Kalan Bastos Violin

NEOPLASIAS INTRACRANIANAS EM CÃES: AVALIAÇÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE P53

SÃO PAULO

2009

KALAN BASTOS VIOLIN

Neoplasias intracranianas em cães: avaliação imuno-histoquímica de marcadores de proliferação celular e expressão de p53

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2161
FMVZ

Violin, Kalan Bastos

Neoplasias intracranianas em cães: avaliação imuno-histoquímica de marcadores de proliferação celular e expressão de p53 / Kalan Bastos Violin. – São Paulo : K. B. Violin, 2009.
90 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Neoplasias intracranianas. 2. Cães. 3. Meningioma. 4. Astrocitoma. 5. PCNA. 6. Ki-67. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Neoplasias intracranianas em cães: Avaliação imunoistoquímica de marcadores de proliferação celular e expressão de p53", protocolado sob o nº1150/2007, utilizando cadáveres de cães portadores de neoplasias intracranianas, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Intracranial neoplasia in dogs: immunohistochemistry of cell proliferation markers and p53 expression", protocol number 1150/2007, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Cesar Miorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Violin, Kalan Bastos

Título: Neoplasias intracranianas em cães: avaliação imuno-histoquímica de marcadores de proliferação celular e expressão de p53

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __ / __ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À minha esposa *Tami* pela dedicação, carinho,
companheirismo, paciência, amor, compreensão,
ajuda e alegria, pois ela é a razão do meu sucesso,
o motivo da minha dedicação e do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A *Deus* acima de tudo por me dar a salvação, a força, a inspiração e o talento necessário para realizar não apenas esta tarefa, mas todas as tarefas da minha vida.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Paulo César Maiorka*, pela oportunidade de trabalho, aprendizado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, pela concessão da bolsa de estudo (processo nº 06/58508-6), que permitiu a realização deste trabalho.

À *Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Zaidan Dagli*, pela colaboração, disponibilização do laboratório, microscópio e amizade.

Ao *Prof. Dr. Eduardo Juan Gimeno* pela sua disponibilidade, oportunidade, amizade e incentivo.

Ao Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Patologia Geral, Facultad de Ciencias Veterinarias da Universidad Nacional de La Plata, La Plata – Argentina; sob orientação e colaboração do amigo e pesquisador *Prof. Dr. Enrique Leo Portiansky*.

Ao *Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini* pela amizade, colaboração e boa conversa, pelas fotografias e todo ensinamento fotográfico que eu sempre sonhei em ter e que só pude alcançá-lo no lugar menos provável possível, porém da melhor qualidade.

Aos amigos científicos: *Fernando, Andréia, Lu Lippi, Luiz, Ana, Caio, Camila, Adriano, Tessie, Eduardo, Maru, Malu, Luiz zuls, Rafael, Bruno, Teresa, Heidge, Tarso, Patrícia, Lu Torres, Adriana, Lucas, Deiby, Carola, Cristiane, Rodrigo, Verdes, Barbeito, Silvana, Fernanda, Gisele e Dominguita*.

Aos técnicos do Departamento de Patologia *Marguiti, Claudio, Luciano (Buga), Raimundo, Herculano* pela amizade, trabalho e cooperação.

Aos amigos e colaboradores *João Pedro e Sylvia* pela oportunidade de trabalharmos juntos, incrível disposição em ajudar e por serem os melhores clínicos que conheci.

Aos meus pais *Marco e Nice* por tudo que eles fizeram por mim.

Ao *tio Sérgio* que sempre me ajudou e continua me ajudando em todos os momentos cruciais da minha formação e da minha vida.

Aos *Blues Brothers* e a cachorrinha *Kika* que me fizeram companhia providencial.

RESUMO

VIOLIN, K. B. **Neoplasias intracranianas em cães:** avaliação imuno-histoquímica de marcadores de proliferação celular e expressão de p53. [Intracranial neoplasia in dogs: immunohistochemistry evaluation of cellular proliferation markers and p53 expression]. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O estudo das alterações neoplásicas do sistema nervoso (SN) de cães apresenta enorme desafio devido suas particularidades, entre as espécies de animais domésticos o cão *Canis familiares* é o que apresenta a maior ocorrência destes neoplasmas. O desenvolvimento deste trabalho visa estabelecer o estudo anátomopatológico, molecular e epidemiológico em neurooncologia veterinária, avaliando pela técnica de imuno-histoquímica marcadores da proliferação celular PCNA e Ki-67, expressão da proteína p53 e marcadores de diferenciação celular. Foram utilizados neste estudo 18 animais, da espécie canina, que deram entrada ao Serviço de Patologia vinculado ao Hospital veterinário (HOVET) e ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e que tiveram diagnóstico de neoplasia intracraniana primária confirmado, entre eles (8) meningiomas e (3) astrocitomas. Não houve predileção sexual e a idade média do aparecimento tumoral foi de 9 anos. O valor médio do índice proliferativo (IP) de meningiomas benignos para PCNA é 4,8% e Ki-67 é 2,8%, no astrocitoma fibrilar o valor do IP é para PCNA 1% e Ki-67 1%, no astrocitoma anaplásico o valor do IP é para PCNA 10% e Ki-67 5% e no xantoastrocitoma pleomórfico o valor do IP é para PCNA 20% e Ki-67 4%. Não foi detectada alterações em p53 e o IP foi útil para definir o comportamento tumoral benigno ou maligno e dois tipos tumorais que não haviam sido descritos em cães: xantoastrocitoma pleomórfico e tumor de parênquima pineal de diferenciação intermediária puderam ser diagnosticados graças ao conjunto de informações coletadas, morfologia celular, marcadores de diferenciação celular e índice proliferativo.

Palavras-chave: Neoplasias intracranianas. Cães. PCNA. Ki-67. Astrocitoma. Meningioma.

ABSTRACT

VIOLIN, K. B. **Intracranial neoplasia in dogs:** immunohistochemistry evaluation of cellular proliferation markers and p53 expression. [Neoplasias intracranianas em cães: avaliação imuno-histoquímica de marcadores de proliferação celular e expressão de p53]. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The study of neoplastic alterations of dogs nervous system (NS) presents huge challenges due their particularities, between domestic animals species the dog *Canis familiars* presents the highest of these neoplasms. The development of this research aims to establish the anatomical-pathological, molecular and epidemiology study in veterinary neuro-oncology, evaluating by Immunohistochemistry technique markers of cell proliferation PCNA and Ki-67, expression of p53 protein and markers of cell differentiation. In this study were used 18 animals, dogs, which had entry at the Pathology Service of the Veterinary Hospital (HOVET) and at the Department of pathology from Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia of University of São Paulo, which had confirmed diagnose of primary intracranial neoplasia, among them (8) meningiomas and (3) astrocytomas. There wasn't sexual preference and the mean age of tumor manifestation was 9 years old. The mean value of labelling index (LI) of benign meningiomas for PCNA is 4,8% and Ki-67 is 2,8%, in fibrillary astrocytoma the mean value of LI is 1% for PCNA and 1% for Ki-67, in anaplastic astrocytoma the mean value of LI is 10% for PCNA and 5% for Ki-67 and in pleomorphic xanthoastrocytoma the mean value of LI is 20% for PCNA and 4% for Ki-67. The p53 alterations wasn't detected and the LI was useful to set the benign or malign tumor behavior and two tumor types which had not been described in dogs: pleomorphic xanthoastrocytoma and pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation could be diagnosed through the set of information collected, cell morphology, markers of cell differentiation and labelling index.

Keywords: Intracranial Neoplasia. Dogs. PCNA. Ki-67. Astrocytoma. Meningioma.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Prevalência dos tumores em relação ao sexo dos cães	47
Gráfico 2 – Distribuição da idade dos cães por número de casos.....	48
Gráfico 3 – Porcentual de cada tipo tumoral agrupado em relação ao total.....	48
Gráfico 4 – Prevalência do número de casos em relação à raça	49
Gráfico 5 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 (em %)	49
Gráfico 6 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em meningiomas (em %)	50
Gráfico 7 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em astrocitomas (em %)	50
Gráfico 8 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em PNET (em %).....	51
Gráfico 9 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em Outros (em %)......	51
Gráfico 10 – Distribuição sexual por tipo tumoral agrupado em número de casos....	52
Gráfico 11 – Período de tempo em dias aproximados do aparecimento de sinais clínicos até o óbito (excluindo valores nulos)	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos tumores do sistema nervoso por Koestner et al., (1999), primeira parte	27
Quadro 2 – Classificação dos tumores do sistema nervoso por Koestner et al., (1999), segunda parte	28
Quadro 3 – Lista dos anticorpos, diluição de trabalho, tampão de recuperação antigênica, código do fabricante e tipo clonal.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de identificação dos cães, raça, sexo, idade no momento da necropsia e neoplasia diagnosticada.....	41
Tabela 2 – Índice de proliferação celular para PCNA e Ki-67	53
Tabela 3 – Marcação imuno-histoquímica dos marcadores celulares.....	54
Tabela 4 – Marcação imuno-histoquímica da expressão de p53	54
Tabela 5 – Período de tempo em dias aproximados do aparecimento de sinais clínicos até o óbito.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Meningioma Transicional, Poodle, caso 1; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm56
- Figura 2 – Papiloma de plexo coroide, Rottweiler, caso 2; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm56
- Figura 3 – Sarcomatose meiningeal difusa, SRD, caso 3; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm56
- Figura 4 – Meningioma Transicional, SRD, caso 4; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm57
- Figura 5 – Astrocitoma fibrilar, pastor alemão, caso 5; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm57
- Figura 6 – Xantoastrocitoma pleomórfico, Poodle, caso 6; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm57
- Figura 7 – Schwannoma, Rottweiler, caso 7; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm58
- Figura 8 – Meningioma angiomatoso, Labrador, caso 8; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μm58

- Figura 9 – Astrocitoma anaplásico, Poodle, caso 9; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm.....58
- Figura 10 – Meningioma papilar, Pastor Belga, caso 10; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm.....59
- Figura 11– Tumor do Parênquima Pineal de Diferenciação Intermediária, SRD, caso 11; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm59
- Figura 12 – Meningioma transicional, Boxer, caso 12; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm.....59
- Figura 13– Meningioma meningotelial, Golden Retriever, caso 13; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm60
- Figura 14 – Ependimoma anaplásico, Boxer, caso 14; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm.....60
- Figura 15 – Meningioma meningotelial, Pastor Alemão, caso 15; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm60
- Figura 16 – Meduloblastoma, Cocker Spaniel, caso 16; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm.....61
- Figura 17 – Meningioma anaplásico, Cocker Spaniel, caso 17; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das

células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x –
barra 25 μm 61

Figura 18 – Neuroblastoma olfatório, Poodle, caso 18; (A) Núcleos das células
tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células
tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25
 μm61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µm – Micrometro

CD133 – Cluster de diferenciação 133

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CgA – Cromogranina A

DAB – Diaminobenzidina

DP – Desvio padrão

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EMA – Antígeno epitelial de membrana

FvW – Fator Von Willebrand / Fator 8 da cascata de coagulação

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HE – Hematoxilina e eosina

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

kDa – KiloDalton

Ki-67 – Proteína Ki-67

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LOH – Perda de heterozigose

M – Molar

MIB-1 – Molecular immunology Borstel 1

NSE – Enolase neuronal específica

NFP – Proteína neurofilamentar

PBS – Tampão fosfato salino

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PNET – Tumor de parênquima pineal de diferenciação intermediária

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

S100 – Proteína S-100

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SYN – Sinaptofisina

USP – Universidade de São Paulo

VIM – Vimentina

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 SISTEMA NERVOSO.....	19
2.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO E FREQUÊNCIA	20
2.3 CLASSIFICAÇÕES EM CÃES	24
2.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	29
2.5 MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	30
2.6 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E P53.....	32
2.7 ALTERÇÕES GENÉTICAS DOS TUMORES CEREBRAIS	34
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODO	40
4.1 ANIMAIS	40
4.2 NECRÓPSIA, COLHEITA DE MATERIAL E FIXAÇÃO	41
4.3 PROCESSAMENTO E INCLUSÃO	42
4.4 CONFECÇÕES DE LÂMINAS PARA HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA...	42
4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	44
4.6 ANÁLISE DE IMAGENS	46
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	62
6.1 DISTRIBUIÇÃO SEXUAL E DA IDADE DOS CÃES ACOMETIDOS	62
6.2 PREVALÊNCIA DOS TUMORES ENTRE AS RAÇAS.....	65
6.3 DISTRIBUIÇÃO DOS TUMORES NA POPULAÇÃO ESTUDADA	66
6.4 MARCADORES CELULARES E DESCRIÇÃO DOS TUMORES.....	68
6.5 ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	74
6.6 TEMPO DE EVOLUÇÃO CLÍNICA	77
6.7 EXPRESSÃO DE P53.....	78
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

O estudo das alterações neoplásicas do sistema nervoso (SN) de cães apresenta enorme desafio devido suas particularidades, como o local de ocorrência dessas neoplasias, não apenas pela dificuldade de acesso aos tumores, mas também pela carência de conhecimento desses neoplasmas que são raras em todas as espécies em que ocorrem. Devido ao contínuo avanço da qualidade de vida e tratamento dos animais, diagnósticos de tumores provenientes do SN passam a ser mais frequentes e não devem ser ignorados quando um cão com idade avançada começa a apresentar distúrbios neurológicos (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995a). Entre as espécies de animais domésticos o cão *Canis familiares* é o que apresenta a maior ocorrência destes neoplasmas, porém diagnósticos e descrições de casos são escassos no nosso país. Os tumores podem ser primários, com origem no próprio tecido nervoso, ou secundários, proveniente de metástases com origem em outros tecidos, que não serão avaliados no presente estudo (KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Há uma necessidade de descrições da ocorrência de casos para possibilitar estudos populacionais, estes estudos trarão benefícios para o entendimento dos neoplasmas na espécie canina e a comparação com a espécie humana será mais acurada, possibilitando o uso do cão como modelo animal com ocorrência natural para estas enfermidades, tanto para o teste de novas terapias quanto para produzir ciência básica relacionada aos tumores para serem posteriormente utilizadas (GAVIN; FIKE; HOOPES, 1995; KIMMELMAN; NALBANTOGLU, 2007). A avaliação de marcadores de proliferação celular é muito importante para caracterizar o grau de crescimento do tumor em questão, no momento em que foi coletado, seja por excisão cirúrgica, biópsia ou coleta *postmortem*, criando assim a correlação entre a morfologia do neoplasma e o comportamento proliferativo tumoral (DABBS, 2006). A importância dessa avaliação é informar quais são as chances de recorrência tumoral e o tempo de remissão do tumor conforme os índices encontrados. O estudo das proteínas que atuam na integridade do genoma e agem contra a formação de neoplasias, mostram os possíveis caminhos da patogênese dos processos que levam a cada neoplasma (THOMSON et al., 2005).

A idade média para o aparecimento de tumores em geral na população de cães é a partir da idade adulta, o que não é diferente nos tumores intracranianos provenientes do SN, no qual há um aumento da frequência que acompanha o envelhecimento dos cães sendo que o maior número de casos se concentra em faixas etárias adulto-velho (MEUTEN, 2002; KOESTNER; HIGGINS, 2002). Este fato é bem conhecido e geralmente é como se comportam a maioria das neoplasias, pois para alterações genéticas gerarem um neoplasma é necessário ocorrer um acúmulo dessas alterações além de um subterfúgio aos sistemas de defesa do organismo, que se tornam mais esperados conforme o envelhecimento do animal (BOLLAND; RICCIARDIELLO, 1999; ROBBINS, 2005).

Este estudo mostra os dados relativos ao comportamento histológico e imuno-histoquímico de tumores que foram obtidos no período de 2002 até 2008, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, os dados referentes à abordagem e comportamento clínico foram apresentados em forma de dissertação neste mesmo departamento por Diniz (2007). Alguns casos tiveram seu perfil imuno-histoquímico de marcadores celulares apresentados na dissertação de Diniz (2007) e serão discutidos em conjunto com todos os casos apresentados nesta dissertação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura visa compilar a produção científica relevante de forma sistemática e organizada conforme o propósito da dissertação e para melhor entendimento foi dividida nos tópicos a seguir para melhorar o entendimento e expressar os pontos com maior liberdade.

2.1 SISTEMA NERVOSO

Antes de comentar sobre a tumorigênese e os tipos tumorais que acometem o sistema nervoso (SN), serão citados quais são os constituintes celulares normais deste tecido.

O sistema nervoso central (SNC) é composto por células da glia, neurônios, células meningeais e células vasculares (ROBBINS, 2005). A célula mais nobre e que confere a função cognitiva, motora e sensorial é o neurônio. As células da glia que primordialmente foram chamadas de *nervenkitt* ou “cola dos neurônios”, realmente dão estrutura e suporte para que ocorra o funcionamento apropriado de todo o sistema nervoso (DERMIETZEL; SPRAY, 1998). Entre as células da glia há uma divisão das que são derivadas do neuroectoderma e das que são derivadas da medula óssea, elas são representadas respectivamente pela macroglia provenientes do neuroectoderma e a microglia proveniente da medula óssea. Entre os tipos celulares da macroglia temos astrócitos, oligodendrócitos e epêndima, enquanto que as células da microglia são os macrófagos residentes e quiescentes do SNC (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000; ROBBINS, 2005).

