%)
		Ant. A	Ant. B							
1	M	+++	+	6	12	12	4	2	3	38,9
2	M	++++	-	4	12	8	6	1	6	62,6
3	M	+++	+	8	12	4	8	0	3	68,2
4	M	++++	-	8	8	4	4	12	8	18,6
5	M	+++	+	8	8	12	8	2	12	38,7
6	M	+++	+	9	8	9	4	1	8	21,4
7	M	++++	-	4	12	12	8	1	6	42,4
8	M	+	+++	6	8	8	8	0	12	80,9
9	M	++++	-	8	8	12	9	0	12	70,9
10	M	+++	+	4	3	12	9	1	8	67,2
11	M	+++	+	9	8	8	6	0	4	54
12	M	++	++	3	4	12	8	0	6	6,1
13	M	++	++	1	8	6	6	0	9	14,1
14	M	++	++	4	12	4	4	0	12	23,5
15	M	++	++	4	8	8	6	0	6	6,4
16	M	++++	-	6	8	12	8	1	8	25,9
17	M	+++	+	8	8	12	4	4	6	63,1
18	M	+++	+	6	8	12	3	1	6	26,2
19	M	++++	-	8	8	8	6	1	8	10,2
20	M	+++	+	9	12	8	6	0	8	2,8
21	M	++++	-	9	8	12	8	0	12	17
22	M	+++	+	9	6	6	8	9	8	28,6
23	M	++	++	8	12	6	8	3	6	27,2
24	B	+++	+	1	12	12	6	0	8	60,8
25	B	+++	+	4	12	12	6	0	3	15,8
26	B	+++	+	4	8	9	8	4	4	35,3
27	B	+++	+	4	6	8	6	1	6	36,3
28	B	+++	+	8	12	12	6	0	9	4,3
29	B	++++	-	4	12	6	9	0	6	21
30	B	++++	-	4	6	9	4	0	4	5,6
31	B	+++	+	4	6	6	8	0	4	6,8
32	B	++++	-	6	12	9	6	2	6	1,8
33	B	++++	-	2	8	8	8	6	4	32
34	B	++++	-	4	12	9	3	0	9	3,8
35	B	++++	-	4	8	8	8	6	8	28,2
36	B	+++	+	8	12	8	6	1	8	14,1
37	B	++++	-	8	12	9	3	1	8	1,2
38	B	+++	+	3	12	8	6	2	8	2,8
39	B	+++	+	6	8	8	8	0	8	6,2
40	B	+++	+	9	12	9	6	3	6	0,6

Legenda: **M** - maligno, **B** - Benigno, **Ant. A** - Antoni A, **Ant. B** - Antoni B, **IP** - Índice de proliferação, **a vermelho** - casos positivos (Score ≥ 6), **a azul** - casos negativos (Score <6).

S-100

A expressão de S-100 foi observada em pouco mais de metade dos tumores (22 em 40), incluindo 35% dos TBNP benignos e 70% dos TBNP malignos.

Curiosamente, as lesões benignas mostraram uma marcação mais fraca, quando comparada com as lesões malignas incluídas na amostra.

Adicionalmente, uma associação significativamente estatística foi obtida entre a expressão de S-100 e o comportamento biológico das lesões ($p < 0,05$). As lesões malignas mostraram ser mais positivas para este marcador, comparativamente com as benignas.

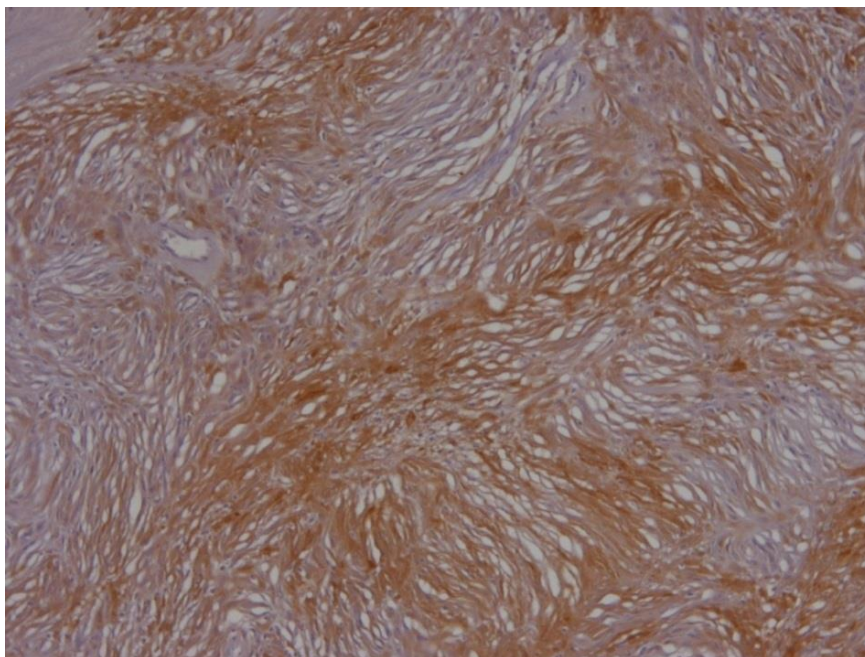


Figura 7 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 6. IHQ: S-100, 100x. Observe-se zonas multifocais de intensa marcação para o anticorpo anti-S100 (Score = 9).

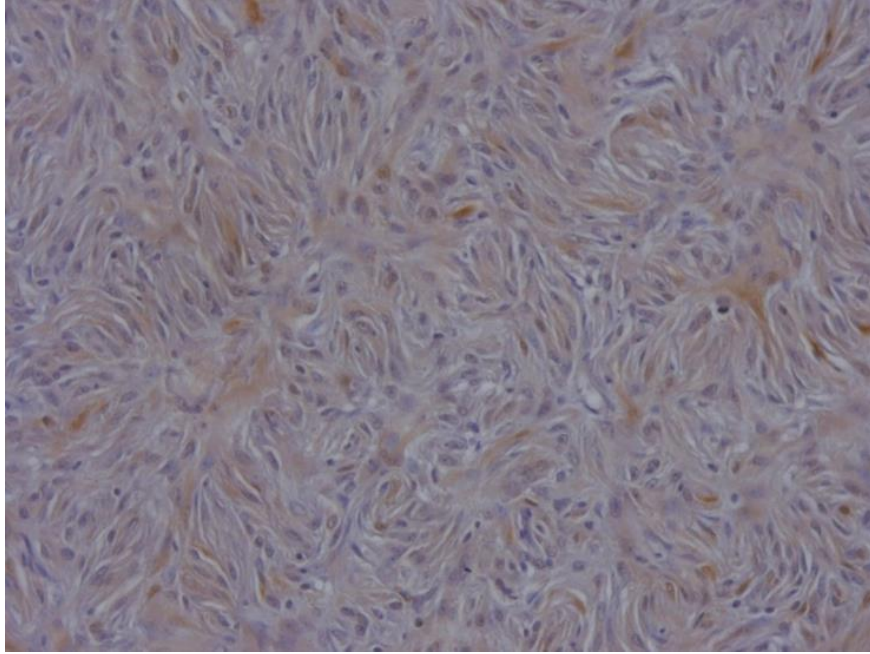


Figura 8 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 31. IHQ: S-100, 200x. A maioria das células neoplásicas exibe marcação, ainda que fraca, para o anticorpo anti-S100 (Score = 4).

Ki-67

O valor médio do índice de proliferação da amostra ($n = 40$) foi de 27,29% (DP 23,02%), variando entre 0,6% e 80,9% (Quadro 4).

Independentemente do seu comportamento biológico, todas as lesões expressavam Ki-67. No entanto, a análise estatística confirmou existir uma importante associação entre o índice de proliferação e o comportamento biológico das neoplasias ($p < 0,05$). Os casos malignos têm um índice de proliferação significativamente mais elevado, comparativamente com os benignos.

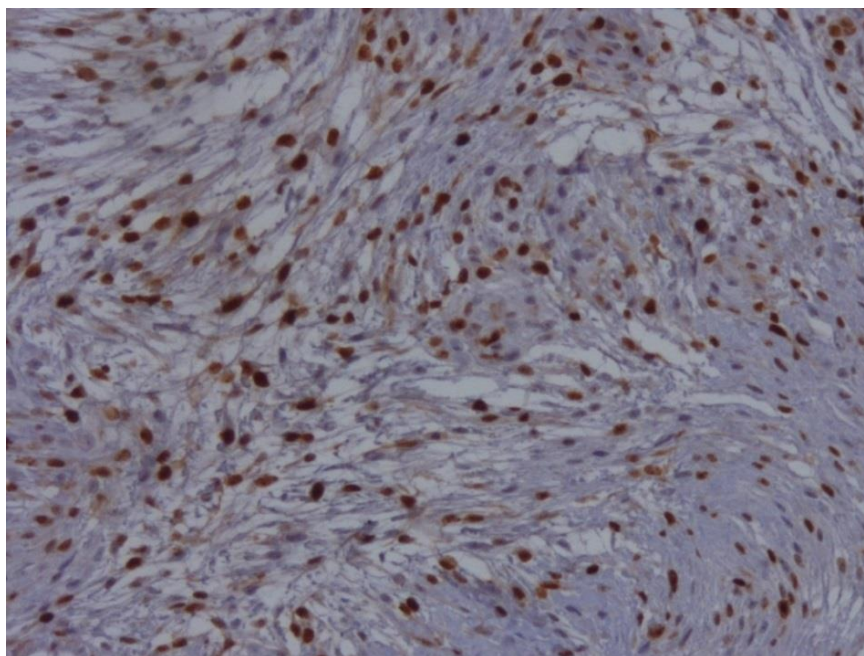


Figura 9 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 8. IHQ: Ki-67, 200x. Lesão exibindo elevado IP, aqui representado pela marcação nuclear das células neoplásicas para o anticorpo anti-Ki-67 (IP = 80,9%).

