

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**OS NERVOS PERIFÉRICOS E SUAS ALTERAÇÕES
NEOPLÁSICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline de Marco Viott

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

OS NERVOS PERIFÉRICOS E SUAS ALTERAÇÕES NEOPLÁSICAS

por

Aline de Marco Viott

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^ª Dominguita Lühers Graça

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Viott, Aline de Marco

V799n

Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas / Aline de Marco Viott ; orientador Dominguita Lühers Graça. - Santa Maria, 2006

128 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2006.

Medicina veterinária 2. Nervos periféricos 3. Schwannomas 4. Neurofibromas 5. Histoquímica 6. Imunoistoquímica I. Graça, Dominguita Lühers, orient. II. Título

CDU: 619:616.8

Ficha catalográfica elaborada por

Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160

Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2006

Todos os direitos autorais reservados a Aline de Marco Viott. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Avenida Presidente Kennedy, 101, apto 202, bloco C, Residencial Diplomata, Bairro Campinas, São José, Sc, 88101-080

Fone: (0xx)48 32470381; End. Eletr: alinedemarco@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

OS NERVOS PERIFÉRICOS E SUAS ALTERAÇÕES NEOPLÁSICAS

elaborado por
Aline de Marco Viott

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dominguita Lühers Graça, PhD
(Presidente/Orientador)

Gláucia Denise Kommers, PhD (UFSM)

Cristina Gevehr Fernandes, Dra. (UFPEl)

Santa Maria, 9 de Janeiro de 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me segurado em seus braços nos momentos de maior dificuldade. Em segundo por ter colocado em minha existência pessoas tão maravilhosas como minha família, orientadores e amigos; sem os quais eu nunca teria chegado até aqui.

A minha “mãe científica” Dominguita L. Graça, agradeço os ensinamentos, os auxílios e as horas dedicadas para a realização desse trabalho. Agradeço todos os sorrisos pela manhã e todas as palavras de carinho que incentivaram o meu trabalho durante esses dois anos maravilhosos de convívio.

A minha co-orientadora Prof^a Glaucia Kommers, o meu mais sincero obrigado, tanto no que se refere às técnicas de laboratório e “dicas” nas horas de dificuldade quanto à amizade compartilhada. Muito obrigada por encher os meus dias de alegria e paz.

Aos prof^o Luis Francisco Irigoyen e Claudio Barros pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço a todos os meus amigos do Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, em especial aos meus companheiros de sala (Adriano, Andréia, Brenda, Eduardo e Marione) a nossa amizade estará sempre em meu coração.

A minha mãe símbolo de força e luta, muito obrigada pelo amor incondicional e constante dedicação: te amo!

Ao meu namorado, Everton Poletto, muito obrigado pelo incentivo, paciência e principalmente pelo amor desses anos de convívio. À família maravilhosa que tanto amo, Walter, Regina e Eveline seus carinhos foram e são fundamentais para a minha trajetória, muito obrigada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

OS NERVOS PERIFÉRICOS E SUAS ALTERAÇÕES NEOPLÁSICAS

AUTORA: ALINE DE MARCO VIOTT

ORIENTADORA: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 9 de janeiro de 2006.