Embora a função das células da glia seja oferecer aos neurônios um ambiente viável para o seu funcionamento, elas carregam consigo as mesmas características próprias singulares e específicas. Os astrócitos são responsáveis por controlar o fluxo de substâncias formando junto aos vasos o pé astrocitário, que ao se estabelecerem ao redor dos vasos sanguíneos envolvendo-os em adição as junções ocludentes presentes entre as células endoteliais desses vasos, constituem a barreira hematoencefálica (BHE) (DERMIETZEL, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO,

2000; ROBBINS, 2005). Os astrócitos também funcionam como um compartimento único no transporte de íons e água, através de suas abundantes junções comunicantes (DERMIETZEL, 1998). Além disso, eles sustentam e são os responsáveis pela cicatrização do SNC (ROBBINS, 2005).

Os oligodendrócitos são os isolantes dos axônios presentes no SNC, e seu correspondente no sistema nervoso periférico (SNP) é a célula de Schwann. Sua função é formar a bainha de mielina ao redor dos axônios para possibilitar a transmissão do potencial de ação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). Diferente da célula de Schwann em que uma célula é responsável por um internodo, um oligodendrócito pode ser responsável por formar vários internodos em múltiplos axônios (ROBBINS, 2005).

As células ependimais que são as células que revestem o sistema ventricular são responsáveis pelo movimento do líquido cefalorraquidiano (LCR), no seu trajeto a partir dos ventrículos laterais, onde o LCR é produzido, pelo terceiro ventrículo e subsequentemente pelo quarto ventrículo até atingir o espaço sub-meningeal onde o LCR será absorvido pelas meninges (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000; ROBBINS, 2005). As meninges são responsáveis por revestir todo o SNC e conter dentro da câmara criada pelas meninges o LCR em uma embalagem a prova de vazamentos, isto é importante para manter uma pressão intracraniana constante e homogênea que é necessária para manter o funcionamento ideal do SN, como por exemplo, no movimento de se levantar, correr ou abaixar a cabeça. Além disso, as meninges regulam a reabsorção do LCR após o fluxo por todo o sistema recoberto por elas para manter o equilíbrio entre a quantidade de LCR produzido e a quantidade de LCR reabsorvido para o volume permanecer constante (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995).

2.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO E FREQUÊNCIA

Os tumores do sistema nervoso central têm inúmeras peculiaridades que os separam de processos neoplásicos de outras partes do organismo. Primeiramente, a distinção entre neoplasmas benignos e malignos é mais tênue no tecido nervoso que em outros órgãos. Como exemplo, existem alguns tumores gliais mesmo com

características histológicas de um tumor benigno incluindo: baixo índice mitótico, uniformidade celular e até crescimento lento, podem infiltrar grande regiões do cérebro levando a sérios déficits clínicos e um prognóstico ruim. Da mesma maneira, tumores meningeais com características histológicas malignas como: alto índice mitótico, crescimento rápido e pleomorfismo celular, podem não infiltrar o neurópilo ou parênquima cerebral, ser circunscrito e apresentar apenas efeito de massa ao encéfalo (JUBB; HUXTABLE, 2007; ROBBINS, 2005).

Também a ressecção cirúrgica usualmente envolve comprometimento de funções neurológicas mesmo para casos simples e superficiais. O sítio anatômico do neoplasma pode ter consequência letal independente da classificação histológica, como um tumor benigno não infiltrativo que comprime a ponte e seus centros cardiorrespiratórios podendo causar a parada destas funções (ROBBINS, 2005).

Os tumores do sistema nervoso são neoplasias oriundas das células que compõe o tecido nervoso, consistindo na transformação genética dessas células em favor do seu próprio crescimento e proliferação, de forma desacoplada do controle homeostático do ciclo celular. As características dessas neoplasias estão relacionadas intimamente com o tipo celular de origem e, por conseguinte, definindo o comportamento tumoral como um todo: a invasividade da massa tumoral no tecido nervoso, a velocidade de crescimento da neoplasia, a localização em relação ao neuroáxis, a resposta aos tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos, as características morfológicas e o padrão imuno-histoquímico (JUBB; HUXTABLE, 2007; ROBBINS, 2005).

Toda neoplasia intracraniana compartilha mecanismos os quais danificarão as funções do sistema nervoso, massas neoplásicas em crescimento tendem a deslocar as estruturas adjacentes e ocupar os espaços dos tecidos normais. No interior da caixa craniana qualquer aumento de volume, causa a compressão do tecido nervoso sadio, que está aprisionado em sua ossatura protetora, podendo causar aumento da pressão intracraniana, edema peritumoral, acidentes vasculares isquêmicos e hemorrágicos, herniação, dilatação ventricular e degeneração (JOHNSON, 1990; SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995a).

Observações de sinais clínicos correspondem às manifestações das alterações do tecido nervoso em sofrimento, a convulsão pode ser o primeiro sinal de um tumor cerebral e isso tem grande valor na avaliação do animal, pois identifica com a realização de exame físico minucioso o possível grau de acometimento e

localização do neoplasma além de corroborar com o acompanhamento do tratamento. Muitos animais com tumores encefálicos podem apresentar sintomas vagos como mudança de comportamento por até um ano antes de ocorrer outros sintomas neurológicos (MOORE et al., 1996; BAGLEY et al., 1999).

Estudos mais aprofundados com tumores intracranianos na espécie humana têm postulado que a origem de vários tumores do SNC é proveniente das células-tronco, que estão presentes no tecido nervoso para efetuar o reparo do mesmo em casos de injúria e remodelamento nas várias funções em que o SNC é exigido (SUN et al., 2004). Isto se deve a descoberta de marcadores presentes nas células-tronco em seus nichos e meios de migração que também se fazem presentes em algumas células tumorais. Um desses marcadores é o CD133 que tem se mostrado com grande entusiasmo diferenciar os clones tumorais em que há várias características de uma célula-tronco, que neste caso são nocivas ao organismo por que tiveram seu material genético alterado de modo a apresentarem um comportamento agressivo frente ao meio, crescimento descontrolado e resistência as terapias empregadas como quimioterapias e radioterapias (SINGH et al., 2003). Tem sido relacionado a esse marcador a heterogeneidade da massa tumoral conferindo ao neoplasma subterfúgios para sobreviver mesmo após tratamentos múltiplos, escapando dos tratamentos mesmo que poucos, os clones resistentes voltam a se desenvolver com curso rápido e fatal da doença, um tipo tumoral que tem esse comportamento e serve como bom exemplo deste acometimento fatal é o glioblastoma multiforme (BEIER et al., 2007).

No cão os tumores primários do SN são as neoplasias intracranianas mais frequentes enquanto que metástases e tumores secundários do SN são menos frequentes (MOORE et al., 1996; KOSTNER; HIGGINS, 2002). Entre as neoplasias do SNC que tem ocorrência natural em cães, quase todas tem o seu tumor correlacionado em humanos, isto corrobora para o desenvolvimento de estudos comparativos entre as espécies em uma tentativa de explicar a patogenia desses processos deletérios ao organismo, além de confirmar pelo postulado de Koch estas enfermidades como doenças estabelecidas, com a confirmação da doença de humanos em animais (KOESTNER et al., 1999, KLEIHUES; CAVENEE, 2000). Estudos preliminares apresentaram uma relação muito próxima entre a patogenia das neoplasias nas espécies humana e canina e o uso de cães como modelo de

estudo para neoplasias do SNC vem sendo sugerido pela comunidade científica (KIMMELMAN et al., 2007).

Cerca de 60-80% das neoplasias do SNC de animais domésticos são diagnosticadas em cães, seguido de 10-20% na espécie felina, restando de 10-20% para diagnósticos nas demais espécies domésticas. Nos cães, incidência em relação a idade começa a aumentar e se tornar significativa em animais com mais de 6 anos. (KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Nos cães os tipos tumorais mais frequentes são os tumores das meninges, que são responsáveis pela grande maioria dos casos com 45-50% do total de tumores acometendo o SN de cães (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995b; BARNHART; WOJCIESZYN; STORTS, 2002; KOESTNER; HIGGINS, 2002; THOMSON et al., 2005; GRECO et al., 2006), enquanto que em humanos os tipos tumorais mais frequentes são os gliomas, mais especificamente os tumores com componente astrocitário, o tumor intracraniano mais frequente em humanos é o glioblastoma multiforme (GBM) ou astrocitoma de grau IV, tipo de astrocitoma mais agressivo e com prognóstico ruim, que conta com aproximadamente 12-15% do total de tumores do SN e 50-60% dos tumores astrocitários (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; ROBBINS, 2005). Nos cães os gliomas, tumores das células gliais, estão em segundo lugar quanto ao número de ocorrências ficando atrás dos tumores provenientes das meninges, meningiomas (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995; KOESTNER; HIGGINS, 2002; THOMSON et al., 2005). Por esse motivo em cães GBM conta apenas com 5% do total de astrocitomas, sendo relativamente raros nesta espécie. O GBM de cão também compartilha alta semelhança com GBM humano em vários aspectos (LIPSITZ et al., 2003).

Em humanos e animais meningiomas são tumores de crescimento lento e benignos na maior parte das vezes, não invasivos, pois salvo exceções são neoplasias extra-axiais aderidas à dura-máter e esses tumores crescem a partir das células da aracnóide (KOESTNER et al., 1999; KLEIHUES; CAVENEE, 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002; ROBBINS, 2005).

O meduloblastoma apesar de ser um tumor comum em crianças, ele é um tumor raro em animais, em cães ao contrário de humanos têm se observado casos desse tipo tumoral em cães idosos (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002; VIOLIN et al., 2006).

2.3 CLASSIFICAÇÕES EM CÃES

A classificação dos processos de origem neoplásica é um meio de comunicação essencial entre o patologista e o clínico. Na Medicina Veterinária a neurooncologia ainda se encontra numa fase muito elementar. Isto se deve ao reduzido número de relatos de casos e de estudos retrospectivos (KOESTNER; HIGGINS, 2002). Já podemos observar o surgimento de alguns relatos na literatura nacional especializada (SCAMARAL; CHAVES, 1999; HATAKA et al., 2003; MAIORKA et al., 2005; VIOLIN et al., 2006; VIOLIN et al., 2007).

Em nosso estudo a classificação dos tumores será baseado no **The WHO International** “Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals” e no proposto por Koestner e Higgins (2002). Esta separação visa classificar os tumores de uma forma coesa e organizada com o intuito de deixar o menor número de lacunas, próxima à classificação humana. Da mesma forma, instituir um padrão de descrição para que haja uma homogeneidade no intercâmbio das informações com qualquer que seja o nível da comunicação, se, com profissionais, com instituições e entre países.

Relacionada ao enfoque da pesquisa, a classificação consiste em um agrupamento maior dos tumores separados em relação a sua origem. Estes agrupamentos maiores estão divididos em (1) tumores do tecido neuroepitelial, (2) tumores das meninges, (3) linfomas e tumores hematopoiéticos, (4) tumores da sela túrcica, (5) outros tumores primários e cistos, e por último (6) tumores do sistema nervoso periférico. A partir deste agrupamento serão organizados em seqüência de acordo com o tipo celular que o tumor provém. Cada item será comentado e pontuado com o número de referência correspondente.

Nos (1) tumores do tecido neuroepitelial, temos os (1.1) tumores astrocíticos que se subdividem em três classes conforme o grau de malignidade: (1.1.1) astrocitoma de baixo-grau [bem diferenciado], (1.1.2) astrocitoma de médio-grau [anaplásico] e (1.1.3) astrocitoma de alto-grau [glioblastoma]. No (1.1.1) astrocitoma de baixo-grau teremos três formas possíveis: (1.1.1.1) astrocitoma fibrilar, (1.1.1.2) astrocitoma protoplasmático e (1.1.1.3) astrocitoma gemistocítico.

Ainda nos (1) tumores do tecido neuroepitelial teremos: os (1.2) tumores oligodendrogliais nas formas de (1.2.1) oligodendroglioma e (1.2.2) oligodendroglioma anaplásico [maligno]; os (1.3) outros gliomas nas formas de (1.3.1) gliomas mistos [oligoastrocitoma], (1.3.2) gliossarcoma, (1.3.3) gliomatose cerebral e (1.3.4) espongiblastoma; os (1.4) tumores ependimais nas formas de (1.4.1) ependimoma e (1.4.2) ependimoma anaplásico [maligno]; os (1.5) tumores do plexo coróide nas formas de (1.5.1) papiloma do plexo coróide e (1.5.2) carcinoma do plexo coróide; os (1.6) tumores neuronais e mistos de neurono-gliais apresentados como (1.6.1) gangliocitoma, (1.6.2) ganglioglioma e (1.6.3) neuroblastoma olfatório [esthesioneuroblastoma]; os (1.7) tumores embrionários nas formas de (1.7.1) tumores do neuroectoderma primitivo [PNET] que ainda se dividem em (1.7.1.1) meduloblastoma e (1.7.1.2) PNETs, excluindo os de origem cerebelar, (1.7.2) neuroblastoma, (1.7.3) ependimoblastoma e (1.7.4) tumor tóraco-lombar da medula espinhal de cachorros jovens; e os (1.8) tumores do parênquima pineal nas formas de (1.8.1) pineocitoma e (1.8.2) pineoblastoma.

Os (2) tumores das meninges serão separados em duas partes, uma parte será os (2.1) tumores de células meningoteliais onde teremos os (2.1.1) meningiomas que poderão se apresentar como (2.1.1.1) meningotelial, (2.1.1.2) fibroso [fibroblástico], (2.1.1.3) transicional [misto], (2.1.1.4) psamomatoso, (2.1.1.5) angiomatoso [angioblástico], (2.1.1.6) papilar, (2.1.1.7) célula da granular, (2.1.1.8) mixóide e (2.1.1.9) anaplásico [maligno]. A outra parte será os (2.2) tumores mesênquimais, não-meningoteliais apresentados nas formas de (2.2.1) fibrossarcoma e (2.2.2) sarcomatose meningeal difusa.

Os (3) linfomas e tumores hematopoiéticos se apresentarão como (3.1) linfoma [linfossarcoma], (3.2) neoplasma leucocítico não-B, não-T [reticulose neoplásica], (3.3) microgliomatose e (3.4) histiocitose maligna.

Os (4) tumores da sela túrcica serão divididos em (4.1) tumor de célula germinativa supra-selar, (4.2) adenoma pituitário, (4.3) carcinoma pituitário e (4.4) crâniofaringioma.

Nos (5) outros tumores primários e cistos teremos o (5.1) hamartoma vascular, o (5.2) cisto epidermóide, o (5.3) cisto pituitário e (5.4) outros cistos.

Por último da classificação veterinária teremos (6) tumores do sistema nervoso periférico que compreendem o (6.1) ganglioneuroma, (6.2) neuroblastoma periférico, (6.3) paraganglioma e o (6.4) tumor da bainha nervosa periférica que se subdividem em (6.4.1) benigno, schwannoma, neurofibroma e (6.4.2) maligno, schwannoma maligno e neurofibrosarcoma.

As informações escritas acima estão compiladas em dois quadros, a primeira parte no (Quadro 1) e a segunda parte no (Quadro 2).

Desta forma os casos que forem relatados aqui e se diferenciarem dos padrões estabelecidos pelo *The WHO - Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals - AFIP*, Koestner et al. (1999), será seguido o padrão do “Blue Book”, *The WHO Classification of Tumours - Pathology & Genetics of Tumours of the Nervous System - IARC*, Kleihues e Cavenee (2000).