Vimentina

Em todos os casos da amostra, a marcação da vimentina revelou-se consistente em mais de 75% das células neoplásicas, sendo que não se observou diferença relativamente ao comportamento biológico das lesões. A grande maioria dos tumores (38 em 40) foi positivo para este marcador, com um score ≥ 6 . Contudo, é interessante salientar que uma diminuição na intensidade foi observada nos casos malignos, quando comparados com os benignos.

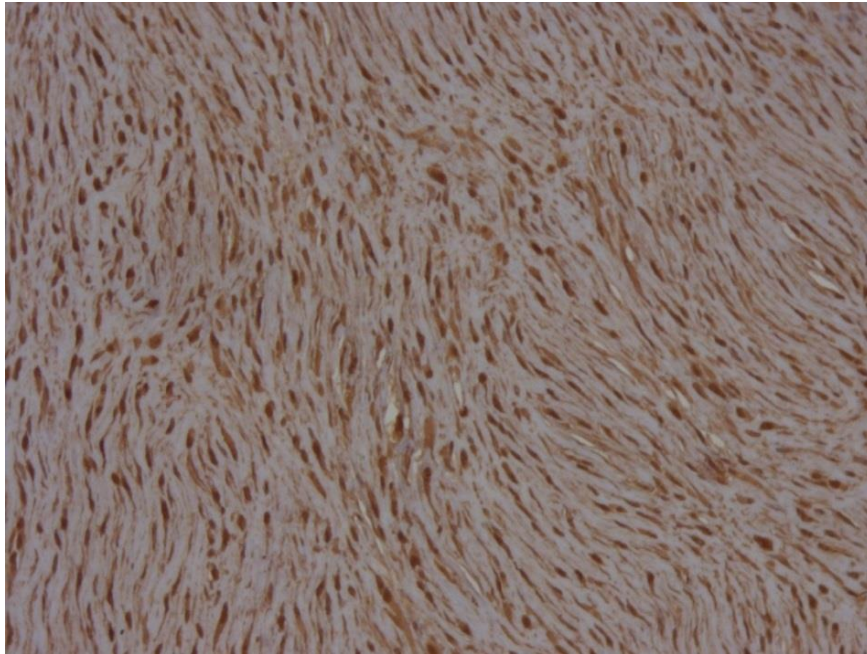


Figura 10 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 28. IHQ: Vimentina, 200x. Notar a forte imunoreatividade para o anticorpo anti-Vimentina (Score = 12).

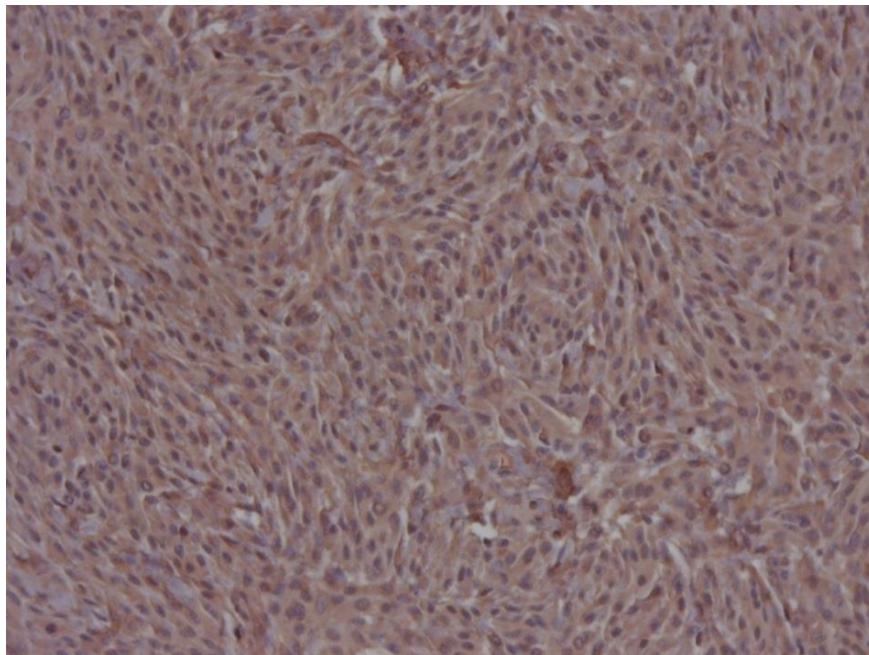


Figura 11 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 20. IHQ: Vimentina, 200x. De salientar a intensidade de marcação mais fraca comparativamente ao caso benigno anterior (Score = 12).

GFAP

Foi observada marcação para a GFAP em 37 das 40 lesões avaliadas. Todas as lesões benignas revelaram positividade para esta proteína. Nas neoplasias malignas, foi observada imunoreatividade em 20 dos 23 casos.

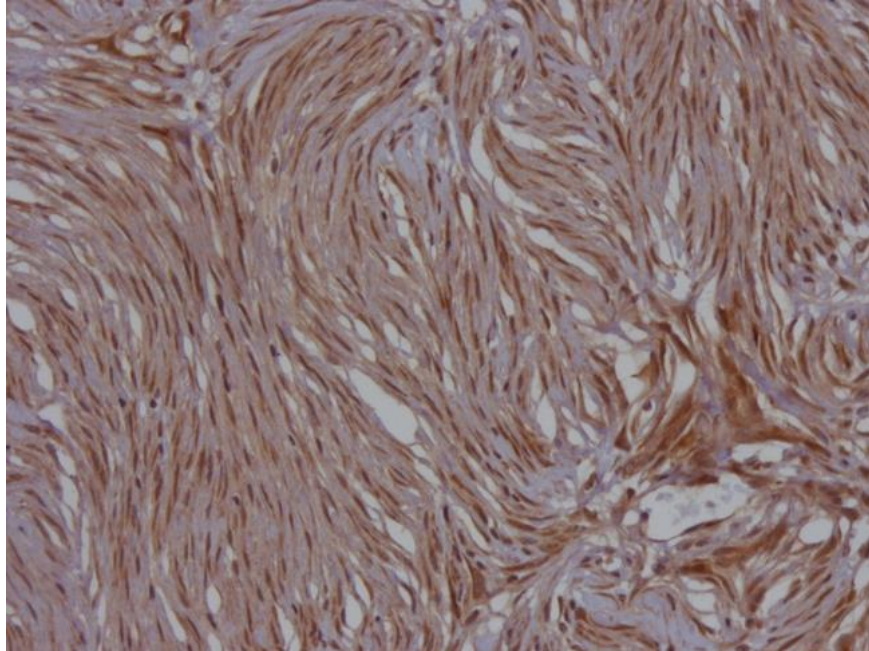


Figura 12 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 12. IHQ: GFAP, 200x. A maioria das células neoplásicas exibem forte imunomarcção para o anticorpo anti-GFAP (Score = 12).

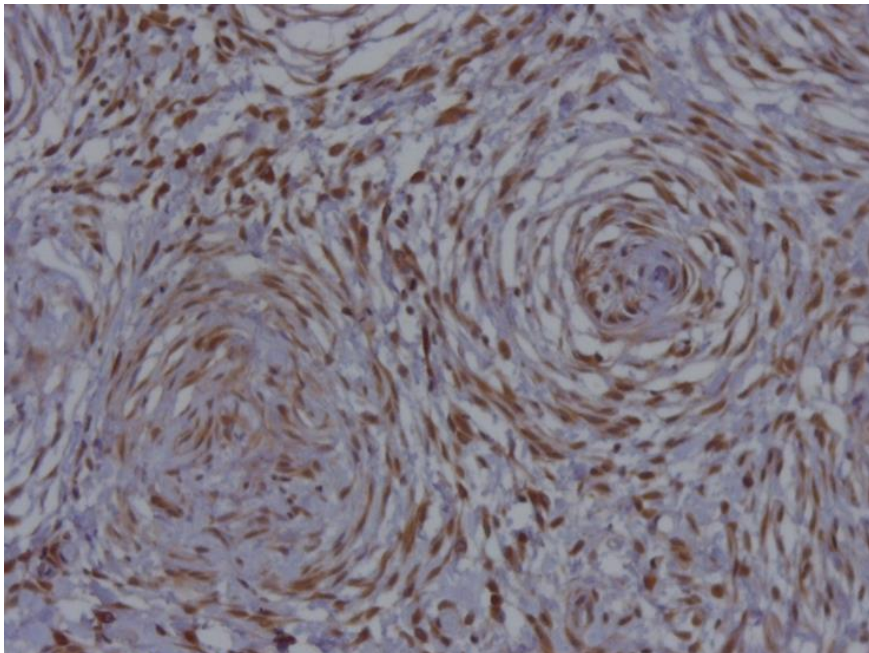


Figura 13 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 38. IHQ: GFAP, 200x. Observe-se a imunopositividade para o anticorpo anti-GFAP, aqui afetando algumas zonas Antoni A (Score = 8).

Desmina

O padrão da imunoreatividade da desmina foi surpreendente. Independentemente do seu comportamento biológico, a maioria das lesões mostrou ser positiva para a expressão deste marcador (31 em 40).