Foi realizada uma revisão sobre os nervos periféricos (NP) com ênfase nas suas neoplasias e nas células de Schwann. As funções das células de Schwann durante o desenvolvimento do SNP bem como sua importância na reparação e remielinização do sistema nervoso foram enfocadas. A literatura consultada mostra a descoberta de numerosas funções dessas células assim como novos fatores de crescimento e genes que influenciam o desenvolvimento do SNP. Foi realizado um levantamento retrospectivo das neoplasias de SNP nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) entre 1964 e 2004. Foram registrados 12 tumores, 7 schwannomas e 5 neurofibromas. Destes, 9 (4 schwannomas e 5 neurofibromas) foram submetidos a técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas e avaliados sob os aspectos clínicos e morfológicos. Histologicamente, aspectos como caracterização do tipo celular neoplásico, forma, diferenciação celular, número de mitoses, atipia celular, presença de cápsula, infiltração das células neoplásicas no tecido além de outras alterações como edema, hemorragia, necrose e inflamação foram avaliados. Através da técnica do tricrômico de Masson e do Picrosírius red observou-se que o tecido conjuntivo era mais abundante nos neurofibromas e que os colágenos tipo I e tipo III foram característicos dessas neoplasias. No presente estudo, a técnica de AgNOR não foi eficiente como indicador de prognóstico já que não houve diferença estatística significativa entre os neurofibromas benignos e malignos e os schwannomas benignos e malignos. Os neurofibromas foram caracterizados, através da técnica do azul de toluidina, por uma concentração alta e difusa de mastócitos. Nos schwannomas essa população celular era restrita a poucas áreas. Essa marcada diferença entre as neoplasias deve-se ao fato de que os neurofibromas são constituídos de tecido endoneural reativo onde os mastócitos são normalmente encontrados. Imunoistoquimicamente houve forte marcação para a vimentina (100%) e S100 (100%) comprovando a eficiência desses anticorpos no diagnóstico dos tumores de SNP. O GFAP marcou aleatoriamente os schwannomas e todas as células de Schwann presentes nos fascículos nervosos dos neurofibromas. O GFAP deve ser usado junto com outros marcadores imunoistoquímicos e com outras técnicas de laboratório para promover um diagnóstico preciso.

Palavras-Chaves: nervos periféricos, schwannomas, neurofibromas, histoquímica e imunoistoquímica.

ABSTRACT

MS Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PERIPHERICAL NERVES AND RELATED NEOPLASMS

AUTHOR: ALINE DE MARCO VIOTT

ADVISER: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Santa Maria, January 09, 2006.

A review on the peripheral nervous system (PNS) with emphasis on Schwann cells and neoplastic lesions of the system was performed. Schwann cells functions during PNS development as well as their importance during repair of nerve fibers and myelin within the nervous system were approached. Literature review points to numerous functions of Schwann cells and to new growth factors and genes that influence PNS development. A retrospective study of PNS tumors was made from the files of the Veterinary Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria, Brazil, between 1964 and 2004. Peripheral nerve tumors summed up 12, 7 schwannomas and 5 neurofibromas. From those, 9 were studied from their clinical and macroscopical aspects, and histologically by histochemistry and immunohistochemistry. Histological features as neoplastic cell type, shape, cell differentiation, mitotic index, atypic cellular changes, encapsulation, neoplastic cells infiltration on surrounding tissues, edema, hemorrhage, necrosis, and inflammation were evaluated. Masson's trichrome and Picrosírius red staining methods heightened connective tissue components that were more prevalent in neurofibromas with a characteristic deployment of collagens I and III. In AgNOR techniques both benign and malignant schwannomas and neurofibromas did not show significant statistic differences. Mast cells stained by toluidine blue were more prevalent in neurofibromas which are rich in reactive endoneurium. Schwannomas (100%) and neurofibromas (100%) were positive for vimentin and S100 protein, so they prove to be reliable for the diagnosis of PNS tumors. GFAP marked cells were randomly found within schwannomas and Schwann cells within neurofibromas, and this labelling must be used together with other techniques to reach and accurate diagnosis.

Key words: peripheral nerves, schwannomas, neurofibromas, histochemistry, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Diagrama dos componentes do SNP. O epineuro (EP) contém colágeno, vasos sanguíneos e algum tecido adiposo. As células planas do perineuro (PN) são unidas por junções oclusivas formando camadas lamelares separadas por fibras de colágeno. Os corpos de Renaut (R) projetam-se para o endoneuro (EN). As células de Schwann formam lamelas de mielina (M) que circundam os axônios de maior diâmetro. Múltiplos axônios não mielinizados (UM) são invaginados através do citoplasma das células de Schwann. Outros elementos incluindo fibroblastos (Fb), mastócitos (Mc), capilares (cap) e colágeno (col) também são vistos. Fonte: Ortiz-Hidalgo & Weller, 1997.23
- FIGURA 2 – O compartimento endoneural (EN) contém fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas e células de Schwann que é cercada pelo perineuro (PN). Fonte: Ortiz-Hidalgo & Weller, 1997.24
- FIGURA 3 – Desenvolvimento das células de Schwann (CS) a partir das células da crista neural.26
- FIGURA 4 – Expressão dos fatores de transcrição que regulam a diferenciação das células de Schwann e seus precursores durante o desenvolvimento fetal e pós-natal. Fonte: modificado de Topilko & Meijer, 2001.27
- FIGURA 5 – Diagrama resumindo os eventos que ocorrem durante a degeneração e regeneração dos axônios. A. Nervo normal. B. Sete dias após a lesão axonal; observam-se células de Schwann, restos de axônios e debris de mielina. As células de Schwann estão em mitose para formar novas bandas de Büngner. C. Projeções axonais são emitidas a partir do final tumefeito do axônio proximal. D. O axônio começa a ser mielinizado. E. A conexão com o órgão é restabelecida, e os internodos regenerados são curtos. Fonte: Ortiz-Hidalgo & Weller, 1997.36