1. Tumores do tecido neuroepitelial
 - 1.1 Tumores astrocíticos
 - 1.1.1 Astrocitoma de baixo-grau (bem diferenciado)
 - 1.1.1.1 Astrocitoma fibrilar
 - 1.1.1.2 Astrocitoma protoplasmático
 - 1.1.1.3 Astrocitoma gemistocítico.
 - 1.1.2 Astrocitoma de médio-grau (anaplásico)
 - 1.1.3 Astrocitoma de alto-grau (Glioblastoma)
 - 1.2 Tumores oligodendrogliais
 - 1.2.1 Oligodendroglioma
 - 1.2.2 Oligodendroglioma anaplásico (maligno)
 - 1.3 Outros Gliomas
 - 1.3.1 Gliomas mistos (oligoastrocitoma)
 - 1.3.2 Gliossarcoma
 - 1.3.3 Gliomatose cerebral
 - 1.3.4 Espongioblastoma
 - 1.4 Tumores ependimais
 - 1.4.1 Ependimoma
 - 1.4.2 Ependimoma anaplásico (maligno)
 - 1.5 Tumores do plexo coróide
 - 1.5.1 Papiloma do plexo coróide
 - 1.5.2 Carcinoma do plexo coróide
 - 1.6 Tumores neuronais e mistos de neurono-gliais
 - 1.6.1 Gangliocitoma
 - 1.6.2 Ganglioglioma
 - 1.6.3 Neuroblastoma olfatório (esthesioneuroblastoma)
 - 1.7 Tumores embrionários
 - 1.7.1 Tumores do neuroectoderma primitivo (PNET)
 - 1.7.2 Neuroblastoma
 - 1.7.3 Ependimoblastoma
 - 1.7.4 Tumor tóraco-lombar da medula espinhal de cachorros jovens
 - 1.8 Tumores do parênquima
 - 1.8.1 Pineocitoma
 - 1.8.2 Pineoblastoma

Quadro 1- Classificação dos tumores do sistema nervoso por Koestner et al. (1999), primeira parte

- 2. Tumores das meninges
 - 2.1 Tumores de células meningoteliais
 - 2.1.1 Meningiomas
 - 2.1.1.1 Meningotelial
 - 2.1.1.2 Fibroso (fibroblástico)
 - 2.1.1.3 Transicional (misto)
 - 2.1.1.4 Psamomatoso
 - 2.1.1.5 Angiomatoso (angioblástico)
 - 2.1.1.6 Papilar
 - 2.1.1.7 Célula da granular
 - 2.1.1.8 Mixóide
 - 2.1.1.9 Anaplásico (maligno)
 - 2.2 Tumores mesênquimais, não-meningoteliais
 - 2.2.1 Fibrossarcoma
 - 2.2.2 Sarcomatose meningeal difusa
- 3. Linfomas e tumores hematopoiéticos
 - 3.1 Linfoma (linfossarcoma)
 - 3.2 Neoplasma leucocítico não-B, não-T (reticulose neoplásica)
 - 3.3 Microgliomatose
 - 3.4 Histiocitose maligna
- 4. Tumores da sela túrcica
 - 4.1 Tumor de célula germinativa supra-selar
 - 4.2 Adenoma pituitário
 - 4.3 Carcinoma pituitário
 - 4.4 Crâniofaringioma
- 5. Outros Tumores primários e cistos teremos
 - 5.1 Hamartoma vascular
 - 5.2 Cisto epidermóide
 - 5.3 Cisto pituitário
 - 5.4 Outros cistos
- 6. Tumores do sistema nervoso periférico
 - 6.1 Ganglioneuroma
 - 6.2 Neuroblastoma periférico
 - 6.3 Paraganglioma
 - 6.4 Tumor da bainha nervosa periférica
 - 6.4.1 Benigno (schwannoma, neurofibroma)
 - 6.4.2 Maligno (schwannoma maligno e neurofibrosarcoma)

Quadro 2- Classificação dos tumores do sistema nervoso por Koestner et al. (1999), segunda parte

2.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Imuno-histoquímica (IHQ) é a técnica histoquímica capaz de localizar antígenos específicos em tecidos ou células baseada no reconhecimento antígeno-anticorpo. Esta técnica busca explorar a especificidade intrínseca da ligação entre um anticorpo com seu antígeno no âmbito da microscopia óptica. Ao longo dos anos, o desenvolvimento da técnica da IHQ trouxe benefícios melhorando a sensibilidade e especificidade dos sistemas de detecção (DABBS, 2006). Entre os sistemas com bom desempenho de detecção, estão aqueles que combinam marcação enzimática com substrato cromogênico, associados com métodos de passos múltiplos para o reconhecimento e amplificação dos sinais.

A grande vantagem desta técnica, além do reconhecimento de marcadores e tipos celulares, é sua aplicabilidade em tecidos fixados e emblocados em parafina, propiciando grande facilidade no manejo dos materiais a serem estudados, pela reprodutibilidade que ocorre devido à fácil obtenção de novos cortes de tecido para a realização da técnica de IHQ (DABBS, 2006).

Um grande passo para a funcionalidade desta técnica, além dos métodos de reconhecimento, é a capacidade de recuperar a apresentação dos antígenos para estes poderem ser ligados nos seus respectivos anticorpos. A utilização de tampões com pH variável para cada classe de antígenos celulares, sejam eles nucleares, citoplasmáticos ou de requisição específica; combinados com aquecimento em forno de microondas ou mesmo em panela de pressão, revolucionaram a capacidade de obter resposta com a técnica de IHQ. Outros métodos também eficientes como recuperação antigênica enzimática são utilizados, funcionando muitas vezes com a utilização de proteinases que cortam as proteínas e facilitam a apresentação dos antígenos (SIRICA, 1996; SHI et al., 1998; DABBS, 2006).

Outro marco que determinou a eficiência na utilização de IHQ está ligado aos anticorpos em si. A capacidade e o desenvolvimento da obtenção de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas definem que na alíquota dos anticorpos obtidos há apenas um clone de hibridoma produtor e a especificidade proveniente dessas alíquotas se tornam muito mais confiáveis e precisas. Anticorpos policlonais ainda são de grande valia apesar de serem compostos de uma gama de clones celulares produtores de imunoglobulinas. A especificidade dos anticorpos monoclonais, nem

sempre devem ser colocados a frente da maior abrangência dos anticorpos policlonais. Algumas vezes alterações no epítopo são reconhecidas como mutações pontuais ou interações naturais, conformacionais ou artefatuais; podendo diminuir ou até impedir totalmente a marcação IHQ quando do uso de um anticorpo monoclonal. Do mesmo modo, proteínas diferentes com epítomos semelhantes podem induzir uma resposta cruzada quando do uso de um anticorpo policlonal. Isto mostra que o desenvolvimento de novas técnicas de obtenção de anticorpos bem como a melhora na qualidade dos mesmos, não impede ou inutiliza seus predecessores, mas exige o uso racional dos mesmos adequando cada um a sua necessidade (DABBS, 2006).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas foi de extrema importância na comunidade científica (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), sendo posteriormente laureado com o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina no ano de 1984, os três cientistas que desenvolveram esse método e dividiram o prêmio foram o argentino César Milstein, o dinamarquês Niels K. Jerne e o alemão Georges J. F. Köhler (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/index.html). Este acontecimento trouxe muito mais crédito à técnica de IHQ e sua difusão para a medicina diagnóstica auxiliando o trabalho dos patologistas em reconhecimento de tumores, que sempre apresentarão um grande desafio ao diagnóstico dado a sua natureza (DABBS, 2006).

2.5 MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Todas as células expressam proteínas específicas e não específicas durante sua vida, que são responsáveis pelas funções celulares no tecido a que elas pertencem (ALBERTS, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2007). Além de executarem suas funções essas proteínas são a identidade de algumas células e também podem evidenciar a possível origem das mesmas. Células tumorais muitas vezes perdem a diferenciação celular e não compartilham nenhuma semelhança com o tecido progenitor (ROBBINS, 2005). Com o auxílio de ferramentas diagnósticas como a técnica de IHQ, proteínas podem ser utilizadas como alvos de marcadores celulares com o intuito de identificar o possível tipo celular e o padrão de expressão proteica de tumores (DABBS, 2006).

Os marcadores para o SN são tanto específicos quanto gerais dependendo do tipo tumoral a ser avaliado. Os marcadores específicos são aqueles que são expressos em tecido especializado neural como: proteína ácida fibrilar glial (GFAP), expressa em tumores de astrócitos; enolase específica neural (NSE), expressa em células com diferenciação neuronal ou neuroblástica; sinaptofisina (SYN) e cromogranina A (CgA), expressa por células com membranas sinápticas; proteína do neurofilamento (NFP), uma proteína filamentar expressa em células do neuroectoderma; proteína S-100 (S100), uma proteína expressa difusamente por múltiplas células de origem neural embora presentes em células que não do SN (KOSTNER et al., 1999; KLEIHUES; CAVENEE, 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002; ROBBINS, 2005; DABBS, 2006). Os marcadores não específicos são responsáveis por identificar algumas especializações ou tecidos que não tem origem neural como: vimentina (VIM), expressa em células com origem mesenquimal; citoqueratina (CTK), expresso por células com componente epitelial diferenciado; fator de Von Willebrand (FvW), expresso em células endoteliais; antígeno da membrana epitelial (EMA), expresso no plasmalema de células com origem epitelial (ROBBINS, 2005; DABBS, 2006).

Os marcadores GFAP, VIM, NFP, CTK são proteínas do filamento intermediário e não podem ser distinguidas morfologicamente em nível ultraestrutural, todas elas compartilham homologias estruturais e têm um peso molecular que varia entre 40 e 200 kDa, essa relação mostra por que alguns anticorpos direcionados a CTK podem apresentar uma fraca reação cruzada com GFAP (DABBS, 2006).

A proteína S-100 tem seu nome derivado do fato de ser solúvel em solução de sulfato de amônio saturada (100%), foi primeiramente isolada do CNS, mas além de ser expressa pelas células da glia, neurônios e células de Schwann também é expressa também em melanócitos, condrócitos e células apresentadoras de antígenos (DABBS, 2006).

Os componentes das células neuroendócrinas são CgA, SYN e NSE. CgA pertence a um grupo de proteínas monoméricas que compõe a maior parte do extrato solúvel protéico dos grânulos neurosecretórios das células neuroendócrinas e tem um peso molecular de 75 kDa. SYN é uma glicoproteína que é parte integral da membrana do grânulo secretório neuroendócrino, é um marcador neuroendócrino de amplo espectro com maior sensibilidade e menor especificidade que o anticorpo

contra CgA. NSE é uma forma de enzima enolase encontrada predominantemente no cérebro, tem sua performance em discriminar tumores neuroendócrinos melhorada quando usada em conjunto com os outros marcadores para diferenciação neuroendócrina (DABBS, 2006).

2.6 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E P53

O ciclo celular é uma sequência de processos altamente ordenados que resultam na duplicação de uma célula. Nesses processos, complexos protéicos compostos de ciclinas e quinases ativadas ciclina-dependente desempenham um importantíssimo papel. Determinação de proteínas no controle da proliferação de células contribui para uma melhor compreensão das transformações celulares e dos mecanismos de proliferação (ALBERTS, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2007).

A proteína p53 é um fator de transcrição de 53 kDa responsável pela regulação do ciclo celular, desempenhando funções na supressão tumoral e prevenindo mutações genômicas (ALBERTS, 2002). Ela foi descrita pela primeira vez 1979 e está localizado no cromossomo 17 nos humanos e no cromossomo 5 nos cães. Sua estrutura é composta por uma porção n-terminal, responsável pela ativação dos fatores de transcrição, uma porção central responsável pela ligação com a molécula de DNA, *DNA binding core domain* (DBD) e uma porção c-terminal responsável pelo aumento da atividade da p53 in vivo. Mutações responsáveis pela desativação do p53 geralmente ocorrem na DBD (BOGLER et al., 1995; SIRICA, 1996).

A expressão da proteína p53 é responsável pela integridade genômica e controle do crescimento celular. Ela se liga a várias proteínas e como é um fator de transcrição, regula vários genes responsáveis pelo ciclo celular, angiogênese, apoptose e reparo do DNA (VOLGELSTEIN; KINZLER, 1992). Em células normais pouca quantidade p53 é expressa, localizando-se predominantemente no citoplasma devido sua via de degradação que é acelerada (ALI IU, 1994). Vários tipos de situações de estresse celular podem ativar a expressão de p53, incluindo danos ao DNA. A função da p53 pode ser inativada quando a mesma for mutada ou inibida por produtos oncogênicos virais. O acúmulo citoplasmático ou nuclear de p53 ocorre

quando sua via de degradação está alterada ou quando sua forma mutada não permite o funcionamento da maquinaria enzimática responsável pela sua degradação (HILTON et al., 1998). Muitos tipos tumorais têm alterações em p53: tumores cervicais, pulmonares, esofágicos entre outros incluindo os gliomas provenientes do SNC (KLEIHUES; CAVENNE, 2000). Em humanos além das mutações que são amplamente registradas há também o registro dos polimorfismos e as indicações de suas possíveis atividades diferenciadas como na capacidade de modular a apoptose (BERGAMASCHI et al., 2003).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), também conhecido como ciclina, é uma proteína de aproximadamente 36 kDa encontrada no núcleo e age como co-fator na síntese e reparação do DNA em células eucarióticas, colaborando na estabilidade da DNA polimerase delta sua expressão atinge os níveis mais altos durante as fases G1/S do ciclo celular (MATHEW, 1989; ALBERTS, 2002; DABBS, 2006). Foi identificado originalmente como um auto-anticorpo expresso por pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e metodicamente testado em diversos tecidos normais e tumorais. As marcações desse, então novo, anticorpo eram muito peculiares, como no timo onde o anticorpo marcava positivamente as células do córtex tímico e não marcava nada as células da medula do timo, sabidamente células no córtex tímico estão em divisão enquanto que as células na medula estão em um estágio quiescente. A partir dessas análises outros testes foram desenhados para determinar a especificidade deste anticorpo e quando analisada a marcação de linfócitos após estimulação com lectinas mitogênicas foi conclusivo que o anticorpo marcava algum antígeno nuclear expresso durante a fase de síntese do DNA durante o ciclo celular, assim foi cunhado o nome PCNA (MATHEW, 1989). Posteriormente foi sequenciado e usado para o isolamento do clone de cDNA (MATHEW, 1989; MADEWELL, 2001; ALBERTS, 2002; KAYASEULÇUK et al., 2002; TROCHA et al., 2002; CAPPELLO et al., 2006; DABBS, 2006; JALAVA et al., 2006).

O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histona de ligação ao DNA, seu nome está relacionado com o local onde foi primeiramente estudada, Kiev. Está presente em células em proliferação e ausente em células quiescentes, sendo expressa em todas as fases do ciclo celular exceto no G0 e no início de G1 (GERDES et al., 1984; SCHOLZEN; GERDES, 2000). Por esta razão, é um excelente marcador para diferenciar células em proliferação. A proteína é marcada especificamente pelo

anticorpo monoclonal MIB-1, *molecular immunology Borstel* -1 que recebe o nome do instituto alemão onde foi desenvolvido (DABBS, 2006).

Foi demonstrado em estudos anteriores de imuno-histoquímica um aumento progressivo na expressão de Ki-67 conforme o aumento da malignidade tumoral. Da mesma forma que a expressão de Ki-67 está relacionada com proliferação celular, o aumento e descontrole no crescimento de massas tumorais definem o quão avançado e mais malignizado é o tumor. A expressão de Ki-67 também está correlacionada com a densidade de vasos sanguíneos em um tecido, servindo desta forma como um importante marcador tumoral de neovascularização e angiogênese, fatores estes cruciais nas avaliações de crescimento e invasividade tumoral (GERDES et al., 1984; SCHOLZEN; GERDES, 2000; MADEWELL, 2001; TROCHA et al., 2002; CAPPELLO et al., 2006; DABBS, 2006; JALAVA et al., 2006;).

Quando comparada a eficiência nas marcações entre PCNA e Ki-67 muitos autores tendem a preferir o Ki-67, devido sua maior consistência e uniformidade nas reações, enquanto que o PCNA tende a apresentar um maior desvio padrão quando comparado repetidamente em uma mesma amostra (GERDES et al., 1984; SCHOLZEN; GERDES, 2000; KAYASEULÇUK et al., 2002; DABBS, 2006). Esta observação empírica tem grande coerência quando comparada à detecção das fases do ciclo celular de cada um dos marcadores, onde o Ki-67 tem maior abrangência em relação o PCNA (QUIÑONES-HINOJOSA et al., 2005).

2.7 ALTERÇÕES GENÉTICAS DOS TUMORES CEREBRAIS

As alterações genéticas são as bases para o aparecimento de tumores em qualquer região do corpo, essas alterações têm a característica de impedirem a morte celular, pois se todas as alterações levassem a este fim não haveria tumores e da mesma forma diminuiria a variabilidade genética, os polimorfismos e as adaptações ao meio. Esta peculiaridade acabaria com o potencial tumorigênico dessa célula pela não fixação das suas alterações (ALBERTS, 2002; ROBBINS, 2005). Toda massa tumoral é proveniente de um clone celular que acumula mutações, por isso é dito que tumores são provenientes de uma expansão clonal. Apesar disso a massa tumoral consolidada poderá conter mais de um clone celular o

que não necessariamente significa que vários clones de células se malignizaram juntos, mas sim que um clone precursor deu origem à diferenciação celular em suas células filhas que acumularam diferentes mutações. Mais uma vez essas mutações não podem ser incompatíveis com a vida celular, quanto mais maligno for o tumor mais heterogênea serão suas células, e diferentes clones poderão compor sua massa. Da mesma forma, quanto mais benigna for a neoplasia mais homogêneas serão as células que formam a sua massa tumoral (ROBBINS, 2005).

Esse fato é o que trás os problemas nas terapias contra esses tumores, muitas vezes tratamentos a base de ressecção cirúrgica e quimioterapia pré e pós-cirúrgica são suficientes para livrar um paciente de tumores benignos, algumas vezes pelo resto de sua vida, com remissão total da neoplasia. No entanto neoplasias malignas têm mais esse subterfúgio para evadir os protocolos de tratamento (MEUTEN, 2002; ROBBINS, 2005).

Algumas neoplasias como o GBM em humanos têm uma grande heterogeneidade celular que combinada com o potencial infiltrativo do tumor muito dificilmente poderão ser retirados em sua totalidade por meio cirúrgico, dependendo assim das terapias de suporte como radioterapia, quimioterapia, terapias gênicas e celulares para conter o remanescente tumoral. Entretanto fica muito difícil executar uma única terapia que consiga abranger todas as células tumorais, e tentar manter o máximo de células normais vivas, em qualquer que seja o órgão e em especial o SN. Assim mesmo com terapias combinadas muitas células ainda conseguem sobreviver, por isso a taxa de sobrevivência média para GBM em humanos é de 2 anos para menos de 5% dos casos (KLEIHUES; CAVENNE, 2000; OHGAKI et al., 2004).