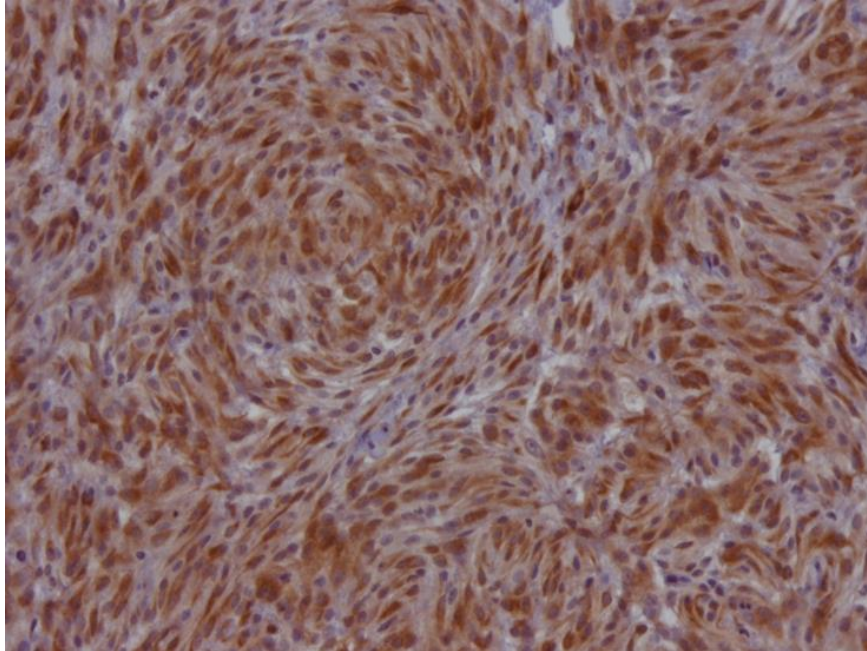


Figura 14 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 10. IHQ: Desmina, 200x. Observe-se zona lesional apresentando forte imunoreatividade para o anticorpo anti-Desmina. (Score = 9)

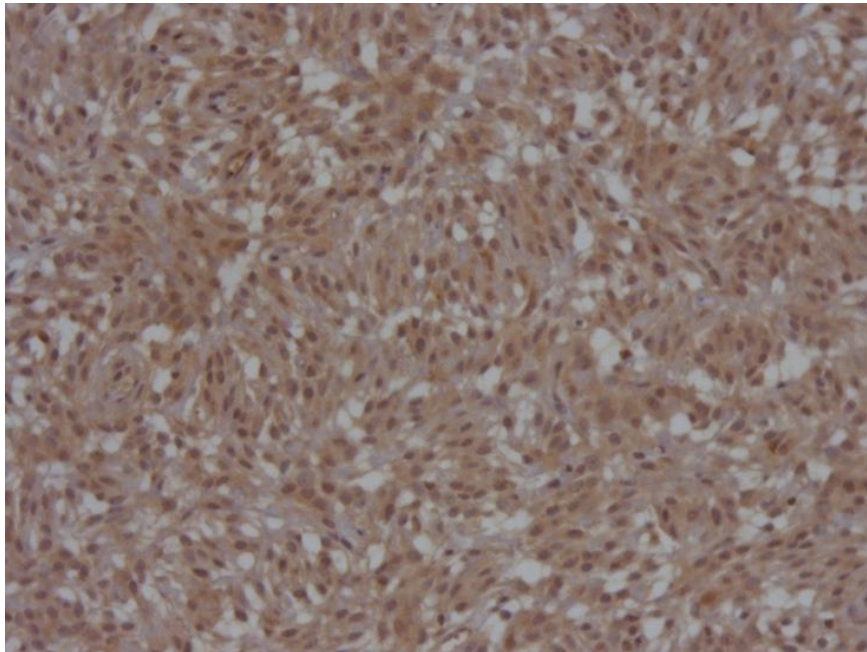


Figura 15 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 39. IHQ: Desmina, 200x. Grande parte das células neoplásicas exibem imunomarcção moderada para o anticorpo anti-desmina (Score = 8).

α -actina

Imunoreatividade para a α -actina foi observada em apenas 4 das 40 lesões analisadas.

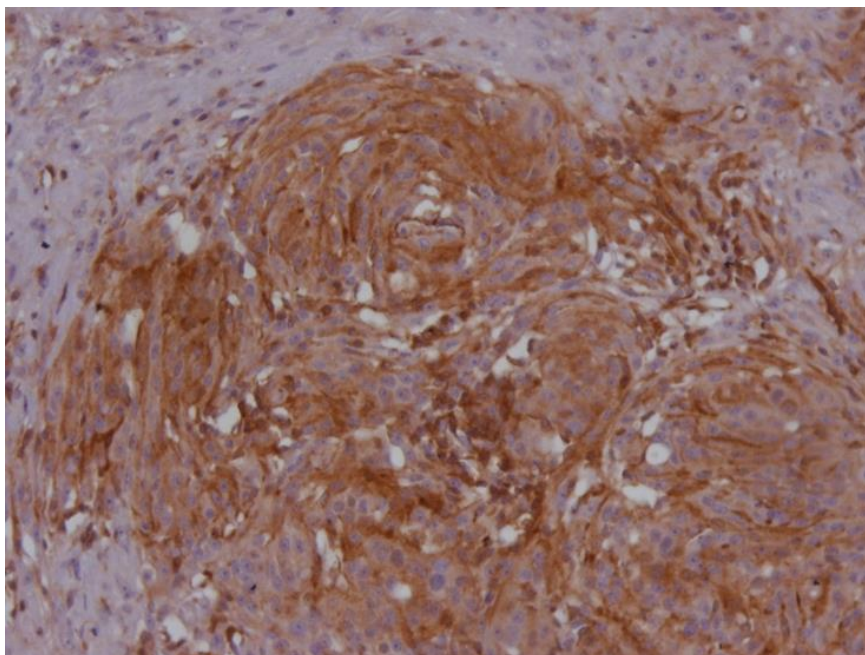


Figura 16 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 22. IHQ: α -actina, 200x. A maioria das células neoplásicas apresenta marcação moderada a forte para o anticorpo anti- α -actina (Score = 9).

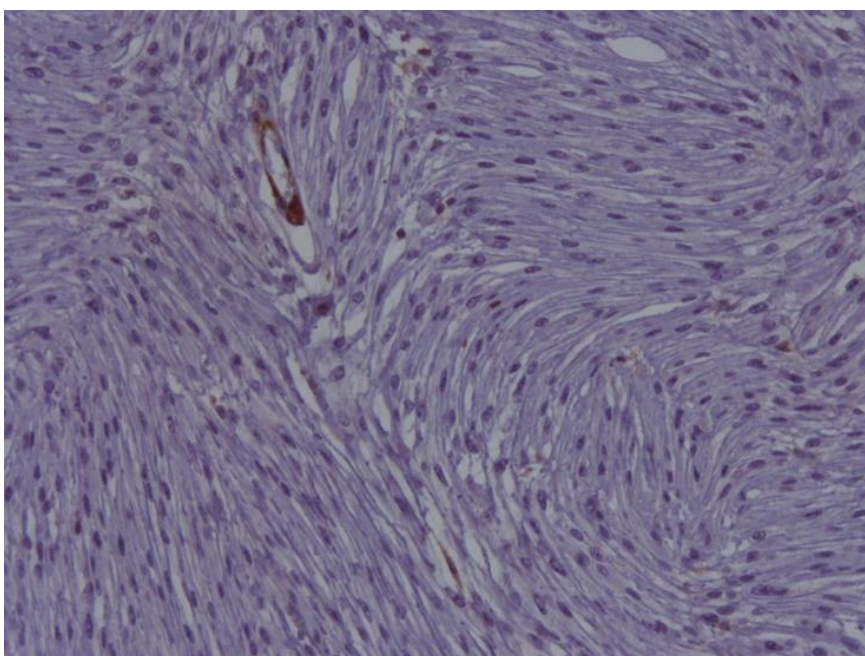


Figura 17 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 8. IHQ: α -actina, 200x. Notar a ausência de imunopositividade para o anticorpo anti- α -actina na totalidade das células neoplásicas (Score = 0). Observa-se marcação de algumas células inflamatórias dispersas pela lesão e da parede de um vaso (controle interno).

NSE

A expressão da NSE foi observada em 32 das 40 lesões estudadas.

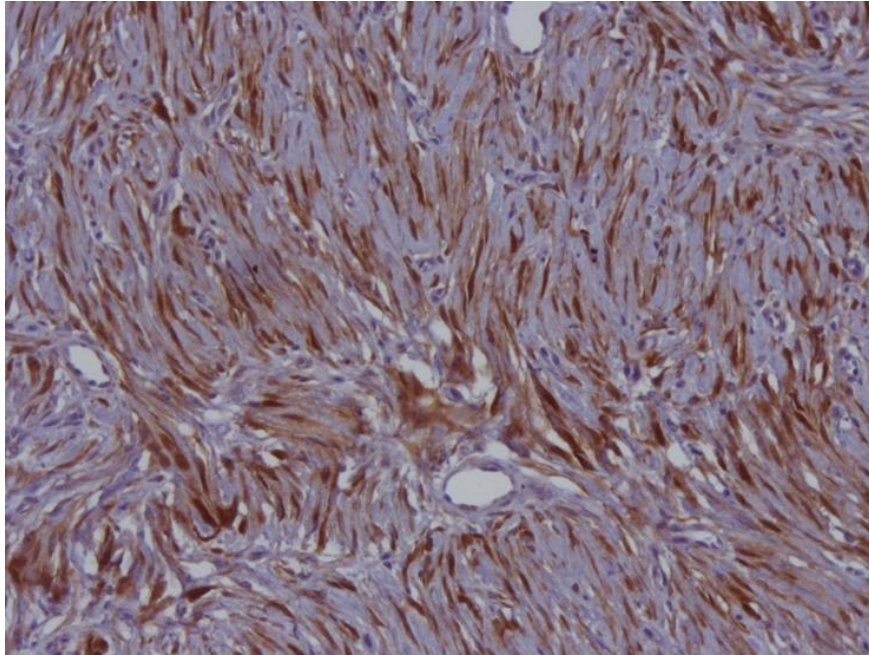


Figura 18 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 34. IHQ: NSE, 200x. Notar detalhe lesional em cujas células neoplásicas exibem intensa marcação para o anticorpo anti-NSE (Score = 9).

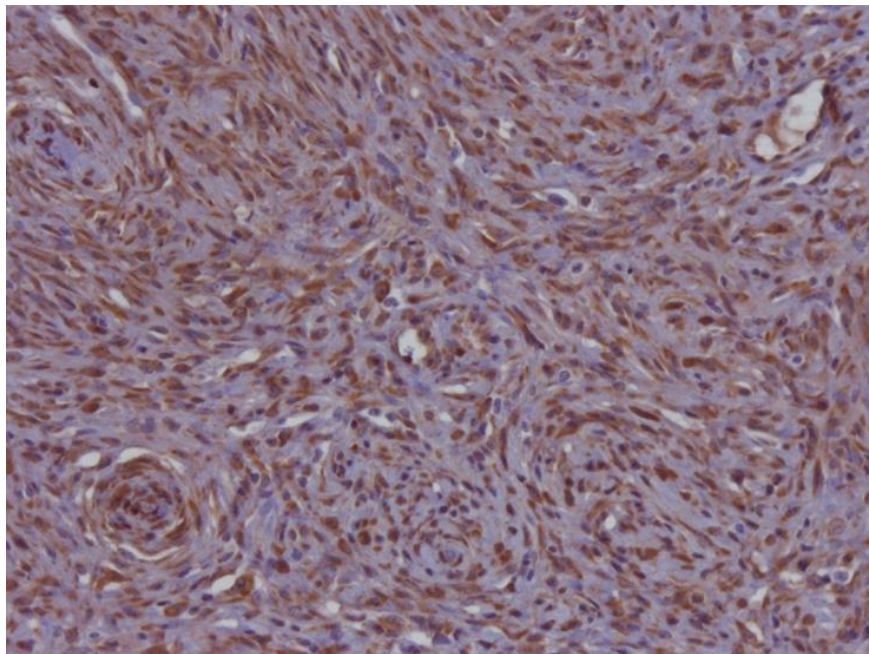


Figura 19 - Cão; pele; TBNP, Caso nº 5. IHQ: NSE, 200x. Observe-se a forte imunopositividade para o anticorpo anti-NSE na maioria das células neoplásicas (Score = 12).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Discussão dos Resultados

Os TBNP são neoplasias cutâneas de origem mesenquimatosa e pertencem a um grupo muito heterogêneo de neoplasias que podem ter origem nas células de Schwann, células perineurais e fibroblastos (Koestner e Higgins, 2002). Este tipo de tumores ocorre tanto no Homem como no cão (Kleihues e Cavaneer, 2000).

Na veterinária as semelhanças clínicas e morfológicas das lesões que compõem este grupo de neoplasias torna a classificação histopatológica dos TBNP bastante difícil e controversa. Este obstáculo deve-se, provavelmente à relativa baixa incidência de TBNP nos canídeos, portanto à falta de estudos relacionados com este grupo de neoplasias (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005). Assim, são genericamente designados de Tumores das Bainhas dos Nervos Periféricos. No que diz respeito ao comportamento biológico, os TBNP são divididos em duas categorias: tumores benignos e tumores malignos (Hendrick *et al.*, 1998; Koestner *et al.*, 1999; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005).

No presente trabalho foram estudados 40 TBNP de cães, agrupados de acordo com o seu comportamento biológico: 17 neoplasias benignas e 23 malignas.

De acordo com a literatura, os TBNP tendem a aparecer principalmente em cães na idade adulta (Scott *et al.*, 2001; Goldschmidt e Hendrick, 2002; Koestner e Higgins, 2002; Gross *et al.*, 2005; Gaitero *et al.*, 2008). Os nossos resultados corroboram esta informação; as lesões avaliadas pertenciam maioritariamente a animais com idade superior a 6 anos.

Apesar de alguns autores sugerirem a possível existência de predisposição racial para Fox Terrier (Scott *et al.*, 2001), os nossos resultados enfatizam trabalhos anteriores, nos quais não foi identificada qualquer predileção racial (Gross *et al.*, 2005; Gaitero *et al.*, 2008).

Cada vez mais, o cão está presente em muitos lares, constituindo uma companhia para muitas pessoas. No presente estudo constatou-se um número elevado de caniches e boxers, provavelmente devido à popularidade destas raças na localização geográfica em estudo. O caniche, talvez pela sua dimensão e comportamento dócil e protetor, é uma das raças mais escolhidas pois facilmente se adapta a espaços exíguos decorrentes das pequenas habitações citadinas. Da nossa experiência, o boxer é uma raça com muita tendência para o desenvolvimento de neoplasias.

Relativamente ao sexo dos animais, a nossa amostra é constituída por 25 machos (62,5%) e 15 fêmeas (37,5%). Na medicina veterinária, não foi ainda estabelecida qualquer relação com o género, ao contrário do que acontece na medicina humana, onde

os TBNP malignos tendem a ocorrer com mais frequência em mulheres (Scheithauer *et al.*, 1999).

No que diz respeito aos parâmetros clínicos, as lesões surgiram uniformemente localizadas no tronco (42,5%) e membros (47,5%) dos animais, reforçando estudos anteriores que mencionam uma maior incidência destes tumores nesta localização (Scott *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2005; Gaitero *et al.*, 2008). Estas lesões apresentaram uma dimensão média de $4,29 \pm 2,84$ cm. O tratamento estatístico destes dados revelou uma associação estatisticamente significativa entre a dimensão das lesões e o comportamento biológico dos tumores ($p < 0,05$). Os tumores malignos apresentavam um tamanho claramente superior, comparativamente com os benignos.

Paralelamente, foi efetuado um estudo retrospectivo dos casos abrangidos na nossa série.

Dos 40 animais incluídos, 20 morreram. Destes, 7 animais foram eutanaziados por motivos relacionados com a neoplasia: 3 devido a recorrência local, outros 3 devido à sua progressão e o restante por razão não especificada pelo médico veterinário responsável. Sabemos, no entanto, que na totalidade dos casos em que a neoplasia recorreu, o tempo médio aproximado entre o diagnóstico e o aparecimento da recidiva foi de 19 meses e, nos casos em que foi registada progressão fatal da doença, este período médio foi de 2 meses. É importante ressaltar que, em todos os casos cuja causa de morte foi identificada, esta foi diagnosticada pelo clínico que acompanhava o animal, não tendo sido efetuada qualquer confirmação da nossa parte. Os animais vivos e aparentemente livres de doença continuam sob monitorização do clínico responsável.

É também importante realçar a grande quantidade de casos cujo *follow-up* foi impossível de ser realizado. Tal facto deveu-se a vários motivos, nomeadamente, recusa por parte do corpo clínico em ceder os dados, ausência de registos clínicos que permitissem o correto seguimento, e o facto de os proprietários e respetivos animais não voltarem à clínica.

Contudo, apesar de os dados de *follow-up* aqui revistos serem pouco numerosos e conclusivos, este estudo é pioneiro na análise destes parâmetros. Estudos futuros, recorrendo a amostras mais representativas e a períodos de *follow-up* mais longos, serão necessários para determinar a real importância desta informação, em termos de diagnóstico e prognóstico destes animais.

A classificação histológica dos TBNP tem-se revelado uma tarefa bastante árdua e vastamente debatida. Devido à inespecificidade dos anticorpos comumente usados, o painel imunohistoquímico que auxilia o diagnóstico destas neoplasias não é esclarecedor.

Por esta razão, não existe um painel de marcadores imunohistoquímicos perfeitamente definido para o diagnóstico dos TBNP nos canídeos (Koestner e Higgins, 2002).

Em medicina veterinária, o termo schwannoma refere-se a tumores cuja origem das células neoplásicas se restringe exclusivamente a células de Schwann (Hendrick *et al.*, 1998; Goldschmidt e Hendrick, 2002). Embora da sua constituição façam parte outros elementos celulares, acredita-se que é nestas que está a origem do neurofibroma. (Kleihues e Cavaneer, 2000; Cichowski e Jacks, 2001; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013).

Na nossa série, no que diz respeito ao padrão morfológico das lesões, ambas as regiões Antoni A e Antoni B foram identificadas na generalidade da amostra, muito embora em proporções variáveis. De facto, a presença dos típicos e clássicos padrões histológicos de Antoni A e Antoni B em lesões humanas, não são tão claramente identificáveis nos TBNP de canídeos (Stoica *et al.*, 2001). Mesmo assim, em todos os casos foram observadas áreas com elevada celularidade, dispostas em paliçada ou em espiral, onde núcleos redondos e hipercromáticos se apresentavam de forma alongada a fusiforme, de forma idêntica ao padrão morfológico Antoni A do Homem, evidenciando o domínio da componente schwannoma. Este padrão morfológico em exclusivo foi identificado em 35% dos casos. Foram também observadas áreas de menor densidade celular, nas quais as células se dispõem de forma difusa, aleatória ou desorganizada na matriz de colagénio, assemelhando-se ao denominado padrão Antoni B, na medicina humana. Contudo, nenhuma das lesões analisadas apresentou exclusivamente este padrão de crescimento.

O híbrido neurofibroma-schwannoma foi descrito no homem (Feany *et al.*, 1998), no cão (Schöniger e Summers, 2009), no gato (Schulman *et al.*, 2009) e no gado bovino (Tanimoto e Ohtsuki, 1992; Nielsen *et al.*, 2010). No estudo que visou estabelecer uma classificação simples e uniforme dos TBNP em bovinos, Nielsen *et al.*, 2010 sugerem que os dois tipos de neoplasias podem estar intimamente relacionadas. Desta feita, a diferenciação destas duas entidades é de extrema importância. Aproximadamente 10% dos neurofibromas cutâneos diagnosticados no homem estão associados à NF1 (Huang *et al.*, 2006; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Adicionalmente, alguns pacientes com NF1 desenvolvem TBNP malignos, sendo que o neurofibroma é reconhecido como sendo o seu principal precursor, enfatizando, por essa razão, a necessidade de um diagnóstico mais concreto de schwannoma ou neurofibroma.

O **antigénio S100** é uma proteína ácida que identifica várias células do tecido nervoso, incluindo as células de Schwann, sendo que a maioria dos TBNP caninos expressa esta molécula (Koestner *et al.*, 1999; Koestner e Higgins, 2002; Chijiwa *et al.*, 2004). O anticorpo anti-S100 é a primeira escolha para o diagnóstico imunohistoquímico

de schwannomas e neurofibromas no homem (Fine *et al.*, 2004; Ghilusi *et al.*, 2009). Também nos bovinos, e provavelmente porque o schwannoma neste animal apresenta muitas semelhanças histológicas com o do homem, a proteína S100 é o marcador imunohistoquímico mais amplamente utilizado para o diagnóstico de schwannoma e neurofibroma (Nielsen *et al.*, 2010).