O que causa a uma célula passar de seu ciclo celular controlado para um processo orquestrado à imortalidade e benefício próprio, é mais que uma alteração, e a essas alterações não basta estarem presentes no genoma celular, elas devem ser fixadas e promovidas. Estas duas etapas são a base para a progressão de uma célula normal para uma célula tumoral (ROBBINS, 2005).

Dentre os tipos de alterações genômicas que podem ocorrer, temos as deleções de bases e substituições de bases, que podem ser pontuais ou amplas o suficiente para induzir erros na leitura da fita de DNA e impedir a produção da proteína específica, estimular a produção constitucional (sem parar) da proteína específica (ROBBINS, 2005). Lembrando que as alterações deletérias ao funcionamento normal da célula não se restringem aos exons que são as regiões de

onde se transcrevem as proteínas, alterações nas regiões intrônicas, introns, podem induzir uma parada prematura na transcrição da fita de RNAm e assim truncar a proteína que seria produzida, ou até mesmo induzir um *splicing* alternativo que deixa a proteína inativa para sua função (UNO et al., 2005).

Além dessas alterações que induzem deleções de vários tipos, podemos ter também adições no genoma que subvertem a maquinaria celular para a tumorigênese, como adição de regiões indutoras de transcrição em genes que antes não eram expressos, repetições de sequências de genes aumentando o número de RNAm sendo produzidos por estes devido sua quantidade aumentada no DNA celular. Essas adições podem ocorrer também na forma de translocações simples entre diferentes braços cromossômicos como no caso da translocação entre os cromossomos 9 e 22 fusionando dois genes, o BCR e o ABL, formando o oncogene BCR-ABL indutor da leucemia mieloide crônica. A perda de um dos alelos cromossômicos também pode induzir uma neoplasia quando a cópia do alelo que permaneceu no DNA é um gene mutado ou defeituoso, esse acontecimento se chama perda da heterozigose ou do inglês *loss of heterozygosity* (LOH) (ALBERTS, 2002; ROBBINS, 2005).

Os subterfúgios para induzir um tumor são muitos e não ocorrem isoladamente, como já foi citada, a tumorigênese envolve além da não expressão de certas proteínas, como a p53 que é considerada a guardiã do genoma, ou a expressão de oncogenes, mas também envolve a capacidade da célula evadir todas as tentativas de apoptose (morte celular programada), se autoestimular com sinalizações de crescimento, se tornar insensível aos sinais inibidores de crescimento, ter um reparo de DNA defeituoso, ter um potencial replicativo sem limite, sustentar a angiogênese e adquirir a habilidade de romper membranas se desprender de uniões celulares, invadir outros tecidos e metastizar (ROBBINS, 2005).

O número de quantas mutações são necessárias para desenvolver uma neoplasia, depende do seu tipo tumoral, da célula precursora e da sua característica se benigno ou maligno. Estudos mostram que em média são necessárias aproximadamente 10 alterações em pontos críticos do genoma celular para induzir uma transformação tumoral, o que não corresponde exatamente com a realidade, pois as alterações ocorrem ao acaso. Por esse motivo em tumores consolidados como o câncer colorectal esporádico após análise por microarranjos de cDNA (cDNA

microarrays), foram encontradas pelo menos 11.000 alterações genéticas por célula tumoral. Isso ocorre nessas proporções exatamente por que o sistema de reparo do DNA está danificado e o fato de que as únicas alterações no genoma que são deletérias para uma célula tumoral, serem aquelas que induzem a sua própria morte ou impeçam a sua replicação contínua. Contudo, os acontecimentos aleatórios que atingem a integridade do genoma, sejam eles químicos, físicos ou biológicos, têm a mesma probabilidade de atingir uma parte crítica do genoma ou uma área de repetição de bases (BOLLAND; RICCIARDIELLO, 1999; ROBBINS, 2005).

As alterações mais importantes que ocorrem no SN são amplamente estudadas em seres humanos e é uma área que vêm sendo explorada na medicina veterinária com estudos em cães (KLEIHUES; CAVENNE, 2000; BERGAMASCHI et al., 2003; OHGAKI et al., 2004; STOICA et al., 2004; THOMSON et al., 2005).

Até o momento em que esse parágrafo foi escrito, na base de dados de mutações em TP53 da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) a contagem de mutações somáticas está no número de 24.785 (<http://www-p53.iarc.fr/Statistics.html>), TP53 é o nome do gene correspondente da proteína p53.

As alterações no gene TP53 em conjunto com as alterações no gene PTEN, que também é um gene supressor de tumores, são estudadas em astrocitomas, pois são as mais frequentemente encontradas em GBM, inclusive na diferenciação das duas formas de aparecimento dessa neoplasia (KLEIHUES; CAVENNE, 2000; OHGAKI et al., 2004).

O GBM em humanos pode surgir de duas formas, primário ou *de novo*, sem qualquer diagnóstico prévio de neoplasia com as alterações no DNA e LOH levando diretamente ao GBM, ou secundário, proveniente de astrocitomas de graus mais baixos que continuaram a acumular alterações ou LOH e se malignizaram até se tornarem um GBM (KLEIHUES; CAVENNE, 2000; OHGAKI et al., 2004). Em cães ainda não há a diferenciação destas duas formas de GBM, apenas o diagnóstico em função do seu aspecto e não em função da sua gênese (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002; STOICA et al., 2004), embora estudos como em Stoica et al., (2009) estejam avaliando as vias que levam a tumorigenese de GBM em cães. Com os estudos populacionais envolvendo GBM pode se determinar que apesar da neoplasia resultante em ambos os casos de GBM, primário e secundário, terem a mesma semelhança no aspecto histopatológico final, existem dois caminhos genéticos diferentes para eles. O GMB primário ou *de novo*, em ~40% dos casos

estudados há amplificação do gene EGFR, em ~30% dos casos foram encontradas mutação no gene TP53 e mutação em ~30% dos casos no gene PTEN. Esses números são bem diferentes no GBM secundário, no qual a ampliação do gene EGFR é de ~5%, seguido de ~65% de mutação em TP53 e ~5% de mutação em PTEN (KLEIHUES; CAVENNE, 2000; OHGAKI et al., 2004).

Em estudos com meningiomas os padrões de expressão dos genes nesses tumores em cães e em humanos apresentaram muitas semelhanças, alguns dos genes que têm a expressão aumentada em meningiomas de ambas as espécies são os genes das proteínas ribossomais, LAMP1 e RAB9; alguns dos genes que apresentaram a expressão diminuída são o gene CREG e NCAM (THOMSON et al., 2005). A alteração genética mais comum em meningiomas de humanos está relacionada ao gene NF2 e a LOH do cromossomo 22q (KLEIHUES; CAVENNE, 2000).

3 OBJETIVOS

Os objetivos desta dissertação foram divididos em gerais e específicos, que visam apresentar de forma clara os propósitos do trabalho realizado.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar necropsias, colheita de material e descrição do diagnóstico histopatológico dos casos, classificando as neoplasias de acordo com Koestner, et al. (1999) WHO, Koestner e Higgins (2002).

Avaliar pela técnica de imuno-histoquímica marcadores da proliferação celular PCNA, Ki-67 e expressão da proteína p53.

Avaliar pela técnica de imuno-histoquímica marcadores celulares.

Correlacionar os achados morfológicos com os achados da imuno-histoquímica para marcadores celulares e combiná-los com os achados da imuno-histoquímica para marcadores de proliferação celular.

Relacionar o tempo de evolução clínica dos tumores com o índice de proliferação celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O desenvolvimento deste trabalho visa estabelecer o estudo anátomopatológico, molecular e epidemiológico em neurooncologia veterinária.

O desenvolvimento deste projeto visa avaliar o comportamento proliferativo das células tumorais e correlacioná-los com o tempo de evolução bem como avaliar se há alterações em p53 e compilar esses achados, comparando-os com os dados em humanos. Aproximar a neurooncologia veterinária da humana promovendo o desenvolvimento da neurooncologia comparada e da patologia molecular.

4 MATERIAL E MÉTODO

No material e método foram descritas as etapas e os processos de obtenção do material biológico, do diagnóstico e dos dados. Os tópicos foram divididos para facilitar o entendimento e individualizar cada fase do trabalho.

4.1 ANIMAIS

Foram selecionados para o estudo 18 animais, da espécie canina, que deram entrada ao Serviço de Patologia vinculado ao Hospital veterinário (HOVET) e ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e que tiveram diagnóstico de neoplasia intracraniana primária confirmado. Os casos que tiveram diagnóstico de neoplasia secundária proveniente de metástase, encefalites ou angiopatia amilóide foram excluídos do estudo. Dos 18 cães escolhidos além de material biológico foram coletados dados para identificação como: raça, sexo e idade do animal, para serem compilados junto aos resultados das análises.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o protocolo número 1150/2007.

Tabela 1 - Número de identificação dos cães, raça, sexo, idade no momento da necropsia e neoplasia diagnosticada.

Caso	Cão			
	Raça	Sexo	Idade	Neoplasia
1	Poodle	Macho	10 anos	Meningioma Transicional
2	Rottweiler	Fêmea	8 anos	Papiloma de Plexo Coróide
3	SRD*	Fêmea	8 anos	Sarcomatose Meningeal Difusa
4	SRD*	Fêmea	10 anos	Meningioma Transicional
5	Pastor Alemão	Macho	10 anos	Astrocitoma Fibrilar
6	Poodle	Macho	5 meses	Xantoastrocitoma Pleomorfo
7	Rottweiler	Fêmea	9 anos	Schwannoma
8	Labrador	Macho	7 anos	Meningioma Angiomatoso
9	Poodle	Macho	9 anos	Astrocitoma Anaplásico
10	Pastor Belga	Macho	12 anos	Meningioma Papilar
11	SRD*	Fêmea	12 anos	TPPDI°
12	Boxer	Macho	9 anos	Meningioma Transicional
13	Golden Retriever	Fêmea	8 anos	Meningioma Meningotelial
14	Boxer	Macho	14 anos	Ependimoma Anaplásico
15	Pastor Alemão	Fêmea	10 anos	Meningioma Meningotelial
16	Cocker Spaniel	Fêmea	9 anos	Meduloblastoma
17	Cocker Spaniel	Fêmea	7 anos	Meningioma Anaplásico
18	Poodle	Macho	5 anos	Neuroblastoma Olfatório

* - Sem raça definida

° - Tumor de parênquima pineal com diferenciação intermediária.

4.2 NECRÓPSIA, COLHEITA DE MATERIAL E FIXAÇÃO

Os animais foram necropsiados de acordo com os procedimentos usuais de rotina, sendo que a colheita do sexto conjunto, o sistema nervoso, foi realizada de forma cuidadosa com a localização e descrição das lesões. Com a retirada do encéfalo como um todo ou recebimento do material o mesmo foi fixado em formol 10% por um período de 24-48 horas, para evitar perda de material genético e

interações protéicas irreversíveis, ou em metacarn, fixador alcoólico que preserva melhor as proteínas e suas conformações, melhorando a apresentação do material para executar a imuno-histoquímica.

Após a fixação foi realizada a documentação do espécime e cortes coronais de aproximadamente 5-10 milímetros ao longo do seu eixo longitudinal mantendo a estrutura dos cortes como um todo, partindo do ponto de inserção da hipófise, no infundíbulo, para frente em direção ao córtex frontal e para trás em direção ao cerebelo. Foram selecionadas para confeccionar os blocos de parafina as amostras tumorais mais representativas em tamanho sem alterar sua relação com o encéfalo e a própria forma para manter dados importantes sobre a morfologia na interface tecido tumoral e tecido não-tumoral. As amostras escolhidas foram colocadas em cassetes histológicos e mandadas para o processamento.

4.3 PROCESSAMENTO E INCLUSÃO

O processamento foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP em processador automático, Leica TP 1020, sendo utilizados 2 banhos de 1 hora e 30 minutos em álcool 95%, seguidos de 5 banhos de 1 hora e 30 minutos em álcool 100%, seguidos de 3 banhos 1 hora e 30 minutos em xilol e por último 2 banhos de 3 horas em parafina à 56 °C que faz a parafina penetrar no tecido. Após o processamento o tecido impregnado em parafina seguiu para a etapa de inclusão onde foi utilizado um sistema de inclusão composto pelos aparelhos, Leica EG 1150C e Leica EG 1150H, que combinam um aquecedor com dispensador de parafina e uma placa fria, para cobrir ao redor da amostra com parafina em um molde de metal dando estrutura cúbica ao bloco e em sequência esfriar o molde para desenformar o bloco de parafina com o cassete devidamente identificado preso a ele.

4.4 CONFECÇÕES DE LÂMINAS PARA HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

A confecção das lâminas histopatológicas foi realizada no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, foram utilizados os blocos prontos com as amostras tumorais, depois de retirado o excesso de parafina até chegar ao tecido na face de corte, os blocos são colocados em água e o conjunto na geladeira por no mínimo 4 horas. Passado esse período prévio com os blocos resfriados eles foram posicionados individualmente em micrótomo, Leica RM 2245, com navalha nova de perfil baixo Feather A35 para a obtenção de cortes com 5 micrometros de espessura. Antes de serem colocados em lâminas de vidro os cortes foram esticados em um banho com água aquecida à no mínimo 40°C, para cada finalidade foi utilizado um tipo de lâmina: para execução de colorações de rotina como Hematoxilina e Eosina (HE) foram usadas lâmina sem nenhum tratamento de superfície prévio do fabricante, apenas uma fina camada de albumina foi aplicada na lâmina de vidro momentos antes de posicionar o corte nela.

As lâminas destinadas à coloração de rotina HE foram colocadas em dois banhos de 10 minutos em xilol para retirada da parafina, seguido de 3 minutos em banhos de álcool etílico em diferentes concentrações para hidratar o tecido, 100%, 95%, 95% e 70%. Após hidratação em alcoóis as lâminas foram colocadas em água corrente por 3 minutos, retiradas da água e colocadas no corante de hematoxilina por 5 minutos, após a retirada do corante as lâminas foram lavadas em água rapidamente para serem passadas no álcool-ácido e subsequentemente lavadas em água por 10 minutos. Retirado o excesso de água as lâminas foram colocadas no segundo corante, eosina, por 1 minuto após esse tempo foi retirado o corante e as lâminas colocadas em 3 banhos diferentes de álcool etílico 95% por 2 minutos em cada um, seguido de 2 banhos de álcool etílico 100% por 2 minutos cada, um banho de álcool-xilol por 1 minuto e finalizando com 2 banhos de 3 minutos cada em xilol.

Após a passagem pelo último xilol da bateria de coloração, as lâminas foram destinadas para a montagem da lamínula com resina, podendo estar embebidas no xilol ou secas. A resina utilizada para montagem foi Permount (fabricante).

Com a lamínula na lâmina, o conjunto foi colocado para secar a resina e manter a integridade dos cortes.

Para a execução de imuno-histoquímica foram utilizadas lâminas com tratamento de superfície do fabricante, lâminas com silano, que proporciona melhor adesão dos cortes no vidro. Após o corte estar posicionado na lâmina e devidamente

identificado os mesmos foram colocados em estufa a 50°C para melhor aderência e retirada do excesso de parafina dos cortes.

As lâminas destinadas a imuno-histoquímica após a retirada da estufa foram cuidadosamente enroladas em papel seda e separadas para a utilização apropriada no momento oportuno.

4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A partir dos cortes em lâminas com silano, o procedimento da imuno-histoquímica foi realizado no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Os anticorpos primários utilizados foram todos comprados da DakoCytomation (Dako North America, Inc – 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013 USA) bem como o sistema de visualização, Universal LSAB™ Kits e Liquid DAB+. As informações como a especificidade do anticorpo, tipo, diluição utilizada, tampão utilizado para recuperação antigênica e código estão compiladas no quadro 3.