Na nossa série, apenas 55% de todas as lesões se mostraram positivas para o anticorpo anti-S100. Tal como anteriormente mencionado, os schwannomas consistem quase exclusivamente numa proliferação neoplásica de células de Schwann. Por sua vez, dos neurofibromas constam vários componentes celulares, como células de Schwann, células perineurais e fibroblastos (Fine *et al.*, 2004). Embora estas duas neoplasias sejam distinguíveis muitas vezes pelo seu padrão de crescimento e pelos seus constituintes celulares, na maioria dos casos o diagnóstico diferencial pode revelar-se difícil. A clássica disposição em paliçada das células neoplásicas nos schwannomas por vezes está ausente, tornando-se potencialmente árdua a distinção entre o schwannoma e o neurofibroma celular. Além disso, os schwannomas nos quais o padrão morfológico Antoni B predomina, podem mimetizar a aparência histológica dos neurofibromas (Fine *et al.*, 2004).

A proteína S100 é expressa nas células de Schwann periféricas. A revelação imunohistoquímica desta proteína é usada como auxiliar no diagnóstico de neoplasias do nervo periférico. Além de demonstrar a origem neuronal das neoplasias, a proteína S100 diferencia os schwannomas dos neurofibromas (Fine *et al.*, 2004; Ghilusi *et al.*, 2009). Ao contrário do que acontece nos neurofibromas, em que a distribuição da proteína é focal e variável, nos schwannomas a expressão do antígeno S100 revela-se intensa, difusa e homogénea (Scheithauer *et al.*, 1999; Weiss e Goldblum, 2001a; Fine *et al.*, 2004; Ghilusi *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2010). No entanto, a variabilidade de parâmetros como a extensão e a intensidade da marcação desta proteína não garantem que os resultados sejam fidedignos (Fine *et al.*, 2004). Por essa razão é vantajosa a inclusão de outros marcadores no painel imunohistoquímico complementar de diagnóstico.

Foi demonstrada a utilidade da calretinina no diagnóstico de tumores de células granulares (Fine e Li, 2003). Apesar da etiologia destes tumores ser incerta, acredita-se que possam ter origem neuronal, em particular, nas células de Schwann (Ordóñez e Mackay, 1999). A calretinina é uma proteína de ligação de cálcio estruturalmente relacionada com a S100 (Fine e Li, 2003). Fine *et al.*, 2004 demonstraram a expressão desta molécula em praticamente todos os schwannomas que analisaram. Por outro lado, a calretinina foi expressa num número muito reduzido de neurofibromas. A força destes resultados sugere a calretinina como um marcador imunohistoquímico muito útil no

diagnóstico diferencial entre schwannomas e neurofibromas humanos (Fine *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011b).

O perineurioma é igualmente uma neoplasia das bainhas do nervo periférico de carácter benigno, constituído por células perineurais em exclusivo, embora possa muito pontualmente apresentar células de Schwann e fibroblastos (Macarenco *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2012; Rodríguez-Peralto *et al.*, 2013). Desta feita, o diagnóstico diferencial de outras neoplasias das bainhas dos nervos periféricos benignas, como o neurofibroma e o schwannoma torna-se imperativo. Ainda assim, a grande maioria dos casos pode ser facilmente diferenciada ao nível da morfologia. Quando não é possível, considera-se a imunohistoquímica uma ferramenta bastante útil (Macarenco *et al.*, 2007).

O antígeno epitelial de membrana (EMA) é o marcador imunohistoquímico por excelência para as células perineurais, sendo um importante auxiliar no diagnóstico diferencial do perineurioma. No entanto, o uso desta molécula como marcador perineural apresenta alguns inconvenientes (Macarenco *et al.*, 2007): pelo facto de as células perineurais se disporem generosamente afastadas umas das outras e, adicionalmente o seu citoplasma ser extremamente delgado, demonstrar a reatividade do EMA pode tornar-se difícil sem recorrer a concentrações de anticorpo mais elevadas ou tempos de incubação mais longos do que aqueles empregues rotineiramente no diagnóstico de tumores de origem epitelial (Macarenco *et al.*, 2007). Porém, mesmo considerando estas precauções, a positividade para este anticorpo pode ser focal e fraca (Scheithauer *et al.*, 1999). Adicionalmente, a expressão do marcador EMA em neoplasias dos tecidos moles não é restrita aos perineuriomas (Macarenco *et al.*, 2007). Foram recentemente identificadas duas proteínas úteis no diagnóstico imunohistoquímico do perineurioma: a claudina-1 e a GLUT-1 (Macarenco *et al.*, 2007).

A reatividade do anticorpo S100 pode ser observada tanto nas formas benignas como nas formas malignas dos TBNP. Contudo, esta temática é discutida. Como já foi referido, a expressão desta proteína foi observada em pouco mais de metade da nossa amostra (55%). Curiosamente, a grande maioria dos casos positivos para este marcador foram classificados como malignos. Estes resultados são sustentados pela análise estatística, que provou existir uma associação estatisticamente significativa entre a expressão do S100 e o comportamento maligno das lesões ($p < 0,05$). Estudos recentes identificam a expressão da proteína S100 como característica dos TBNP malignos (Bergmann *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011a; Buza *et al.*, 2012; Tavasoly *et al.*, 2013).

No que diz respeito à intensidade da marcação, as lesões benignas mostraram uma expressão mais fraca, comparativamente aos casos malignos. Estes achados não corroboram totalmente outros estudos previamente publicados.

No homem, nos TBNP benignos, apresentam uma expressão para o anticorpo S100 intensa e uniforme na totalidade dos schwannomas. Por seu lado, tem vindo a ser sugerida uma associação entre a ausência de marcação de S100 e o comportamento maligno dos TBNP (Pumarola *et al.*, 1996; Hoang *et al.*, 2001; Chijiwa *et al.*, 2004). Nestes, este marcador é reativo em 50 a 70% dos casos e apresenta uma distribuição focal. Assim, na medicina humana, a proteína S100 é considerada um marcador sensível mas não específico dos TBNP (Scheithauer *et al.*, 1999).

Do mesmo modo, na medicina veterinária, as lesões classificadas como TBNP malignas parecem ser negativas, ao contrário das formas benignas que se mostraram imunoreactivas para S100 (Stoica *et al.*, 2001). No entanto, a explicação para a reatividade para o S-100 poderá depender da origem das células neoplásicas e não do comportamento maligno do tumor (Takeuchi e Ushigome, 2001). Assim, quando as células neoplásicas predominantes derivam de outras células que não as células de Schwann não é expectável uma reatividade difusa para o S100 (Takeuchi e Ushigome, 2001).

Acredita-se que a célula de Schwann é o principal responsável pela formação de ambas as formas benignas e malignas das neoplasias do nervo periférico. Todavia, tem sido sugerido que estas lesões possam ter diferentes origens celulares (Gupta e Maniker, 2007).

A transformação maligna dos tumores benignos das bainhas do nervo periférico foi descrita no homem (Weiss e Goldblum, 2001b). Este fenómeno pode eventualmente explicar os resultados do presente trabalho: num primeiro momento, nas lesões benignas há perda de expressão da proteína S100, a qual volta a ser readquirida com a progressão tumoral.

Uma estreita relação entre a atividade proliferativa de células malignas em diversas neoplasias e o grau de malignidade foi demonstrada por meio de marcadores de proliferação ou contagens de mitoses (Lebe *et al.*, 2004).

A expressão do anticorpo **anti-Ki-67** está altamente relacionada com a proliferação celular. O antigénio Ki-67 está presente em todas as fases activas do ciclo celular (fases G1, S, G2 e M) mas está ausente na fase de repouso (G0), permitindo a distinção entre as células em proliferação e as quiescentes. Pelo facto de ser uma proteína rigorosamente controlada e regulada, o Ki-67 é considerado um excelente marcador de proliferação celular (Scholzen e Gerdes, 2000).

O anticorpo primário, anti-Ki-67 anti-humano (clone MIB-1) tem vindo a ser extensivamente utilizado na determinação do índice de proliferação de um tecido em particular. De facto, índices proliferativos elevados revelam a atividade celular da

neoplasia, estando associados a um comportamento clinicopatológico maligno de várias neoplasias em animais domésticos (Griffey *et al.*, 1999; Roels *et al.*, 1999; Geraldles *et al.*, 2000).

No presente trabalho, em todas as lesões estudadas foi possível observar uma reação positiva da expressão do anticorpo anti-Ki-67. Contudo, a análise estatística confirmou existir uma associação importante entre o índice proliferativo e o comportamento biológico das lesões dado que, as neoplasias malignas revelaram índices de proliferação significativamente mais elevados, comparativamente aos casos benignos.

Pelo que nos foi permitido saber, o nosso trabalho é pioneiro na determinação da expressão do anticorpo anti-Ki-67 em tumores cutâneos das bainhas do nervo periférico no cão.

Assim sendo, esta ferramenta pode tornar-se muito útil no que diz respeito ao diagnóstico, particularmente na distinção entre o neurofibroma e outros TBNP malignos. Como já foi referido, o neurofibroma é apontado como sendo o principal precursor do TBNP maligno (Thomas *et al.*, 2009). Na medicina humana, e muito embora seja um fenómeno que surge muito pontualmente, o neurofibroma pode apresentar atipia celular relevante. Se bem que estes 'neurofibromas atípicos' não manifestem o padrão de crescimento dos TBNP malignos, a expressão do anticorpo anti-Ki-67 pode revelar-se útil, uma vez que a sua atividade mitótica é tipicamente escassa. Menos de 5% das células no 'neurofibroma atípico' são positivas para o anticorpo anti-Ki-67 (Thomas *et al.*, 2009). Por seu lado, nos TBNP malignos mais de 30% das células neoplásicas são imunoreactivas para este marcador (Thomas *et al.*, 2009). Desta forma, a sua utilização pode tornar-se proveitosa no diagnóstico diferencial entre entidades benignas e malignas, assim como na deteção precoce da transformação maligna de tumores dos nervos periféricos (Ghilusi *et al.*, 2009).

Os principais constituintes do citoesqueleto são os microtúbulos, os microfilamentos e os filamentos intermediários. Os últimos, tal como o nome sugere, têm um diâmetro intermédio relativamente às demais estruturas, e parecem desempenhar um papel estrutural, fornecendo resistência mecânica às células e aos tecidos (Sihag *et al.*, 2007). A vimentina, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a desmina são, entre outros, elementos do grupo dos filamentos intermediários do tipo III.

A **vimentina** é uma proteína integrante do citoesqueleto das células com origem mesenquimatosas. Assim, o anticorpo anti-vimentina é muito utilizado na caracterização de lesões com origem no tecido conjuntivo. Os TBNP são, como todas as neoplasias de células fusiformes, positivos para esta proteína, confirmando a sua histogénese (Pérez *et al.*, 1996; Chijiwa *et al.*, 2004; Gaitero *et al.*, 2008).

Corroborando a literatura existente, em todos os casos da presente série foi possível observar a expressão consistente da vimentina em mais de 75% das células neoplásicas. Relativamente ao comportamento biológico das lesões, não foi notória qualquer diferença entre grupos, dado que a grande maioria das lesões (95%) foi positiva para este marcador. Contudo, e no que diz respeito à intensidade da marcação, é interessante salientar que, as lesões malignas exibiam uma marcação mais fraca deste marcador, comparativamente às benignas.

Como já foi referido, os tumores caninos das bainhas do nervo periférico malignos são, histologicamente muito semelhantes aos benignos (Gross *et al.*, 2005). De um modo geral, as neoplasias malignas são altamente celulares e os padrões neuronais, embora presentes, são mais subtis, quando comparados às lesões benignas. Por isso, os padrões de crescimento Antoni A e Antoni B são frequentemente menos evidentes nas lesões malignas (Gross *et al.*, 2005). Na literatura humana, foram descritas diferentes intensidades de marcação do anticorpo anti-vimentina nas diferentes regiões Antoni A e Antoni B dos schwannomas, sendo que as áreas do tipo Antoni B exibiram uma marcação mais fraca, comparativamente com as primeiras (Ghilusi *et al.*, 2009).

Na medicina veterinária, e pelo que nos foi possível saber, a vimentina é um marcador imunohistoquímico invariavelmente positivo em todos os TBNP, independentemente do seu comportamento biológico (Kuwamura *et al.*, 1998; Sawamoto *et al.*, 1999; Stoica *et al.*, 2001; Chijiwa *et al.*, 2004; Brower *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2007; Gaitero *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2009; Schulman *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011a; Buza *et al.*, 2012; Ahmadi *et al.*, 2012; Pavarini *et al.*, 2013; Tavasoly *et al.*, 2013) e não há qualquer menção a diferenças de intensidade de expressão entre lesões benignas e malignas, o que nos impede de comparar criticamente os nossos resultados.

A **GFAP** é o principal constituinte da família dos filamentos intermédios encontrado nas células da glia. Contudo, a sua expressão não se restringe a estas células, ocorrendo também nas células de Schwann (Jessen *et al.*, 1984).

A expressão do anticorpo anti-GFAP é característica dos TBNP benignos no cão (Chijiwa *et al.*, 2004), à semelhança do que acontece na medicina humana. Assim, a utilização deste marcador pode ser útil para distinguir o comportamento biológico dos TBNP (Chijiwa *et al.*, 2004).

Na presente série, 100% dos TBNP benignos foram positivos para GFAP. Todavia, um número elevado de casos malignos da nossa amostra exibiu igualmente positividade para este marcador.

Muito embora se refira apenas a um animal, Bergmann *et al.*, 2009 avaliaram igualmente a expressão deste marcador num TBNP maligno canino e, tal como no nosso

estudo, observaram uma marcação positiva praticamente na totalidade das células neoplásicas. Os estudos já publicados revelam diferentes expressões de GFAP (Sawamoto *et al.*, 1999; Stoica *et al.*, 2001; Chijiwa *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2007; Gaitero *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2009; Schulman *et al.*, 2009; Schöniger *et al.*, 2010; Buza *et al.*, 2012; Pavarini *et al.*, 2013). Gaitero *et al.*, 2008 avaliaram a expressão deste marcador numa série de 33 casos de TBNP em canídeos e apenas observaram num caso reatividade citoplasmática em algumas células gigantes multinucleadas. A expressão da GFAP foi igualmente avaliada em animais de grande porte (Nielsen *et al.*, 2007; Pavarini *et al.*, 2013) e apesar do tamanho das amostras ser notoriamente diferente, em ambos os estudos obteve-se grau variável de positividade nos schwannomas (Nielsen *et al.*, 2007) e o único TBNP maligno foi negativo para este marcador (Pavarini *et al.*, 2013). Nos felídeos, a expressão de GFAP também foi variável (Schulman *et al.*, 2009; Buza *et al.*, 2012).

No nosso estudo não foi evidente a utilidade desta proteína na avaliação do comportamento biológico das lesões. Ainda assim, tem sido apontada como proveitosa no diagnóstico diferencial entre os TBNP e outras neoplasias de células fusiformes (Sawamoto *et al.*, 1999; Sarlomo-Rikala *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2005).

As células musculares contêm várias proteínas dos filamentos intermédios. A **desmina** é uma dessas proteínas e está presente nos músculos esquelético, liso e cardíaco (Paulin e Li, 2004). Assim, a expressão desta proteína é altamente específica das células musculares, bem como das neoplasias em tecidos de origem muscular (Ellis, 1996).

Deste modo, o padrão de imunoreatividade da desmina na presente série foi muito surpreendente. Independentemente do seu comportamento biológico, 77,5% das lesões incluídas na amostra exibiu positividade para este marcador de células musculares.

Em canídeos, a avaliação da expressão deste marcador em TBNP foi realizada uma única vez, não tendo sido observada qualquer imunoreatividade para esta proteína (Kuwamura *et al.*, 1998). Contudo, mais recentemente, Fattahian *et al.*, 2012 observaram a expressão da desmina em 10% das células neoplásicas de um neurofibroma canino.

Em animais de grande porte, por seu lado, estudos recentes incluíram esta proteína no painel imunohistoquímico utilizado para a caracterização do schwannoma em bovinos. Em ambos os estudos não foi observada qualquer reatividade da desmina (Nielsen *et al.*, 2007; Ahmadi *et al.*, 2012).

A desmina e a vimentina são dois filamentos intermédios que coexistem durante toda a miogénese (Machado e Figueiredo, 1996). Na formação do tecido muscular, a vimentina predomina nos estádios mais iniciais e, a desmina, por seu lado nos mais

tardios. Durante este processo, no entanto, a distribuição destas proteínas é indistinguível, sugerindo a capacidade das suas subunidades em formar copolímeros para dar origem a um filamento (Machado e Figueiredo, 1996). Assim, poderemos estar diante de um processo de des (diferenciação) celular que ocorre durante a progressão neoplásica.

Vários anticorpos anti-Desmina estão disponíveis no mercado. Contudo, o procedimento de fixação dos tecidos pode alterar de forma determinante os resultados esperados, originando ora falsos negativos, ora reações cruzadas entre moléculas (Ellis, 1996; Machado e Figueiredo, 1996). Na tentativa de confirmar ou excluir a origem muscular das neoplasias, testamos a expressão de outro marcador muscular: anti-actina muscular específica, cuja imunoexpressão, à semelhança da desmina pode ser observada em células dos músculos esquelético, liso e cardíaco.

Pelo que nos foi permitido saber, a expressão desta proteína foi avaliada também apenas uma vez em TBNP em felídeos. Não foi possível observar positividade para este marcador em nenhuma das lesões incluídas neste estudo (Schulman *et al.*, 2009).

Na nossa série, apenas 10% das lesões se mostraram positivas (score ≥ 6) para este anticorpo. A reatividade foi observada tanto em lesões benignas como malignas.

De facto, o padrão de imunoreatividade desta proteína permitiu-nos confirmar a inespecificidade do anticorpo anti-Desmina e refutar a potencial origem muscular dos tumores incluídos na nossa amostra. Tendo em conta os resultados falsos positivos obtidos nas lesões caninas avaliadas, que sugerem fortemente a inespecificidade do clone desmina utilizado, achamos que este não deve ser incluído no painel de IHQ para a caracterização destas neoplasias.

A **NSE** é uma isoenzima glicolítica expressa pelas células de origem neuronal e neuroendócrina. A presença desta proteína pode ser usada na identificação de estruturas do nervo periférico, neoplasias de origem neuronal e neuroendócrina (Koestner e Higgins, 2002; Nielsen *et al.*, 2007).

Na presente série, foi possível observar positividade para esta proteína em 80% das lesões incluídas na amostra. A solidez dos nossos resultados é corroborada por estudos prévios que sugerem que, na espécie canina, e independentemente do seu comportamento biológico, os TBNP expressam NSE (Kuwamura *et al.*, 1998; Sawamoto *et al.*, 1999; Chijiwa *et al.*, 2004; Gaitero *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011a). Estes estudos documentam que um painel imunohistoquímico que abranja NSE, GFAP e S-100 poderá ser útil no diagnóstico diferencial entre os TBNP e hemangioperiocitomas caninos, e confirmar o comportamento maligno das neoplasias (Sawamoto *et al.*, 1999; Chijiwa *et al.*, 2004).

No gado, por seu lado, a expressão desta isoenzima não parece ser tão consistente. Muito embora, e mais uma vez a dimensão das amostras seja díspar, dois estudos que avaliaram a expressão de diferentes marcadores imunohistoquímicos, entre eles a NSE em vacas, apresentam resultados bem diferentes (Nielsen *et al.*, 2007; Ahmadi *et al.*, 2012). Se por um lado, Nielsen *et al.*, 2007 observaram uma forte expressão desta proteína na quase totalidade dos schwannomas avaliados, Ahmadi *et al.*, 2012 não observaram qualquer reatividade deste marcador num único schwannoma que analisaram. Já Pavarini *et al.*, 2013, observaram positividade multifocal de NSE num TBNP maligno canino.