Especificidade do anticorpo	Diluição utilizada	Tampão de Antigênica Induzida por Calor	Código do fabricante	Tipo clonal
Ki-67	1:100	Tris-EDTA	M7240	monoclonal
PCNA	1:100	Citrato	M0879	monoclonal
VIM	1:100	Citrato	M0725	monoclonal
GFAP	1:1000	Citrato	Z0334	policlonal
S100	1:100	Citrato	Z0311	policlonal
NSE	1:50	Citrato	M0873	monoclonal
NFP	1:100	Citrato	M0762	monoclonal
p53	1:1600	Citrato	M7001	monoclonal
CgA	1:100	Citrato	A0430	policlonal
SYN	1:200	Citrato	A0010	policlonal
EMA	1:50	Citrato	M0613	monoclonal
FvW	1:800	Citrato	A0082	policlonal

Quadro 3 – Lista dos anticorpos, diluição de trabalho, tampão de recuperação antigênica, código do fabricante e tipo clonal

As lâminas foram colocadas em 2 banhos de xilol por 10 minutos à 40°C para retirada da parafina, seguido de 2 banhos em álcool etílico 100% por 3 minutos cada, neste ponto os cortes foram colados em uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio à 3% por 40 minutos protegidos da luz, após serem retiradas da última solução para inativação da peroxidase endógena as lâminas seguiram em 2 banhos de álcool etílico 95% por 3 minutos cada seguido de um último banho de álcool etílico 70%. Após a passagem pelos alcoóis as lâminas foram colocadas em 3 banhos de PBS 0,01M por 3 minutos cada, saindo dos banhos as lâminas foram colocadas em tampão de recuperação antigênica apropriado ao anticorpo e aquecidas em forno de micro-ondas pelo período de 4 minutos 4 vezes na potencia máxima, repondo com água destilada o tampão após cada período. Terminado o tempo de aquecimento a solução tampão e as lâminas foram colocadas para esfriarem em temperatura ambiente. Após resfriamento as lâminas foram lavadas em 3 banhos de PBS 0,01M por 3 minutos cada e elas foram posicionadas na câmara úmida, o excesso de PBS 0,01M ao redor dos cortes foi retirado com o auxílio de papel higiênico absorvente mantendo os cortes úmidos. Com os cortes ainda úmidos foi aplicado sobre as lâminas aproximadamente 100 microlitros de anticorpo primário diluído para a incubação por toda a noite a 4°C ou por 2 horas em temperatura ambiente. Terminado o período de incubação os cortes foram lavados em 3 banhos de PBS 0,01M por 3 minutos cada e mais uma vez os cortes foram posicionadas na câmara úmida, o excesso de PBS 0,01M ao redor dos cortes foi retirado com o auxílio de papel higiênico absorvente mantendo os cortes úmidos. Com os cortes ainda úmidos foi aplicado sobre as lâminas o anticorpo secundário biotinilado, 1 a 3 gotas dependendo do tamanho do corte, para ser incubado por 45 minutos em temperatura ambiente. Terminado o período de incubação os cortes foram novamente lavados em 3 banhos de PBS 0,01M por 3 minutos cada e mais uma vez os cortes foram posicionadas na câmara úmida, o excesso de PBS 0,01M ao redor dos cortes foi novamente retirado com o auxílio de papel higiênico absorvente mantendo os cortes úmidos. Com os cortes ainda úmidos foi aplicado sobre as lâminas a streptavidina conjugada com peroxidase de rábano picante, 1 a 3 gotas dependendo do tamanho do corte, para ser incubado por 45 minutos em temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, os cortes foram novamente lavados em 3 banhos de PBS 0,01M por 3 minutos cada e as lâminas

foram individualmente separadas para a aplicação do revelador a base de diaminobenzidina (DAB). O tempo de revelação foi modulado para cada tecido com a finalidade de obter uma marcação otimizada. O aparecimento da cor amarronzada nos cortes indicou a presença de marcação positiva.

4.6 ANALISE DE IMAGENS

Para a captura de imagens das lâminas marcadas pela técnica de imuno-histoquímica foi utilizado sob responsabilidade do Prof. Dr. Enrique Leo Portiansky o microscópio Olympus BX61 com o auxílio do programa ImagePro Plus versão 6.3, do Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Patologia Geral, Facultad de Ciencias Veterinarias da Universidad Nacional de La Plata, La Plata – Argentina e sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Zaidan Dagli o microscópio Nikon E-1000 com auxílio do programa ImagePro Plus versão 4.1, do Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil.

Para o cálculo do índice de proliferação foram feitas 10 fotos aleatórias em maior aumento sem óleo de imersão, objetiva de 40x, das áreas tumorais com maior concentração de marcação imuno-histoquímica tanto para PCNA quanto para Ki-67. A partir das fotos foram contadas 1000 células tumorais ao total, excluindo células inflamatórias e células endoteliais, células marcadas e não marcadas, do total de células marcadas o número foi dividido por 10 e o resultado obtido é o valor porcentual do índice de proliferação. A contagem das células a partir das fotos foi realizada com o auxílio do programa ImagePro Plus versão 6.3 e 4.1

5 RESULTADOS

Gráficos referentes à prevalência sexual dos tumores (Gráfico 1), distribuição das idades (Gráfico 2), prevalência tumoral agrupada (Gráfico 3), prevalência do número de cães em relação à raça (Gráfico 4), índice de proliferação celular dos tumores para ambos os anticorpos marcadores (Gráfico 5), índice de proliferação celular em meningiomas (Gráfico 6), índice de proliferação celular em PNET (Gráfico 7), índice de proliferação celular em astrocitomas (Gráfico 8), índice de proliferação celular em outros tumores (Gráfico 9), distribuição sexual por tipo tumoral agrupado (Gráfico 10) e tempo de sobrevida desde o aparecimento dos sintomas até o óbito do animal (Gráfico 11).

Gráfico 1 – Prevalência dos tumores em relação ao sexo dos cães

Gráfico 2 – Distribuição da idade dos cães por número de casos

Gráfico 3 – Porcentual de cada tipo tumoral agrupado em relação ao total

Gráfico 4 – Prevalência do número de casos em relação à raça

Gráfico 5 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 (em %)

Gráfico 6 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em meningiomas (em %)

Gráfico 7 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em astrocitomas (em %)

Gráfico 8 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em PNET (em %)

Gráfico 9 – Índice de proliferação celular de PCNA e Ki-67 em Outros (em %)

Gráfico 10 – Distribuição sexual por tipo tumoral agrupado em número de casos

Gráfico 11 – Período de tempo em dias aproximados do aparecimento de sinais clínicos até o óbito (excluindo valores nulos)

Tabelas referentes aos dados de índice de proliferação celular para ambos os marcadores de todos os tumores estudados (Tabela 2), resultados da reatividade dos marcadores de diferenciação celular por IHQ para cada tumor estudado e seus respectivos marcadores (Tabela 3), resultados da reatividade de expressão de p53 por IHQ para cada tumor estudado (Tabela 4) e tempo de sobrevida em dias desde o aparecimento dos sintomas até o óbito do animal (Tabela 5).

Tabela 2 – Índice de proliferação celular para PCNA e Ki-67

Caso	Neoplasia	PCNA	Ki-67
1	Meningioma Transicional	10%	4%
2	Papiloma de Plexo Coróide	30%	2%
3	Sarcomatose Meningeal Difusa	12%	7%
4	Meningioma Transicional	5%	2%
5	Astrocitoma Fibrilar	1%	1%
6	Xantoastrocitoma Pleomorfico	20%	4%
7	Schwannoma	15%	8%
8	Meningioma Angiomatoso	2%	1%
9	Astrocitoma Anaplásico	10%	5%
10	Meningioma Papilar	4%	4%
11	TPPDI ^o	25%	20%
12	Meningioma Transicional	7%	5%
13	Meningioma Meningotelial	4%	2%
14	Ependimoma Anaplásico	49%	21%
15	Meningioma Meningotelial	2%	2%
16	Meduloblastoma	54%	40%
17	Meningioma Anaplásico	58%	26%
18	Neuroblastoma Olfatório	52%	54%

^o- Tumor de parênquima pineal com diferenciação in intermediária.

Tabela 3 – Marcação imuno-histoquímica dos marcadores celulares

Caso	Neoplasia	Marcação imuno-histoquímica
1	Meningioma Transicional	VIM+, S100+
2	Papiloma de Plexo Coróide	VIM+, S100+
3	Sarcomatose Meningeal Difusa	VIM+, S100-, GFAP-
4	Meningioma Transicional	VIM+, S100+,
5	Astrocitoma Fibrilar	VIM+, S100+, GFAP+
6	Xantoastrocitoma Pleomorfico	VIM+, S100+, GFAP+, NFP+
7	Schwannoma	VIM+, S100+, GFAP+
8	Meningioma Angiomatoso	VIM+, S100+, FvW+
9	Astrocitoma Anaplásico	VIM+, S100+, GFAP+
10	Meningioma Papilar	VIM+, S100+, FvW+
11	TPPDI°	VIM-, S100-, GFAP-, NSE-, CgA-, NFP-, SYN+
12	Meningioma Transicional	VIM+, S100+, GFAP-
13	Meningioma Meningotelial	VIM+, S100+, GFAP-
14	Ependimoma Anaplásico	VIM+, S100+, GFAP+
15	Meningioma Meningotelial	VIM+, S100+, GFAP-
16	Meduloblastoma	VIM+, S100+, GFAP+, NSE+
17	Meningioma Anaplásico	VIM+, S100+, GFAP-, EMA-
18	Neuroblastoma Olfatório	GFAP+, NSE+

°- Tumor de parênquima pineal com diferenciação in termediária.

Tabela 4 – Marcação imuno-histoquímica da expressão de p53

Caso	Neoplasia	Marcação imuno-histoquímica
1	Meningioma Transicional	p53-
5	Astrocitoma Fibrilar	p53-
6	Xantoastrocitoma Pleomorfico	p53-
8	Meningioma Angiomatoso	p53-
9	Astrocitoma Anaplásico	p53-
10	Meningioma Papilar	p53-
11	TPPDI°	p53-

°- Tumor de parênquima pineal com diferenciação in termediária.

Tabela 5 – Período de tempo em dias aproximados do aparecimento de sinais clínicos até o óbito

Caso	Neoplasia	Dias
1	Meningioma Transicional	não consta
2	Papiloma de Plexo Coróide	40
3	Sarcomatose Meningeal Difusa	30
4	Meningioma Transicional	150
5	Astrocitoma Fibrilar	60
6	Xantoastrocitoma Pleomorfico	60
7	Schwannoma	240
8	Meningioma Angiomatoso	não consta
9	Astrocitoma Anaplásico	30
10	Meningioma Papilar	360
11	TPPDI ^o	50
12	Meningioma Transicional	não consta
13	Meningioma Meningotelial	240
14	Ependimoma Anaplásico	120
15	Meningioma Meningotelial	não consta
16	Meduloblastoma	60
17	Meningioma Anaplásico	não consta
18	Neuroblastoma Olfatório	30

^o- Tumor de parênquima pineal com diferenciação in termediária.

As figuras que representam as fotomicrografias das lâminas onde foi realizada a imuno-histoquímica para os marcadores de proliferação PCNA e Ki-67 estão ilustradas a seguir. O caso 1 está representado na (Figura 1), o caso 2 (Figura 2), o caso 3 (Figura 3), o caso 4 (Figura 4), o caso 5 (Figura 5), o caso 6 (Figura 6), o caso 7 (Figura 7), o caso 8 (Figura 8), o caso 9 (Figura 9), o caso 10 (Figura 10), o caso 11 (Figura 11), o caso 12 (Figura 12), o caso 13 (Figura 13), o caso 14 (Figura 14), o caso 15 (Figura 15), o caso 16 (Figura 16), o caso 17 (Figura 17) e o caso 18 (Figura 18).

Figura 1 – Meningioma Transicional, Poodle, caso 1; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 2 – Papiloma de plexo coroide, Rottweiler, caso 2; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 3 – Sarcomatose meiningeal difusa, SRD, caso 3; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 4 – Meningioma Transicional, SRD, caso 4; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 5 – Astrocitoma fibrilar, Pastor Alemão, caso 5; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 6 – Xantoastrocitoma pleomórfico, Poodle, caso 6; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 7 – Schwannoma, Rottweiler, caso 7; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 8 – Meningioma angiomatosa, Labrador, caso 8; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 9 – Astrocitoma anaplásico, Poodle, caso 9; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 10 – Meningioma papilar, Pastor Belga, caso 10; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 11 – Tumor do Parênquima Pineal de Diferenciação Intermediária, SRD, caso 11; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 12 – Meningioma transicional, Boxer, caso 12; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 13– Meningioma meningotelial, Golden Retriever, caso 13; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 14 – Ependimoma anaplásico, Boxer, caso 14; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 15 – Meningioma meningotelial, Pastor Alemão, caso 15; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 µm

Figura 16 – Meduloblastoma, Cocker Spaniel, caso 16; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μ m

Figura 17 – Meningioma anaplásico, Cocker Spaniel, caso 17; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μ m

Figura 18 – Neuroblastoma olfatório, Poodle, caso 18; (A) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para PCNA e (B) Núcleos das células tumorais marcados por IHQ para Ki-67. Aumento de 400x – barra 25 μ m

6 DISCUSSÃO

Neste tópico os dados compilados dos resultados na forma de gráficos, tabelas e figuras serão comentados e comparados com a literatura científica respectiva.

6.1 DISTRIBUIÇÃO SEXUAL E DA IDADE DOS CÃES ACOMETIDOS

Os dados da distribuição sexual foram apresentados no gráfico 1, não foi observada predileção sexual para os tumores do SN de cães para os casos que foram compilados juntos, sendo 50% machos e 50% fêmeas, essa é a distribuição sexual observada esperada para esses tumores na literatura de referência (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002). Entretanto quando a análise é focada nos tipos tumorais agrupados, como feita no gráfico 10, é possível observar que essa referência é válida para os meningiomas que corresponderam à mesma proporção de 50% machos e 50% fêmeas. Em humanos a distribuição sexual em meningiomas é bem diferente tendo uma maior ocorrência em mulheres, essa predileção sexual é um problema inclusive para mulheres grávidas onde os níveis hormonais podem aumentar as chances do aparecimento dessas neoplasias (KLEIHUES; CAVENEE, 2000). Isto ocorre devido à presença de receptores de estrógeno e progesterona nos meningiomas em humanos. Esses mesmo receptores foram detectados e estudados em meningiomas de cães, porém seu na patogênese desses tumores em cães não corresponde ao mesmo padrão com predileção sexual (MANDARA et al. 2002; ADAMO; CANTILE; STEINBERG, 2003). Em humanos os receptores de ambos os hormônios não respondem independentemente aos níveis hormonais, existindo uma necessidade do receptor de progesterona ser ativado primeiro para sensibilizar o receptor de estrógeno ao seu ligante, assim então ele ser estimulado e alterar a dinâmica tumoral (AGUIAR et al., 2006). Uma provável hipótese pelo qual em cães não é observado essa mesma predileção sexual, apesar da presença dos mesmos receptores nas células tumorais, pode ser a ocorrência do próprio ciclo estral, que difere do ciclo menstrual das mulheres no que diz respeito

aos picos hormonais, além da necessidade da ação conjunta de ambos os hormônios e receptores para os mesmos estarem alterando a dinâmica da neoplasia.

Em astrocitomas apesar do número pequeno de casos para uma avaliação mais consistente, foi possível observar a predominância de apenas machos para esse tipo tumoral agrupado, contudo isso não corresponde com as observações da literatura para astrocitomas, nos quais não há predominância sexual de machos com astrocitoma. Em Lipsitz et al. (2003) foi observado uma distribuição sexual de 60% machos e 40% fêmeas em 5 casos de GBM; enquanto em Stoica et al. (2004) foi observado uma distribuição sexual de 39% machos e 61% fêmeas em 31 casos de astrocitomas agrupados. Ao consideramos apenas os casos de GBM, dentre os 31 casos desse autor, temos 17% machos e 83% fêmeas em 12 casos. Em humanos astrocitomas agrupados são mais frequentes em homens em relação a todos os seus tipos e considerando todas as idades (KLEIHUES; CAVENEE, 2000), de acordo com Ohgaki et al. (2004) em seu estudo populacional com GBM, a distribuição sexual dos casos seguiu a razão de 1,28 caso em homem para cada 1 caso em mulher.

A distribuição sexual em PNET não apresentou diferença percentual em relação o total e a distribuição dos meningiomas, embora essa observação seja representativa para apenas dois casos que foram avaliados no estudo. PNET são tumores raros dentro dos tumores do SN e não há predileção sexual desses tumores em cães e em humanos (KOESTNER et al., 1999; KLEIHUES; CAVENEE, 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Os resultados da distribuição sexual entre os outros tumores combinados tiveram uma prevalência de mais casos ocorrendo em fêmeas, contudo não é possível fazer nenhuma análise ou correlação, pois os casos de tumores que compõe esses dados são de ocorrência única e não têm relação uns com os outros. No estudo de Cantile et al. (2002) sobre a resposta IHQ em carcinomas de plexo coroide (CPC) de cães dos quatro casos estudados 3 eram macho e apenas 1 caso era fêmea.

O agrupamento dos casos em função da idade dos animais foi apresentado no gráfico 2, no qual se observa a distribuição dos casos que segue as distribuições observadas pela literatura, acima de 6 anos o número de casos começa a aumentar atingindo um pico por volta dos 9, 10 anos e diminuindo substancialmente o número

de casos ao redor dos 13 anos (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002), com exceção de um caso onde ocorreu o aparecimento tumoral em um animal muito jovem.

O maior número de casos se concentra em animais com 9 anos, que representou a mediana em uma distribuição normal dos casos pelas idades no gráfico, com as menores ocorrências nas suas pontas. Essa distribuição normal de dispersão ocorre nos tumores do SN de cães devido as ocorrências das enfermidades que atingem o SN dessa espécie nas suas diferentes idades. Em animais mais jovens as enfermidades do SN mais comuns e frequentes são as encefalites virais e não virais, das encefalites virais temos a cinomose causada pelo vírus da cinomose canina (gênero Morbillivirus, família Paramixoviridae) e das não virais temos as enfermidades do complexo das meningoencefalites canina, subdivididas em meningoencefalite granulomatosa (MEG) e meningoencefalite necrosante (MEN). A MEG e a MEN são duas doenças com uma resposta inflamatória exacerbada comprometendo as estruturas do encéfalo, sem agente etiológico comprovado no tecido, que atacam preferencialmente o parênquima e neurópilo dos cães respectivamente (DINIZ et al., 2006; VIOLIN et al., 2008; HOSOMI et al., 2009). Em animais mais velhos as doenças neurodegenerativas se tornam mais comum, sendo a mais frequente a angiopatia amiloide (AA), que ocorre devido o acúmulo de proteína beta-amiloide nas paredes dos vasos do SN causando o espessamento da sua camada adventícia, aumentando significativamente a luz dos vasos, causando falhas na oxigenação cerebral e congestão do encéfalo (YOSHINO et al., 1996; NAKAYAMA; UCHIDA; DOI, 2004).