Embora o requisito fosse uma reatividade muito restrita para a molécula, foram produzidos muitos anticorpos anti-NSE, pelo que uma parte significativa deles apresenta reatividade cruzada com outras enolases. A utilização deste marcador é limitada devido à sua frequente marcação inespecífica (Gaitero *et al.*, 2008). Por esta razão, para fins de diagnóstico, é muito importante a validação da reatividade do anticorpo utilizado, e assim sendo, os anticorpos monoclonais são preferíveis aos policlonais (Ellis, 1996).

No entanto, embora a positividade de anticorpos monoclonais bem caracterizados forneça fortes evidências de diferenciação neuronal ou neuroendócrina, um resultado negativo não exclui essa origem. Por este motivo, marcadores imunohistoquímicos adicionais, como a PGP 9.5 têm vindo a ser incluídos no painel de diagnóstico (Ellis, 1996; Hoang *et al.*, 2001; Gaitero *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

Conclusões

Em suma, neste trabalho foram avaliados por técnica de imunohistoquímica 40 TBNP, dos quais 17 lesões foram classificadas como benignas e 23 malignas. Com base nos resultados obtidos, e numa análise estatística cuidada, destacamos os seguintes pontos, salientando, que todos eles revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$):

- A dimensão das lesões de comportamento maligno era significativamente maior, relativamente à das benignas.

- As lesões malignas mostraram ser mais positivas anticorpo anti-S100, comparativamente com as benignas.

- As lesões malignas apresentaram índices de proliferação celular significativamente mais elevados, comparativamente aos das lesões benignas.

Na medicina veterinária, para efectuar um correto diagnóstico diferencial entre as várias entidades incluídas no grande grupo dos TBNP, ou para se conseguir uma melhor aproximação e caracterização da neoplasia: 1. terá que ser efetuado um painel imunohistoquímico vasto e completo (que acabará por ser dispendioso e pouco viável para a maioria dos laboratórios, clínicos e proprietários); 2. terá que ser investigado e desenvolvido um anticorpo perfeitamente específico dado que o painel rotineiramente utilizado na medicina humana não é muito esclarecedor no caso destes tumores cutâneos nos cães; 3. outra hipótese será o recurso a estudos moleculares, nomeadamente análise de mutações potencialmente existentes nestes tumores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Ahmadi N, Oryan A, Ghane M, Daneshbod Y. Cutaneous schwannoma in a cow. *Braz J Vet Pathol.* 2012; 5:81-85.
- Allison H, Patel RM, Goldblum JR, Rubin BP. Superficial malignant peripheral nerve sheath tumor: a rare and challenging diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124:685-692.
- Amorim I, Lopes CC, Faustino AMR, Pereira PD. Immunohistochemical expression of caveolin-1 in normal and neoplastic canine mammary tissue. *J Comp Pathol.* 2009; 143:39-44.
- Bergmann W, Burgener IA, Roccabianca P, Rytz U, Welle M. Primary splenic peripheral nerve sheath tumour in a dog. *J Comp Pathol.* 2009; 141:195-198.
- Brower A, Salamat S, Crawford J, Manley P. Unilateral limb enlargement in a dog with a malignant peripheral nerve sheath tumor. *Vet Pathol.* 2005; 42:353-356.
- Buckley PG, Mantripragada KK, de Ståhl TD, Piotrowski A, Hansson CM, Kiss H, Vetrie D, Ernberg IT, Nordenskjöld M, Bolund L, Sainio M, Rouleau GA, Niimura M, Wallace AJ, Evans DGR, Gintautas G, Menzel U, Dumanski JP. Identification of genetic aberrations on chromosome 22 outside the NF2 locus in schwannomatosis and neurofibromatosis type 2. *Human Mutation.* 2005; 26:540-549.
- Buza EL, Menzies RA, Goldschmidt MH, Durham AC. Malignant peripheral nerve sheath tumors in a cat with nodal and pulmonary metastases. *J Vet Diagn Invest.* 2012; 24:781-784.
- Cassali GD, Silva P, Rêma A, Gärtner F, Gobbi H, Tafuri WL, Schmitt FC. A new methodology for the improvement of diagnostic immunohistochemistry in canine veterinary pathology: automated system using human monoclonal and polyclonal antibodies. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001; 53: 320-331.
- Celis-Aguilar E, Lassaletta L, Torres-Martín M, Rodrigues FY, Nistal M, Castresana JS, Gavilan J, Rey JA. The molecular biology of vestibular schwannomas and its association with hearing loss: a review. *Genet Res Int.* 2012.
- Chen S, Liu C, Liu B, Yi C, Wang Z, Rong Y, Zhu J, Ding Y, Tian G. Schwannomatosis: a new member of neurofibromatosis family. *Chin Med J.* 2013; 126: 2656-2660.
- Chijiwa K, Uchida K, Tateyama S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet Pathol.* 2004; 41:307-318.
- Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell.* 2001; 104:593-604.
- Ellis I (1996). Immunocytochemistry in diagnostic pathology. In: *Bancroft's Theory and practice of histological techniques*, 4th ed., Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 471-487.
- Enzinger FM, Weiss SE. (1995). *Soft Tissue Tumors*. 3rd ed., Mosby. St. Louis.
- Fattahian H, Mortazavi P, Moosavian H, Mohyeddin H, Moridpour R. Immunohistochemical study of a canine neurofibroma. *J S Afr Vet Assoc.* 2012; 83:18.

Feany MB, Anthony DC, Fletcher Cd. Nerve sheath tumours with hybrid features of neurofibroma and schwannoma: a conceptual challenge. *Histopathology*. 1998; 32:405-410.

Ferner RE. Neurofibromatosis 1. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15:131-138.

Fine SW, Li M. Expression of calretinina and the alpha-subunit of inhibin in granular cell tumours. *Am J Clin Pathol*. 2003; 119:259-264.

Fine SW, McClain SA, Li M. Immunohistochemical staining for calretinina id useful for differentiating schwannomas from neurofibromas. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122:552-559.

Gaitero L, Añor S, Fondevila D, Pumarola M. Canine cutaneous spindle Cell tumours with features of peripheral nerve sheath tumours: a histopathological and immunohistochemical study. *J Com Pathol*. 2008; 139:16-23

Geraldes M, Gärtner F, Schmitt F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec*. 2000; 146:403-406.

Ghiluși M, Pleșea IE, Comănescu M, Enache SD, Bogsan F. Preliminary study regarding the utility of certain immunohistochemical markers in diagnosing neurofibromas and schwannomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50:195-202.

Goldschmidt MH, Hendrick MJ. (2002) Benign peripheral nerve sheath tumor (neurofibroma, schwannoma). In: *Tumors in Domestic Animals*, 4th Edit., DJ Meuten, Ed., Iowa State University Press, Ames, pp. 95 e 96.

Griffey SM, Kraegel SA, Madewell BR. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *J Comp Pathol*. 1999; 120:321-332.

Gross TL, Ihrke P, Walder EJ, Affolter VK. (2005). Neural and perineural tumors. Mesenchymal neoplasms and other tumors. In: *Skin diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathological Diagnosis*, 2nd ed., Blackwell Publishing, Oxford, pp.786-796.

Gupta G, Maniker A. Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neurosurg Focus*. 2007; 22: E12.

Gutmann DH, Geist RT, Xu H, Kim JS, Saporito-Irwin S. Defects in neurofibromatosis 2 protein function can arise at multiple levels. *Hum Mol Genet*. 1998; 7:335-345.

Gutmann DH, Giordano MJ, Fichback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependyomas and schwannomas. *Neurology*. 1997; 49:267-270.

Gutmann DH, Sherman L, Seftor L, Haipek C, Lu KH, Hendrix M. Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum Mol Genet*. 1999; 2: 267-275.

Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ. (1998). In: *WHO Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissue of Domestic Animals*, Vol. II, FY Schulman, Ed., Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, pp. 26 e 27.

Higgins RJ, Dickinson PJ, Jimenez DF, Bollen AW, Lecouter RA. Canine intraneural perineurioma. *Vet Pathol*. 2006; 43:50-54.

- Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T, Mizoguchi M, Suzuki SO, Hamada Y, Fukui M, Tateishi J. Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* 1997; 93:225-232.
- Hoang MP, Prasanna S, Albores-Saavedra J. Expression of protein gene product 9.5 in epithelioid and conventional malignant peripheral nerve sheath tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125:1321-1325.
- Huang JH, Johnson VE, Zager EL. Tumors of the peripheral nerves and plexus. *Curr Treat Opt Neurol.* 2006; 8:299-308.
- Jacoby LB, Jones D, Davis K, Kronn D, Short P, Gusella J, MacCollin M. Molecular analysis of NF2 tumor-suppressor gene in schwannomatosis. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 1293-1302.
- Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R. Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol.* 1984; 13:187-200.
- Joshi R. Learning from eponyms: Jose Verocay and Verocay bodies, Antoni A and B areas, Nils Antoni and Schwannomas. *Indian Dermatol Online J.* 2012; 3:215-219.
- Junqueira LC, Carneiro J. (2008) *Histologia Básica*, 11^a ed., pp. 153-181 e 359-370. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kameyama M, Ishikawa Y, Shibahara T, Kadota K. Melanotic neurofibroma in a steer. *J Vet Med Sci.* 2000; 62:125-128.
- Kleihues P, Cavenee WK. (2000). *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*, 2nd ed., IARC Press, Lyon, France.
- Koestner A, Bilzer T, Fatzer R, Schulman FY, Summers BA et al. (1999). In: *Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals*, Vol. 5, FY Schulman, Ed., Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, pp. 26 e 27.
- Koestner A, Higgins RJ. (2002) Primary tumors of the peripheral nervous system. In: *Tumors in Domestic Animals*, 4th Edit., DJ Meuten, Ed., Iowa State University Press, Ames, pp. 731-735.
- Kostov M, Mijovic Z, Visnjic M, Mihailovic D, Stojanovic M, Zdravkovic M. Malignant peripheral nerve sheath tumour in a dog presenting as a pseudo aneurysm of the left jugular vein: a case report. *Veterinari Medicina.* 2008; 53:685-689.
- Kurtkaya-Yapici Ö, Scheithauer B, Woodruff JM. The pathobiologic spectrum of schwannomas. *Histol Histopathol.* 2003; 18:925-934.
- Kuwamura M, Yamate J, Kotani T, Takeuchi T, Sakuma S. Canine peripheral nerve sheath tumor with eosinophilic cytoplasmic globules. *Vet Pathol.* 1998; 35:223-226.
- Lakkis MM, Tennekoon GI. Neurofibromatosis type 1. General overview. *J Neurosci Res.* 2000; 62:755-763.
- Le LQ, Liu C, Shipman T, Chen Z, Suter U, Parada LF. Susceptible stages in Schwann cells for NF1-associated plexiform neurofibroma development. *Cancer Res.* 2011; 71:4686-4695.

- Le LQ, Shipman T, Burns DK, Parada LF. Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. *Cell Stem Cell*. 2009; 4:453-463.
- Lebe B, Sağol Ö, Ulukuş Ç, Çoker A, Karademir S, Astarcioglu H, Küpelioğlu A, Astarcioglu I, Obuz F. The importance of cyclin D1 and Ki67 expression on the biological behavior of pancreatic adenocarcinomas. *Pathol Res Pract*. 2004; 200:389-396.
- Macarenco RS, Ellinger F, Oliveira AM. Perineurioma: a distinctive and underrecognized peripheral nerve sheath neoplasm. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131: 625-363.
- Machado GF, Figueiredo F. Revisão: Filamentos Intermediários. *Medicina*. 1996; 29:104-113.
- Marocchio LS, Pereira MC, Soares CT, Oliveira DT. Oral plexiform neurofibroma not associated with neurofibromatosis type I: case report. *J Oral Science*. 2006; 48:157-160.
- McMenamim ME, Fletcher CD. Expanding the spectrum of malignant change in schwannomas: epithelioid malignant change, epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumor, and epithelioid angiosarcoma: a study of 17 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001; 25:13-25.
- Meyers MI, Peltier AC, Li J. Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy. *Muscle Nerve*. 2013; 47:1-11.
- Nielsen AB, Jansen ECL, Leifsson PS, Jensen HE. Immunoreactivity of bovine schwannomas. *J Comp Path*. 2007; 137:224-230.
- Nielsen AB, Jensen HE, Leifsson PS. Immunohistochemistry for 2', 3'-Cyclic Nucleotide-3'-Phosphohydrolase in 63 bovine peripheral nerve sheath tumors. *Vet Pathol*. 2010. <http://vet.sagepub.com/content/early/2010/12/01/0300985810388521>
- Ordóñez NG, Mackay B. Granular cell tumor: a review of the pathology and histogenesis. *Ultrastruct Pathol*. 1999; 23:207-222.
- Ottinger T, Lindberg R, Ekman S. Malignant acoustic schwannoma in a dog. *J Vet Diagn Invest*. 2009; 21:129-132.
- Park JW, Woo GH, Jee H, Jung DW, Youn HY, Choi MC, Kim DY. Malignant peripheral nerve sheath tumour in the liver of a dog. *J Comp Pathol*. 2011a; 144:223-226.
- Park JY, Park H, Park NJ, Park JS, Sung HJ, Lee SS. Use of calretinina, CD56, and CD34 for differential diagnosis of schwannoma and neurofibroma. *Korean J Pathol*. 2011b; 45:30-35.
- Patterson CC, Perry RL, Steficek B. Malignant peripheral nerve sheath tumor of the diaphragm in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2008; 44:36-40.
- Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res*. 2004; 301:1-7.
- Pavarini SP, Gomes DC, Bandinelli MB, Wouters F, Sonne L, Driemeier D, da Cruz, EF. Malignant peripheral nerve sheath tumor as a cause of chronic insufficiency in cattle. *Acta Vet Scand*. 2013; 55:7.

- Pérez J, Bautista MJ, Rollón E, de Lara FC, Carrasco L, Martín de las Mulas J. Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. *Vet Pathol.* 1996; 33: 391-397.
- Propp JM, McCarthy BJ, Davis FG, Preston-Martin S. Descriptive epidemiology of vestibular schwannomas. *Neuro-Oncology.* 2006; 8:1-11.
- Pumarola M, Añor S, Borrás D, Ferrer I. Malignant epithelioid schwannoma affecting the trigeminal nerve of a dog. *Vet Pathol.* 1996; 33:434-436.
- Riccardi VM, Smirniotopoulos J. Neurofibromatosis, phenotype, natural history, and pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992.
- Robson AM, Calonje E. Cutaneous perineurioma: a poorly recognized tumour often misdiagnosed as epithelioid histiocytoma. *Histopathology.* 2000; 37:332-339.
- Rodriguez FJ, Folpe AI, Giannini C, Perry A. Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. *Acta Neuropathol.* 2012; 123:295-319.
- Rodríguez-Peralto JL, Riveiro-Falkenbach E, Carrilo R. Benign cutaneous neural tumors. *Semin Diagn Pathol.* 2013; 30:45-57.
- Roels S, Tilmant K, Ducatelle R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol.* 1999; 121:13-24.
- Ruiz FS, Alessi AC, Chagas CA, Pinto GA, Vassalo J. Imuno-histoquímica na patologia veterinária diagnóstica: uma revisão crítica. *J Bras Patol Med Lab.* 2005; 41:263-270.
- Sarlomo-Rikala M, Tsujimura T, Lendahl U, Miettinen M. Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS.* 2002; 110:499-507.
- Sawamoto O, Yamate J, Kuwamura M, Hagiwara R, Kurisu K. A canine peripheral nerve sheath tumor including peripheral nerve fibers. *J Vet Med Sci.* 1999; 61:1335-1338.
- Scheithauer BW, Woodruff JM, Erlandson RA. (1999). Fascicle 24: tumours of the peripheral nervous system. In: *Atlas of Tumours Pathology, 3rd Series*, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, pp.105-176, 303-72.
- Scherer SS, Gutmann DH. Expression of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, in Schwann cells. *J Neurosci Res.* 1996; 46:595-605.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein from the known to the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-322.
- Schöniger S, Summers BA. Localized, plexiform, diffuse, and other variants of neurofibroma in 12 dogs, 2 horses, and a chicken. *Vet Pathol.* 2009; 46:904-915.
- Schöniger S, Valentine BA, Fernandez CJ, Summers BA. Cutaneous schwannomas in 22 horses. *Vet Pathol.* 2011; 48:433-442.

- Schulman FY, Johnson TO, Facemire PR, Fanburg-Smith JC. Feline peripheral nerve sheath tumors: Histologic, immunohistochemical and clinopathological correlation (59 tumors in 53 cats). *Vet Pathol.* 2009; 46:1166-1180.
- Scott DW, Miller Jr WH, Griffin CE. (2001). Neoplastic and non-neoplastic tumors. In: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 1236-1414.
- Scott DW, Miller Jr WH, Griffin CE. (2001). Structure and function of the skin. In: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6th ed, W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 1-70.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res.* 2007; 313:2098-2109.
- Staser K, Yang F, Clapp DW. Mast cells and the neurofibroma microenvironment. *Blood.* 2010; 116:157-164.
- Stewart JD. Peripheral nerve fascicles: Anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve.* 2003; 28:525-541.
- Stoica G, Tasca SI, Kim HT. Point mutation of neu oncogene in animal peripheral nerve sheath tumors. *Vet Pathol.* 2001; 38:679-688.
- Takeuchi A, Ushigome S. Diverse differentiation in malignant peripheral nerve sheath tumours associated with neurofibromatosis-1: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histopathology.* 2001; 39:298-309.
- Tanimoto T, Ohtsuki Y. A solitary schwannoma in the cecum of a cow. *Vet Pathol.* 1992; 29:81-83.
- Tavasoly A, Javanbakht J, Khasi F, Hosseini E, Bahrami A, Hassan MA, Mirabad M. Ulnar malignant peripheral nerve sheath tumour diagnosis in a mixed-breed dog as a model to study human: histologic, immunohistochemical, and clinicopathologic study. *Diagn Pathol.* 2013; 8:86.
- Thomas C, Somani N, Owen LG, Malone JC, Billings AD. Cutaneous malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Cutan Pathol.* 2009; 36:896-900.
- Topp KS, Boyd BS. Structure and biomechanics of peripheral nerves: Nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Phys Ther.* 2006; 86:92-109.
- Toyoda t, Ochiai K, Ohashi K, Tomioka Y, Kimura T, Umemura T. Multiple perineuriomas in chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Vet Pathol.* 2005; 42:176-183.
- Weiss SW, Goldblum JR. (2001a). Benign tumors of the peripheral nerves. In: Enzinger and Weiss's *Soft Tissue Tumors*, 4th edn., Mosby, St. Louis, pp. 1111-1208.
- Weiss SW, Goldblum JR. (2001b). Malignant tumors of peripheral nerves. In: Enzinger and Weiss's *Soft Tissue Tumors*, 4th edn., Mosby, St. Louis, pp. 1209-1264.
- Wippold II FJ, Lubner M, Perrin RJ, Lämmlle M, Perry A. Neuropathology for the neuradiologist: Antoni A and Antoni B tissue patterns. *Am J Neuroradiol.* 2007; 28:1633-1638.
- Woodruff JM, Selig AM, Crowley K, Allen PW. Schwannoma (neurilemima) with malignant transformation. A rare, distinctive peripheral nerve tumor. *Am J Surg Pathol.* 1994; 18:882-895.

Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science*. 2002; 296:920-922.

Zhu Y, Parada LF. Neurofibromin, a tumor suppressor in the nervous system. *Exp Cell Res*. 2001; 264:19-28.