Em estudos comparativos foi mostrado que o aparecimento da AA é inversamente proporcional ao aparecimento de tumores e o determinante é a localização dos agregados formados por acúmulos da proteína amilóide ao redor dos vasos sanguíneos causando AA, ou em placas senis dispersas pelo parênquima e neurópilo que ocorre em tumores (YOSHINO et al., 1996; NAKAYAMA; UCHIDA; DOI, 2004). Relatos com observações epidemiológicas sobre enfermidades do SN, incluindo as doenças MEG, MEN, cinomose, tumores do SN e AA para as idades de acometimento correspondente. Isto é, as afecções inflamatórias em cães mais jovens (MEG, MEN e cinomose), os tumores do SN dos cães adultos velhos e as doenças neurodegenerativas (AA) dos cães idosos, avaliadas em conjunto, mostra

uma dispersão não normal e mais homogênea do número de casos distribuídos pelas idades dos cães acometidos (VIOLIN et al., 2007).

6.2 PREVALÊNCIA DOS TUMORES ENTRE AS RAÇAS

A avaliação da prevalência racial distribuídas entre os casos de neoplasias em animais, qualquer que seja o seu tipo, incluindo os tumores do SN de cães, deve ser realizada em animais especialmente em cães com o intuito de avaliar as causas e tentar minimizar sua ocorrência sempre que possível, definindo prognósticos e tratamentos (MEUTEN, 2002).

Muitos estudos correlacionaram a ocorrência de neoplasia do SN de cães com raças predispostas a essas enfermidades, apesar de poucas raças serem conhecidas por apresentarem esses tipos de tumores. Mais que apenas uma correlação com a raça, existe uma correlação com o formato do crânio para raças específicas. Em cães com formato craniano braquicefálico como no Boxer, Bulldog e no Boston terrier, os gliomas são as neoplasias mais frequentes entre os gliomas o GBM (GAVIN; FIKE; HOOPES, 1995; KOESTNER; HIGGINS, 2002; STOICA et al., 2004; STOICA et al., 2009). Meningiomas podem ser diagnosticados em várias raças de cães e são os tumores do SN mais frequentes (KOESTNER; HIGGINS, 2002), contudo existe uma predileção para cães da raça Golden retriever e Labrador, que têm o formato craniano mesaticefálico. A ocorrência de meningiomas é maior nessas raças e nos raças relacionadas a elas (GAVIN; FIKE; HOOPES, 1995; KOESTNER; HIGGINS, 2002; BARNHART; WOJCIESZYN; STORTS, 2002; GRECO et al., 2006).

Não existem ainda estudos que mostrem a determinação genética que possa correlacionar o formato craniano e predisposições genéticas para a ocorrência dos tumores. Também não existem outras raças que possam ser relacionadas com outros tipos tumorais do SN até o momento, apesar da ocorrência dos tumores de SN em cães com aproximadamente 14 casos por 100.000, ser maior que a de humanos com a ocorrência de aproximadamente 5 casos por 100.000 (KOESTNER; HIGGINS, 2002; STOICA et al., 2004; STOICA et al., 2009). Os outros tumores

combinados, que não gliomas e meningiomas, correspondem a apenas menos que 25% do total.

Neste estudo os dados correspondentes a prevalência das raças foram compiladas no gráfico 4, e a distribuição das raças em relação ao aparecimento tumoral foi feita sem a discriminação do tipo de tumor. A raça Poodle foi a mais acometida, seguida de animais sem raça definida (SRD). Na literatura internacional o Poodle não é citado como raça com predisposição para tumores do SN, provavelmente o que pode estar influenciando esse padrão de predisposição racial em nosso meio é a grande quantidade de animais da raça Poodle. Embora de maneira menos expressiva as raças consideradas com predisposição foram presentes nesse estudo, em dois casos de meningiomas, um Golden retriever e um Labrador, e um caso de ependimoma em um Boxer.

6.3 DISTRIBUIÇÃO DOS TUMORES NA POPULAÇÃO ESTUDADA

A distribuição proporcional dos tumores do SN é bem estabelecida na literatura e como já foi citado, meningiomas corresponde a aproximadamente 50% do total dos tumores e gliomas correspondem em média 25% do total, sendo que os 25% restantes ficam responsáveis pelas outras entidades tumorais; nessa análise os tumores ependimais não estão incluídos nos gliomas (KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Em trabalhos que envolvem múltiplos casos tumorais do SN sem estudar especificamente um tipo tumoral ou tipo tumoral agrupado, também representam valores próximos à distribuição observada na população de cães presente em Koestner e Higgins (2002), como no estudo de Kraft et al. (1997) e Thomson et al. (2005).

Os estudos que direcionam uma escolha ao tipo de tumor se concentram em sua maioria entre meningiomas e astrocitomas, esses representados pelo GBM. Nos estudos com meningiomas temos análises comparativas dos meningiomas, correlações e comparações com perfil imuno-histoquímico dessas neoplasias, análise de receptores de estrógeno e progesterona, análise da expressão de genes por microarranjo de cDNA e avaliação da resposta frente à ressecção por cirurgia aspirativa desses neoplasmas (PATNAIK; KAY; HURVITZ, 1986; BARNHART;

WOJCIESZYN; STORTS, 2002; MANDARA et al., 2002; THOMSON et al., 2005; GRECO et al., 2006). A importância e relevância dos meningiomas para a raça canina levam esses neoplasmas a serem amplamente estudados, além da correlação com os mesmos neoplasmas de humanos que compartilham semelhanças histológicas, nos perfis de imuno-histoquímica e também no nível genômico. Embora em humanos os meningiomas tenham sua importância, eles não representam a neoplasia do SN mais importante e letal.

As pesquisas envolvendo astrocitomas têm o propósito de melhorar a sobrevida e os tratamentos em cães, contudo é importante conseguir estabelecer um modelo animal de ocorrência natural dessas neoplasias com o intuito de auxiliar pesquisas (KIMMELMAN; NALBANTOGLU, 2007); incluindo a neoplasia do SN mais devastadora de humanos, o GBM, o tumor de SN mais freqüente dessa espécie (KLEIHUES; CAVENEE, 2000). Muitos trabalhos têm compilados dados e números de casos importantes para auxiliar o entendimento dessas neoplasias em cães e poder dar subsídio a pesquisas posteriores. Já foram realizados estudos com correlações clínicas com diagnósticos por imagem e os achados patológicos de GMB em cães, ocorrência de astrocitomas em cães jovens, alterações genômicas em conjunto com os achados morfológicos e imuno-histoquímicos, análise da expressão de genes por microarranjo de cDNA e identificação de células tronco tumorais em GBM (LIPSITZ et al., 2003; KUBE; BRUYETTE; HANSON, 2003; STOICA et al., 2004; THOMSON et al. 2005; STOICA et al., 2009).

Conforme observado no gráfico 3, a distribuição dos tipos tumorais em relação a sua origem agrupada: meningeal, astrocitária, PNET e outros mostram que embora o padrão racial não se identifique com as ocorrências em nosso meio de pesquisa, as proporções dos tipos tumorais seguem as mesmas distribuições encontradas em literatura internacionais (KOESTNER; HIGGINS, 2002). Com os meningiomas sendo responsáveis por aproximadamente a metade do total de casos observados, seguido pela ocorrência de gliomas, no nosso caso apenas astrocitomas. Isto pode indicar que além da predisposição racial que é observada ao redor do mundo deve haver uma predisposição da espécie para ocorrerem essas proporções, explicando assim o aparecimento de raças prevalentes conforme a distribuição populacional vigente no local estudado.

6.4 MARCADORES CELULARES E DESCRIÇÃO DOS TUMORES

Tumores são compostos por células, que algumas vezes apresentam uma morfologia peculiar e bem definida, enquanto outras vezes apresentam um aspecto que pode ser bem indiferenciado (ROBBINS, 2005). Os marcadores celulares servem para auxiliar na interpretação do diagnóstico tanto dessas neoplasias que se apresentam com grande grau de indiferenciação quanto para traçar um perfil de marcação para os tumores que apresentam uma morfologia específica e observar se todos desse grupo compartilham desse perfil esperado, mostrando possíveis diferenças proteômicas apesar do aspecto morfológico semelhante (DABBS, 2006).

A ferramenta laboratorial que permite essa análise em tecidos e neoplasias, que foram processados para análise histopatológica após serem emblocados em parafina, é a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) que teve suas características, peculiaridades e protocolos citados anteriormente nesta dissertação.

No sistema nervoso os marcadores celulares ajudam a identificar as proteínas e estruturas que compõe os seus grupos celulares dispersos pelo órgão. Na execução da IHQ para identificação de estruturas em células tumorais, os tecidos adjacentes próprios do SN, que contêm os constituintes celulares não tumorais agem como um controle interno da reação e são preferíveis nestes casos, pois foram submetidos aos mesmos processamentos (DABBS, 2006).

Em meningiomas de humanos os marcadores mais utilizados são a proteína S-100 (S100) e vimentina (VIM) além de antígeno epitelial de membrana (EMA), outros marcadores que também são relevantes para identificar as diferenciações epiteliais desses tumores são as citoqueratinas (CTK) de vários pesos moleculares e o antígeno carcinoembrionário (CEA). A marcação para S100 e VIM é difusa por todo o tumor para os tipos benignos (WHO grau I), EMA é o marcador diagnóstico para meningiomas em humanos (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; DABBS, 2006). Em cães os marcadores imuno-histoquímicos utilizados para identificar meningiomas são S100 e VIM com o mesmo padrão de marcação imuno-histoquímica encontrado em casos de meningiomas em humanos. O marcador EMA não é válido para cães como é em humanos e não identifica nenhum antígeno específico nos meningiomas da espécie canina, não tendo resultado como ferramenta diagnóstica (BARNHART; WOJCIESZYN; STORTS, 2002; KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Nos gliomas o marcador mais representativo é o anticorpo contra a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que marca tanto astrocitomas quanto oligodendrogliomas apesar de ser uma proteína relacionada aos astrócitos, diferentes células tumorais do SN podem expressá-la em variações de intensidade e proporção de células marcadas. Além de GFAP gliomas podem ser marcados por imuno-histoquímica com VIM e S100 (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; DABBS, 2006). Em cães os mesmos marcadores GFAP, VIM e S100 são utilizados para diferenciar os gliomas, em oligodendrogliomas uma marcação menos expressiva de GFAP é observada, e outros marcadores mais específicos não podem ser utilizados para essa espécie (KOESTNER; HIGGINS, 2002; STOICA et al., 2004).

Em tumores neuroendócrinos, PNET e tumores com qualquer diferenciação neuronal os marcadores mais importantes são aqueles expressos pelas células neuronais, como a enolase específica neuronal (NSE), sinaptofisina (SYN), cromogranina A (CgA) e proteína do neurofilamento (NFP). Dos marcadores citados NFP é o único de proteína filamentar e pode estar presente em outras células que não apenas as citadas neste parágrafo. Os tumores dessa categoria são muitas vezes tumores blásticos ou embrionários e por esse motivo muitas vezes nenhuma marcação é encontrada ou a marcação é localizada a nichos de células. Isto ocorre tanto para tumores do SN de humanos quanto tumores do SN em cães. Muitas vezes é possível também obter marcação por GFAP em PNET em conjunto com NSE que é a marcação mais importante, contudo isso não indica um componente astrocitário do tumor (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002; DABBS, 2006). Tumores da pineal e neurocitomas têm grande correlação com a marcação de CgA, SYN e NSE em cães (KOESTNER; HIGGINS, 2002), em humanos pineoblastomas além dos marcadores citados podem ter reatividade para NFP (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

Nos papilomas de plexo coroado (PPC), schwannomas e ependimomas os marcadores utilizados são S100, VIM e GFAP, sendo que para o PPC não se espera uma marcação para GFAP e se acrescentam as CTKs, para tumores de humanos e tumores de cães (KLEIHUES; CAVENEE 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002; DABBS, 2006). Os marcadores de endotélio vascular servem para identificar a presença dos vasos sanguíneos nos tecidos tumorais e a diferenciar os mesmos quando a presença desses vasos são determinante para um diagnóstico. O fator de

von Willebrand (FvW) é um desses marcadores e pode ser utilizado em todos os tumores (DABBS, 2006).

Os achados das marcações celulares pela técnica de IHQ não têm significado sem a prévia análise morfológica dos tecidos, isso fica bem claro quando observamos que muitas neoplasias compartilham alguns marcadores mesmo sendo completamente diferentes umas das outras. Um exemplo de análise sem discernimento que pode se tornar errônea é a marcação difusa em tumores astrocitários para CTK, que ocorre devido tanto a CTK e a GFAP serem proteínas filamentosas que podem induzir uma reação cruzada (DABBS, 2006). A partir da morfologia, é feito então o delineamento de quais marcadores serão utilizados e conforme a resposta de reatividade de cada um deles é possível decidir se é necessário utilizar mais um marcador ou outros marcadores para definir assim o diagnóstico, se as informações coletadas até aquele momento não foram suficientes.

Com base na necessidade de correlação com os aspectos morfológicos os mesmo serão incluídos nesse tópico. Dos casos que não possuem relato ou descrição morfológica em Koestner et al. (1999) ou em Koestner e Higgins (2002) da literatura científica veterinária, os mesmos serão classificados com base na classificação presente em Kleihues e Cavenee (2000) que descrevem os tumores de SN de humanos.

Os aspectos morfológicos dos meningiomas envolvem muitas variantes histológicas, embora todas as variantes tenham um comportamento neoplásico similar e muitas vezes um mesmo neoplasma possa exibir mais de uma variante histológica compartilhando assim algumas características em comum, com exceção de suas variantes malignas. O meningioma transicional ou misto é um tumor caracterizado por feixes de células tumorais alongadas e nichos de células tumorais poligonais organizadas em espirais concêntricas entre esses feixes. Sendo uma combinação de dois outros tipos de meningiomas, o meningotelial e o fibroso: no meningotelial temos a presença das células poligonais organizadas em nichos e lóbulos celulares; no meningioma fibroso temos a presença das células alongadas organizadas em longos feixes e fascículos. Na variante meningioma angiomatoso temos a presença de números vasos sanguíneos, grandes ou pequenos, numa matriz do que se assemelha com meningioma meningotelial ou transicional, sendo que a diferenciação desse tipo de meningioma é a presença massiva de vasos sanguíneos. No meningioma papilar temos um tumor de células meningoteliais que

se arranjam em forma papilar ao redor de vasos centrais, nesta variante existe a presença de vários vasos, mas a diferença da variante angiomatosa citada anteriormente é a organização das células tumorais ao redor desses vasos. No meningioma anaplásico além das características já citadas de um meningioma ele exhibe várias características de malignidade que não são observadas nos outros tipos mais comuns como: alta celularidade, invasão cerebral, crescimento ininterrupto e sem padrão (KOESTNER et al., 1999; KALDRYMIDOU et al., 2002; KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Os astrocitomas são tumores dos astrócitos, células que compõe a macroglia do SN, eles são tumores que variam amplamente em localização morfologia e comportamento biológico. Dos astrocitomas de baixo grau (WHO grau II) temos os aspectos morfológicos do astrocitoma fibrilar que é o mais frequente em cães e é caracterizado por ter um arranjo fibrilar frouxo com abundante GFAP muitos processos celulares e aumento da celularidade local. Em astrocitomas de médio grau (WHO grau III) como o astrocitoma anaplásico é caracterizado por aumento da densidade celular, pleomorfismo celular com células alongadas fusiformes ou poligonais e arredondadas, além de atipia nuclear. O astrocitoma de alto grau (WHO grau IV) é o GBM e sua característica além de incluírem as citadas para a forma anaplásica anterior, tem microproliferação vascular, necrose geográfica e células organizadas em pseudopaliçada (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002). Outro tipo de astrocitoma de baixo grau é o xantoastrocitoma pleomórfico, esse tipo de astrocitoma tem como característica celular pleomorfismo de astrócitos fibrilares e gigantes, frequentemente multinucleados uma densa rede de reticulina ao redor das células. Seus astrócitos têm citoplasmas com aspecto xantomatoso (com gotículas de gordura) muitas vezes empurrando as outras estruturas celulares como núcleo e filamentos, suas células também podem estar bem juntas e assumir um padrão epiteloide (KLEIHUES; CAVENEE, 2000). A ocorrência desse neoplasma de origem astrocitária ainda não foi descrita em animais (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002).

Nos tumores de origem embrionária temos o PNET meduloblastoma que é composto por células redondas a poligonais com pouco citoplasma, em justa aposição podendo formar bandas e feixes de células tumorais que deve se desenvolver no cerebelo. Uma característica muito presente nessa neoplasia bem como em neoplasmas de origem embrionária é a presença de pseudorrosetas do

tipo Homer-Wright e Flexner-Wintersteiner. No neuroblastoma olfatório, apesar dele ser uma neoplasia de origem em células embrionárias como os neuroblastos da mucosa nasal por uma convenção da WHO, não é considerado um PNET, sendo esse termo restrito ao meduloblastoma, PNET de origem cerebelar e aos PNET de origem não cerebelares (KOESTNER et al., 1999). Por critério de organização dos resultados nesse estudo o neuroblastoma olfatório foi agrupado junto com o meduloblastoma por compartilharem características proliferativas semelhantes devido sua origem em células blásticas. As características morfológicas do neuroblastoma olfatório incluem a presença de uma alta celularidade composta de células cuboides a colunares com núcleos redondos e pouco citoplasma, formando ilhas e feixes de tecido tumoral entremeando o neurópilo devido à invasão tumoral, também exhibe pseudorosetas do tipo Homer-Wright e Flexner-Wintersteiner (KOESTNER et al., 1999).

O papiloma de plexo coroide é composto por formações exofíticas arboriformes de estroma fibrovascular revestido por camadas simples de epitélio cuboide a colunar. Na sarcomatose meningeal difusa as células tumorais sarcomatosas pleomórficas são misturadas com células inflamatórias tipo linfócitos, neutrófilos, histiócitos e plasmócitos e invadem o neurópilo. Schwannomas se caracterizam pela proliferação de células fusiformes abundantes com núcleos de formato oval característico, organizadas em feixes e presença ocasional de diferenciação óssea e cartilaginosa. O ependimoma anaplásico é um tumor ependimário caracterizado pela alta celularidade, perda da arquitetura específica comum dos ependimomas, com uma maior razão núcleo citoplasma, atipia celular e infiltração, poucas rosetas ou pseudorosetas são reconhecidas (KOESTNER et al., 1999).

O tumor de parênquima pineal de diferenciação intermediária (TPPDI) tem características morfológicas que não se adequam totalmente a descrição de pineocitoma embora compartilhe algumas características morfológicas. Como sendo composto por células poligonais que se assemelha às células pineais, formação de pseudorosetas e nichos de células separados por estroma fibroso delicado, dando um aspecto lobular ao tecido. Contudo pineocitomas são localizados na pineal enquanto este TPPDI está localizado no neurópilo do lobo temporal, possui vastas áreas de necrose dentro do tumor e pleomorfismo celular. A característica de se espalhar para outras áreas do encéfalo para além da glândula pineal sugeriria um

pineoblastoma, entretanto o caso descrito neste trabalho possui uma cápsula bem definida ao redor da massa tumoral e não invade o neurópilo, apenas causa efeito de massa no mesmo e não possui as características celulares blásticas de um tumor de origem embrionária. Outro tumor que poderia ser considerado para o diagnóstico é o neurocitoma central que pode ocorrer nessas áreas ao redor de ventrículos e apresentar características semelhantes às descritas para TPPDI, porém neurocitomas e pineocitomas têm índices de proliferação celular baixos. TPPDI é uma neoplasia apenas descrita em humanos e pode metastizar e crescer em outras áreas do encéfalo além da pineal (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

Os marcadores utilizados neste estudo estão compilados no quadro 3 e os resultados para cada caso estão organizados na tabela 3, esses dados foram importantes para a confirmação do diagnóstico sugerido antes do procedimento da IHQ, sendo que apenas um caso exigiu a utilização de toda a bateria de IHQ de nosso laboratório para confirmar o diagnóstico do caso de TPPDI.

Todos os meningiomas foram positivos para VIM e S100 com uma marcação difusa das suas células, de acordo com os dados de Koestner et al. (1999), Koestner e Higgins (2002) e Barnhart et al. (2002), para o marcador GFAP e EMA os casos de meningiomas que foram testados tiveram marcação negativa. No caso de sarcomatose meningeal difusa foi positivo apenas para VIM, negativo para S100 e GFAP indicando que diferente dos meningiomas originados nas células meningoteliais, essa neoplasia têm origem apenas nas células mesenquimais (KOESTNER et al., 1999). O caso de papiloma de plexo coroide também foi positivo para os dois marcadores VIM e S100.

Nos casos de astrocitoma anaplásico, astrocitoma fibrilar, ependimoma anaplásico e schwannoma os marcadores VIM, S100 e GFAP foram positivos para os três casos confirmando o diagnóstico dessas neoplasias em conjunto com as características morfológicas observadas nas células tumorais (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002; STOICA et al. 2004). No caso de xantoastrocitoma pleomórfico, além dos marcadores VIM, S100 e GFAP, foi utilizado também NFP e respondendo positivamente para todos esses marcadores. Embora GFAP não tenha apresentado a intensa positividade citada em Kleihues e Cavenee (2000) os filamentos ao redor das células e células tumorais foram positivas.

O caso de meduloblastoma foi positivo para os marcadores VIM, S100, GFAP e NSE. O caso de neuroblastoma olfatório obteve-se o resultado positivo para os

marcadores GFAP e NSE, outros marcadores não foram testados nesse tumor. GFAP e NSE são marcadores importantes para esses tumores apesar de nem sempre estarem presentes e muitas vezes quando presentes não estão distribuídos uniformemente pela massa tumoral (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002).

O caso de TPPDI apresentou características morfológicas e um perfil de marcação IHQ peculiar. Em tumores da glândula pineal o marcador mais importante em humanos é a SYN, embora também possa haver marcação para CgA, NSE e NFP (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; KOESTNER; HIGGINS, 2002). Em cães não há perfis IHQ completos para tumores pineais, mas da mesma maneira os marcadores positivos são a SYN, NSE e NFP (KOESTNER et al., 1999; KOESTNER; HIGGINS, 2002). A marcação positiva para o caso de TPPDI foi apenas para SYN, o que está de acordo com Koestner et al. (1999), Kleihues e Cavenee (2000), Koestner e Higgins (2002) e corrobora para o diagnóstico de TPPDI. Todos os outros marcadores foram CgA, NSE, NFP, VIM, S100 e GFAP negativos para as células tumorais embora marcassem vasos e estruturas dos tecidos adjacentes que atuaram como um controle interno da reação.

6.5 ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As marcações consideradas foram àquelas encontradas nos núcleos com coloração marrom, marcações citoplasmáticas de qualquer tipo foram desconsideradas por serem inespecíficas (DABBS, 2006; JALAVA et al., 2006).

As desvantagens dos dois marcadores celulares são pontos cruciais para a correta interpretação dos resultados, para o Ki-67 sua avaliação pode ser inconsistente quando avaliado em tumores tratados previamente com radioterapia ou quimioterapia, enquanto que para o PCNA fixação alcoólica com metanol leva uma marcação preferencial da fase S, os outros fixadores permitem sua evidenciação nas outras fases como o esperado, devido sua meia vida protéica longa de 20 horas ela pode ser detectada quando a célula já está na fase G0 aumentando a quantidade real de marcação, por último a proteína pode estar desregulada em tumores malignos onde a sua avaliação correta é crítica (QUIÑONES-HINOJOSA et al.,

2005). Por esses motivos muitos autores preferem utilizar como marcador padrão para obter o índice de proliferação (IP) celular o marcador para Ki-67, pois têm maior especificidade e ótima reprodutibilidade (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; DABBS, 2006).

Em meningiomas os IPs desses tumores em cães animais são baixos, o que corresponde com sua característica benigna, apenas o meningioma anaplásico teria um IP maior indicando seu caráter proliferativo maligno (KOESTNER; HIGGINS, 2002). Isso é diferente da classificação em humanos, na qual o meningioma papilar é considerado um tumor WHO grau III e o IP para Ki-67 médio dessa neoplasia é de 15% e ele é colocado junto com meningioma anaplásico na classificação (KLEIHUES; CAVENEE, 2000). Em cães o meningioma papilar é classificado junto com os meningiomas de baixo grau, sendo que o único meningioma de alto grau é o meningioma anaplásico (KOESTNER et al., 1999).

Em astrocitomas o IP aumenta conforme aumenta o grau do tumor variando entre valores menores que 1% para tumores astrocitários com WHO grau I, valores de 1% a 4% em tumores astrocitários com WHO grau II, valores de 5% a 10% em tumores astrocitários com WHO grau III, e valores maiores que 15% para tumores astrocitários com WHO grau IV (KLEIHUES; CAVENEE, 2000). O ependimoma anaplásico é classificado como WHO grau III e possui um IP alto. Nos schwannomas embora neoplasias consideradas benignas têm um IP para Ki-67 de em média 6% enquanto em papilomas do plexo coroide o IP para Ki-67 em média é de aproximadamente 2% (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

Meduloblastomas têm o IP por Ki-67 variando entre 15% e mais de 50% com uma média de 30%, enquanto o neuroblastoma olfatório tem o IP por Ki-67 variando entre 10% e 50% (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

O tumor de parênquima pineal de diferenciação intermediária (TPPDI) apesar de não ter características morfológicas como o pineoblastoma, que é a forma blástica de tumores da glândula pineal e tem alto IP, ele não se comporta proliferativamente como o pineocitoma que tem um IP baixo, sendo que o diferencial para o diagnóstico desse neoplasma é o IP alto, separando também do neurocitoma central que pode ter aspectos semelhantes mas têm IP baixo (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; DABSS, 2006).

Os valores do IP para PCNA e Ki-67 de todos os casos estão representados na tabela 2.

No gráfico 5, temos a representação de todos os valores acompanhados do desvio padrão (DP) e média dos dados coletados na análise do IP tanto para PCNA quanto para Ki-67. Comparando os DPs e as médias dos dois marcadores se observa que há uma diferença entre os valores de PCNA e Ki-67. A diferença entre esses valores mostra que o marcador Ki-67 é mais preciso por possuir valores de DP e média menores.

O gráfico 6 apresenta os valores de IP para meningiomas, esses valores para o marcador Ki-67 são condizentes com os valores da literatura, além de mais uniformes do que os valores de PCNA. No meningioma papilar o IP foi baixo corroborando com a classificação de tumores do SN em cães, o meningioma anaplásico foi o único que obteve um valor alto de IP.

No gráfico 7, os valores de IP nos astrocitomas foram condizentes com os valores da literatura citados anteriormente e apesar do valor de IP para o astrocitoma fibrilar ter sido igual para PCNA e Ki-67, nos dois outros casos eles foram muito diferentes, mostrando o melhor desempenho do marcador Ki-67. O encéfalo do caso onde foi diagnosticado o xantastrocitoma pleomórfico foi fixado em fixador alcoólico, o que pode ter causado a marcação inadequada e disparidade com os dados.

O gráfico 8 mostra os valores de IP para o meduloblastoma e neuroblastoma olfatório, os dados obtidos a partir de PCNA e Ki-67 foram similares e adequados aos dados da literatura, além de configurarem os casos combinados com menor DP para PCNA.

No gráfico 9, os valores do IP para PCNA e Ki-67 foram muito diferentes entre si em todos os casos, com os valores de Ki-67 sendo de acordo com o IP esperado e PCNA tendo muita variação. Em especial no PPC, uma neoplasia benigna com IP para Ki-67 baixo e muito alto para PCNA que não corresponde ao aspecto e comportamento tumoral, embora os valores de IP para o caso de ependimoma anaplásico também tenha sido dispare. O caso de TPPDI tem seu diagnóstico confirmado pelo IP, pois se esse caso tivesse o IP baixo, em combinação com sua localização no neurópilo, fora da glândula pineal e acima do ventrículo lateral direito no lobo temporal, ele receberia o diagnóstico de neurocitoma central apesar das características que se assemelhavam ao pineocitoma, contudo neurocitomas centrais não tem IP alto, enquanto o TPPDI tem IP alto.

6.6 TEMPO DE EVOLUÇÃO CLÍNICA

Os períodos de evolução clínica dos casos deste estudo foram compilados na tabela 3, o tempo em dias apresentado corresponde desde o início dos sinais clínicos até o óbito do animal.

Os dados correspondem às informações coletadas durante a anamnese, esse é o motivo pelo qual alguns dos casos não puderam ser avaliados para esse quesito, pois não havia essa informação nas fichas dos animais. Outro fato importante é observar todos os dados sem fazer relações específicas aos seus valores absolutos, devido à confiança do teste estar na acurácia das informações do proprietário do animal. Em cães só podemos avaliar aquilo que passa a ser perceptível devido às falhas nas compensações das disfunções do órgão daquele cachorro, esse é o segundo viés pelo qual os dados devem ser avaliados cuidadosamente para não induzirem erros (SUMMERS; CUMMINGS; LAHUNTA, 1995a). Em humanos esses dados são mais relevantes e confiáveis, pois seres humanos podem expressar qualquer alteração que estejam sentindo e relatar a mesma às outras pessoas.

Não existe nenhuma explicação razoável pela qual determine por que apenas meningiomas têm os seus dados referentes ao início dos sinais clínicos não informados, mais da metade dos meningiomas estão com dados incompletos. Meningiomas são em sua maioria de crescimento lento e, portanto as alterações deveriam ser notadas em algum momento, entretanto o crescimento a longo termo pode trazer alterações sutis que se acumulam durante o período de modo que possam ser deixadas de lado pelo proprietário durante a avaliação clínica.

Não foi observada nenhuma correlação entre os dados do índice proliferativo (IP) e os dados do tempo de evolução clínica. Sendo assim sem considerar o IP dos tumores, temos condições de avaliar os dois extremos dos dados. As neoplasias de baixo grau de malignidade mostraram maiores períodos de evolução clínica, como por exemplo, meningioma papilar que apresentou o maior período de evolução clínica obtido de 360 dias. Da mesma forma neoplasias de maior grau de malignidade mostraram menores períodos de evolução clínica, como por exemplo, neuroblastoma olfatório e astrocitoma anaplásico que apresentaram os menores períodos de evolução clínica obtidos de apenas 30 dias.

6.7 EXPRESSÃO DE P53

A expressão de p53 tem sido estudada em astrocitomas de cães pela técnica de IHQ, no trabalho de Stoica et al. (2004), foram avaliados 31 casos de astrocitomas, entre eles GBM, astrocitoma anaplásico, fibrilar, protoplasmático, gemistocítico e pilocítico. As alterações de expressão foram encontradas em 10 casos distribuídos entre os tipos citados anteriormente. Neste mesmo estudo foi realizada sequenciamento de p53 e apenas um caso apresentou mutação, que foi detectada no códon 253 do exon 7. Esses dados mostram que tanto a expressão quanto as alterações genéticas de p53 não acompanham os dados prevalentes dessas alterações em casos de astrocitomas em humanos.

Em nosso estudo não foi observado nenhuma marcação de p53 nos tumores testados, embora o anticorpo tenha funcionado marcando células nos tecidos adjacentes. A IHQ foi realizada tanto em astrocitomas, onde são esperadas as alterações de p53 quanto em meningiomas, onde não são esperadas as alterações de p53 para ser feita uma comparação da marcação de tecidos tumorais e poder excluir colorações de fundo e artefatos provenientes do processo. Contudo raríssimos núcleos puderam ser observados marcados, onde é esperada a marcação para expressão aumentada de p53, as mesmas marcações nucleares foram de intensidade fraca, poucas marcações citoplasmáticas espalhadas tanto em células tumorais quanto em células não tumorais foram presentes nos espécimes de análise.

A marcação citoplasmática não é considerada específica para avaliar as alterações de expressão em p53, porém são possíveis de acontecerem se a proteína se acumula por algum motivo que a aprisione no citoplasma ou impeça sua degradação (DABSS, 2006).

Diferentemente de humanos o papel de p53 na tumorigênese dos astrocitomas precisa ser estudado mais profundamente. Com o genoma de cão completamente sequenciado, as formas polimórficas de p53 e as áreas de homologia gênica poderão ser comparadas com a proteína p53 humana. As possíveis diferenças na proteína em si pode explicar sua menor suscetibilidade à mutações, e esses dados serem comparados com a observação populacional de que astrocitomas não são os tumores de SN mais frequentes. Podendo assim

explicar o motivo das diferentes proporções tumorais na população humana e canina.

7 CONCLUSÕES

Os tumores do SN mais frequentes foram os meningiomas seguidos em segundo lugar pelos astrocitomas.

A idade mais acometida com tumores do SN foi de 9 anos e a raça com maior número de casos foi a raça Poodle.

Não houve predileção sexual.

Os índices proliferativos (IP) para as neoplasias referentes aos casos estudados foram estabelecidos por marcação de PCNA e Ki-67, representando o grau de malignidade da neoplasia, o IP obtido pelo marcador Ki-67 é mais uniforme.

Não houve marcação indicando a expressão de p53 alterada.

O tempo de evolução clínica dos casos com tumores de menor grau de malignidade foi maior que o tempo de evolução clínica dos casos com tumores de maior grau de malignidade.

Os marcadores de diferenciação celular foram importantes para a elaboração do diagnóstico das neoplasias.

Dois tipos de tumores que não haviam sido descritos em cães: xantoastrocitoma pleomórfico e TPPDI puderam ser diagnosticados graças ao conjunto de informações coletadas com a morfologia celular, marcadores de diferenciação celular e índice proliferativo.

REFERÊNCIAS

ADAMO, P. F.; CANTILE, C.; STEINBERG, H. Evaluation of progesterone and estrogen receptor expression in 15 meningiomas of dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 10, p. 1310-1318, 2003.

AGUIAR, P. H. P.; RAMINA, R.; VEIGA, J. C. E.; TELLA JR, O. **Meningiomas: Diagnóstico e Tratamento Clínico e Cirúrgico, Aspectos Atuais**, 1 ed., Rio de Janeiro, Revinter, p. 302, 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**, 4. ed. New York: Garland Science, p. 2002.

ALI, I. U.; SCHWEITZER, J. B.; IKEJIRI, B.; SAXENA, A.; ROBERTSON, J. T.; OLDFIELD, E. H. Heterogeneity of subcellular localization of p53 protein in human glioblastomas. **Cancer Research**, v. 54, p. 1-5, 1994.

BAGLEY, R. S.; GAVIN, P.R.; MOORE, M. P.; SILVER, G. M.; HARRINGTON, M. L.; CONNORS, R. L. Clinical signs associated with brain tumors in dogs: 97 cases (1992-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 6, p. 818-819, 1999.

BAGLEY, R. S.; SILVER, G. M.; GAVIN, P. R. Cerebellar cystic meningioma in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 36, p. 413-415, 2000.

BAGLEY, R. S.; WHEELER, S. J.; KLOPP, L.; SORJONEN, D. C.; THOMAS, W. B.; WILKENS, B. E.; GAVIN, P. R.; DENNIS, R. Clinical features of trigeminal nerve-sheath tumor in 10 dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 19-25, 1998.

BARNHART, K. F.; WOJCIESZYN, J.; STORTS, R. W. Immunohistochemical staining patterns of canine meningiomas and correlation with published immunophenotypes. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 3, p. 311-321, 2002.

BEGEMANN, M.; FULLER, G. N.; HOLLAND, E. C. Genetic modeling of glioma formation in mice. **Brain Pathology**, v. 12, n. 1, p. 117-32, 2002.

BEIER, D.; HAU, P.; PROESCHOLDT, M.; LOHMEIER, A.; WISCHHUSEN, J.; OEFNER, P.J.; AIGNER, L.; BRAWANSKI, A.; BOGDAHN, U.; BEIER, C.P.

CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles.. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4010-4015, 2007.

BERGAMASCHI, D.; GASCO, M.; HILLER, L.; SULLIVAN, A.; SYED, N.; TRIGIANTE, G.; YULUG, I.; MERLANO, M.; NUMICO, G.; COMINO, A.; ATTARD, M.; REELFS, O.; GUSTERSON, B.; BELL, A. K.; HEATH, V.; TAVASSOLI, M.; FARREL, P. J.; SMITH, P.; LU, X.; CROOK, T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. **Cancer Cell**, v. 3, n. 4, p. 387-402, 2003.

BÖGLER, O.; HUANG, H. J.; KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K. The p53 gene and its role in human brain tumors. **Glia**, v. 15, n. 3, p. 308-327, 1995.

BOLLAND, C.R.; RICCIARDIELLO, L. How many mutations does it take to make a tumor? **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 96, n. 26, p. 14675-14677, 1999.

CANTILE, C.; CAMPANI, D.; MENICAGLI, M.; ARISPICI, M. Pathological and immunohistochemical studies of choroid plexus carcinoma of the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, n. 2-3, p. 183-193, 2002.

CAPPELLO, F.; RIBBENE, A.; CAMPANELLA, C.; CZARNECKA, A. M.; ANZALONE, R.; BUCCHIERI, F.; PALMA, A.; ZUMMO, G. The value of immunohistochemical research on PCNA, p53 and heat shock proteins in prostate cancer management: a review. **European Journal of Histochemistry**, v. 50, n. 1, p. 25-34, 2006.

DERMITZEL, R. Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? **Brain Research**, v. 26, n. 2-3, p. 176-183, 1998.

DERMITZEL, R., SPRAY, D. C. From neuro-glue ('Nervenkitt') to glia: a prologue **Glia**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 1998.

DINIZ, S. A.; ANDRADE-NETO, J. P.; HOSOMI, F. Y. M.; VIOLIN, K. B.; RAMOS, A. T.; MACHADO, G. F.; MAIORKA, P. C. Encefalite do cão Pug: primeiro diagnóstico do Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 11, n. 64, p. 76-78, 2006.

GAVIN, P. R.; FIKE, J. R.; HOOPES, P. J. Central Nervous System Tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. Small Animal**, v. 10, n. 3, p. 180-189, 1995.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **The Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.

GOING, J. J.; GUSTERSON, B. A. Molecular pathology and future developments. **European Journal of Cancer**, v.35, n.14, p.1895-904, 1999.

GRECO, J. J.; AIKEN, S. A.; BERG, J. M.; MONETE, S.; BERGMAN, P. J. Evaluation of intracranial meningioma resection with a surgical aspirator in dogs: 17 cases (1996-2004). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 229, n. 3, p. 394-400, 2006.

HATAKA, A.; OLIVEIRA, D.; MARQUES, M. M.; PAULINO J. R.; FELIX, M.; ROCHA, N. S. Oligodendroglioma em cão – Relato de Caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 2003, Botucatu. Botucatu : UNESP, 2003. p. 278.

HEIDNER, G. L.; KORNEGAY, J. N.; PAGE, R. L.; DODGE, R. K.; THRALL, D. E. Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 4, p. 219-226, 1991.

HILTON, D. A.; LOVE, S.; BARBER, R.; ELLISON, D.; SANDEMAN, D. R. Accumulation of p53 and Ki67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas or the response of these tumors to radiotherapy. **Neurosurgery**, v. 42, p. 724-729, 1998.

HOSOMI, F. Y. M.; RAMOS, A. T.; MASUDA, E. K.; TROST, M. E.; GRAÇA, D. L.; MAIORKA, P. C. Aspectos clínico-patológicos em casos de meningoencefalite necrosante canina. **Clínica Veterinária**, v. 14, n. 81, p. 62-68, 2009.

JALAVA, P.; KUOPIO, T.; JUNTITI-PATINEN, L.; KOTKANSALO, T.; KRONQVIST, P.; COLLAN, Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. **Histopathology**, v. 48, p. 674-682, 2006.

JOHNSON, G. C. Genesis and pathology of tumors of the nervous system. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. Small Animal**, v. 5, n. 4, p. 210-222, 1990.

JUBB, K. V. F.; HUXTABLE, C. R. The nervous system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, v. 1, p. 780, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 339, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 529, 2007.

KALDRYMIDOU, E.; POLIZOPOULOU, Z. S.; PAPAIOANNOU, N.; KOUTINAS, A. F.; POUTAHIDIS, T.; PAPADOPOULOS, G. Papillary meningioma in the dog: a clinicopathological study of two cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, p. 227-230, 2001.

KAYASELÇUK, F.; ZORLUDEMIR, S.; GÜMÜRDÜLÜ, D.; ZEREN, H.; ERMAN, T. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 57, p. 115-121, 2002.

KIMMELMAN, J.; NALBANTOGLU, J. Faithful companions: a proposal for neurooncology trials in pet dogs. **Cancer Research**, v. 67, n. 10, p. 4541-4544, 2007.

KITAGAWA, M.; KANAYAMA, K.; SAKAI, T. Cystic meningioma in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 272-274, 2002.

KLEIHUES, P.; CAVENNE, W. K. **Pathology and genetics of tumours of the nervous system**, Lyon, France: IARCPress, 2000, 314 p.

KOESTNER, A.; BILZER, T.; FALTZER, R.; SCHULMAN, F. Y.; SUMMERS, B. A.; VAN WINKLE, T. J. **The Who international histological classification of tumors of the nervous system of domestic animals**, 2. ed. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. v. 5.

KOESTNER, A.; HIGGINS, R. J. Tumors of the nervous system in: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**, 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KRAFT, S. L.; GAVIN, P. R.; DEHANN, C.; MOORE, M.; WENDLING, L. R.; LEATHERS, C. W. Retrospective review of 50 intracranial tumors evaluated by magnetic resonance imaging. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 218-225, 1997.

KRAUS, K. H.; McDONNELL, J. Identification and management of brain tumors. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. Small Animal**, v. 11, n. 4, p. 218-224, 1996.

KUBE, S. A.; BRUYETTE, D. S.; HANSON, S. M. Astrocytomas in Young Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, p. 288-293, 2003.

KUWAMURA, M.; KOTERA, T.; YAMATE, J.; KOTANI, T.; AOKI, M.; HORIJA. Cerebral ganglioneuroblastoma in a golden retriever dog. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 3, p. 282-284, 2004.

LIPSITZ, D.; HIGGINS, R. J.; KORTZ, G. D.; DICKINSON, P. J.; BOLLEN, A. W.; NAYDAN, D. K.; LECOUEUR, R. A. Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 659-669, 2003.

MADEWELL, B.R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, p.334-340, 2001.

MAIORKA, P. C.; DINIZ, S. A.; ANDRADE-NETO, J. P.; FONSECA-PINTO, A. C. B. C.; HOSOMI, F. Y. M.; VIOLIN, K. B.; DAGLI, M. L. Z. Neoplasias intracranianas em cães: estudo clínico e anatomopatológico. In: XII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2005, Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, FEP MVZ Editora, v. 57, p. 115-115, 2005.

MANDARA, M. T.; RICCI, G.; RINALDI, L.; SARLI, G.; VITELLOZZI, G. Immunohistochemical identification and image analysis quantification of oestrogen and progesterone receptors in canine and feline meningioma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 214-218, 2002.

MATHEWS, M. B. The Proliferating cell nuclear antigen, PCNA, a cell growth-regulated DNA replication factor In: WANG, E.; WARNER, H. R. **Growth control during cell aging**, Pittsburg: CRC Press, 1989.

MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**, 4. ed. Ames: Iowa State Press, 2002.

MOORE, M. P.; BAGLEY, R. S.; HARRINGTON, M. L.; GAVIN, P. R. Intracranial tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 4, p. 759-777, 1996.

NAKAYAMA, H.; UCHIDA, K.; DOI, K. A comparative study of age-related brain pathology - are neurodegenerative diseases present in nonhuman animal? **Medical Hypothesis**, v. 63, p. 198-202, 2004.

OHGAKI, H.; DESSEN, P.; JOURDE, B.; HORSTMANN, S.; NISHIKAWA, T.; DI PATRE, P.-L.; BURKHARD, C.; SCHÜLER, D.; PROBST, N.; MAIORKA, P. C.; BAEZA, N.; PISANI, P.; YONEKAWA, Y.; YASARGIL, M. G.; LÜTOLF, U. M.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Research**, v. 64, p. 6892-6899, 2004.

PATNAIK, A. K.; KAY, W. J.; HURVITZ, A. I. Intracranial meningioma: a comparative pathologic study of 28 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 4, p. 369-373, 1986.

PÉREZ, V.; VIDAL, E.; GONZÁLEZ, N.; BENAVIDES, J.; FERRERAS, M. C.; VILLAGRASA, M.; PUMAROLA, M. Orbital meningioma with a granular cell component in a dog with extra cranial metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 212-217, 2005.

PLATT, S. R.; SCASE, T. J.; ADAMS, V.; WIECZOREK, L.; MILLER, J.; ADAMO, F.; LONG, S. Vascular endothelial growth factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient survival. **Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 663-668, 2006.

QUIÑONES-HINOJOSA, A.; SANAI, N.; SMITH, J. S.; MCDERMOTT M. W. Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 74, p. 19-30, 2005.

SCAMARAL, J.; CHAVES, M. A. Meningeoxotelioma de tipo epitelióide, invasor - reporte de um caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1999. Belo Horizonte. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1999. p. 113.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-22, 2000.

SCHULMAN, F. Y.; RIBAS, J. L.; CARPENTER, J. L.; SISSON, A. F.; LECOUEUR, A. A. Intracranial meningioma with pulmonary metastasis in three dogs. **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 196-202, 1992.

SHARKEY, L. C.; DONNELL, J. J.; ALRGY, J. Citology of a mass on the meningeal surface of the left brain in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 2, p. 111-114, 2004.

SHI, S. R.; COTE, R. J.; CHAIWUN, B.; YOUNG, L. L. SHI, Y.; HAWES, D.; CHEN, T.; TAYLOR, C. R. Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin-fixed tissue sections. **Applied Immunohistochemistry**, v. 6, n. 2, p. 89-96, 1998.

SINGH, S. K.; CLARKE, I. D.; TERASAKI, M.; BONN, V. E.; HAWKINGS, C.; SQUIRE, J.; DIRKS, P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Research**, v. 63, p. 5821–5828, 2003.

SIRICA, A. E. **Cellular and molecular pathogenesis**, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 557, 1996.

SISÓ, S.; LORENZO, V.; FERRER, I.; VILLAGRASSA, M.; PUMAROLA, M. An anaplastic astrocytoma (optic chiasmatic-hypothalamic glioma) in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 5, p. 567-569, 2003.

SNYDER, J. M.; SHOFR, F. S.; VAN WINKLE, T. J.; MASSICOTE, C. Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986-2003). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 669-675, 2006.

STOICA, G.; KIM, H. T.; HALL, D. G.; COATES, J. R. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 10-19, 2004.

STOICA, G.; LUNGU, G.; MARTINI-STOICA, H.; WAGHELA, S.; LEVINE, J.; SMITH III, R. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 3, p. 391-406, 2009.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**, St Louis, MO, Mosby, p. 527, 1995a.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. Tumor of the central nervous system. In: SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**, St Louis, MO, Mosby, p. 351-395, 1995b.

THOMAS, W. B.; WHEELER, S. J.; KRAMER, R.; KORNEGAY, J. N. Magnetic resonance imaging features of primary brain tumors in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 37, n. 1, p. 20-27, 1996.

THOMSON, S. A. M.; KENNERLY, E.; OLBY, N.; MICKELSON, J. R.; HOFFMANN, D. E.; DICKINSON, P. J.; GIBSON, G.; BREEN, M. Microarray Analysis of Differentially Expressed Genes of Primary Tumors in the Canine Central Nervous System. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 550-558, 2005.

TROCHA, S. D.; GUPTA, R. K.; MORTON, D. L. Tumor Markers in Melanoma in: DIAMANDIS, E. P. et al. **Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications**, 1 ed., American Association for Clinical Chemistry Press, 2002.

TURREL, J. M.; FIKE, J. R.; LECOUTER, R. A.; HIGGINS, R. J. Computed tomographic characteristics of primary brain tumors in 50 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 8, p. 851-856, 1986.

UNO, M.; OBA-SHINJO, S. O.; AGUIAR, P. H. P.; LEITE, C. C.; ROSEMBERG, S.; MIURA, F. K.; MARINO JR., R.; SCAFF, M.; MARIE, S. K. N. Detection of somatic TP53 splice site mutations in diffuse astrocytomas. **Cancer Letters**, v. 224, n. 2, p. 321-327, 2005.

VIOLIN, K. B.; HOSOMI, F. Y. M.; DINIZ, S. A.; ANDRADE NETO, J. P.; MAIORKA, P. C. Meduloblastoma - Estudo de Casos.. In: IV ONCOVET - Simpósio de Oncologia Veterinária, 2006, São Paulo. **Anais do IV ONCOVET** - Simpósio de Oncologia Veterinária, p. 53-53, 2006.

VIOLIN, K. B.; HOSOMI, F. Y. M.; DINIZ, S. A.; ANDRADE-NETO, J. P.; MAIORKA, P. C. Doenças neurológicas em cães: estudo de casos no período 2002-2007. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA. ENAPAVE, 13; 2007, Campo Grande. **Anais do XIII ENAPAVE** 2007.

VIOLIN, K. B.; QUEIROZ, N. G. T.; HOSOMI, F. Y. M.; RAMOS, A. T.; AMARAL, H. A.; KOGIKA, M. M.; MACHADO, G. F.; MAIORKA, P. C. Meningoencefalite necrotizante de cão Maltês. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 836-838, 2008.

VURAL, S. A.; BESALTI, O.; ILHAN, F.; OZAK, A.; HALIGUR, M. Ventricular ependymoma in a German Shepherd dog. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 185-187, 2006.

YOSHINO, T.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S.; YAMAGUCHI, R.; NAKAYAMA, H.; GOTO, N. A Retrospective study of canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 2, p. 230-234, 1996.

ANEXOS

Protocolo de coloração das lâminas histológicas

- 1) Hematoxilina e Eosina (HE)
 - a. Xilól durante 10 minutos
 - b. Xilól durante 10 minutos
 - c. Álcool 100° durante 3 minutos
 - d. Álcool 95° durante 3 minutos
 - e. Álcool 70° durante 3 minutos
 - f. Água corrente durante 3 minutos
 - g. Hematoxilina durante 5 minutos
 - h. Água corrente durante 3 minutos
 - i. Álcool ácido uma lavagem
 - j. Água corrente durante 10 minutos
 - k. Eosina durante 1 minuto
 - l. Álcool 95° durante 1 minutos
 - m. Álcool 100° durante 2 minutos
 - n. Álcool 100° durante 2 minutos
 - o. Xilól durante 2 minutos
 - p. Xilól durante 2 minutos
 - q. Montagem da lamínula com resina.