FIGURA 6 – Principais fatores tróficos que auxiliam no processo regenerativo do sistema nervoso periférico, receptores e mecanismo de ação mais importante. BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo), NT (neurotropina), NGF (fator do crescimento do nervo), trk (receptor de alta afinidade).....	39
FIGURA 7 – Mecanismo pelo qual os axônios são guiados erroneamente na regeneração. Durante o reparo os axônios podem crescer dentro da banda de Büngner do nervo colateral, o que promove a conexão errada.	44
FIGURA 8 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma localizado no plexo braquial de um canino. Ao corte, a neoplasia apresenta uma cor esbranquiçada homogênea de aspecto concêntrico.	75
FIGURA 9 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma ocular de um canino. Observa-se uma proliferação neoplásica composta de células fusiformes que se arranjam em paliçada (padrão Antoni tipo A). H&E. Barra 50 µm. B. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Células de Schwann neoplásicas dispostas em vários sentidos. H&E. Barra 30 µm. C. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Há áreas pouco celulares onde as células se organizam numa textura frouxa, envoltas por uma matriz mixóide basofílica (padrão Antoni tipo B). H&E. Barra 30 µm.....	77
FIGURA 10 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observam-se pequenas ilhas de tecido ósseo envoltas por ninhos de células fusiformes neoplásicas (schwannoma com diferenciação óssea). H&E. Barra 30 µm.....	79
FIGURA 11 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma, região cervical de um canino. Área focalmente extensa de hemorragia. H&E. Barra 50 µm.....	79
FIGURA 12 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, fígado de um bovino. A neoplasia caracteriza-se pela formação de ninhos concêntricos separadas por feixes finos. Os axônios são segregados por feixes de células neoplásicas. H&E. Barra 50 µm.	81
FIGURA 13 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, fígado de um bovino. As células neoplásicas e inflamatórias se infiltram através do espaço periportal comprimindo vasos sanguíneos e ductos biliares. H&E. Barra 50 µm.....	81
FIGURA 14 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, região cervical de um bovino. Infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário e neutrofilico moderado é observado entre as células neoplásicas. H&E. Barra 30 µm.....	83

FIGURA 15 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, fígado de um bovino. Observam-se corpos neuronais em meio a proliferação tumoral. H&E. Barra 30 µm.....	83
FIGURA 16 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma com diferenciação óssea, plexo braquial de um canino. O tecido ósseo está suavemente corado em azul. Tricrômico de Masson. Barra 50 µm. B. Neurofibroma, fígado de um bovino. Observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo ao redor dos nervos (perineuro). No endoneuro as fibras de tecido conjuntivo estão dispostas em pequenos feixes aleatórios. Tricrômico de Masson. Barra 50 µm.....	85
FIGURA 17 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma, região cervical de um canino. Há uma intensa proliferação de fibras grossas, vermelhas fortemente birrefringentes (colágeno tipo I) na cápsula da neoplasia. Picrosírius red. Barra 50 µm. B. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observam-se filamentos finos e esverdeados, fracamente birrefringentes, (colágeno tipo III) entremeados às fibras de colágeno tipo I. Picrosírius red. Barra 30 µm.....	87
FIGURA 18 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Neurofibroma, região cervical de um bovino. Há grande quantidade de fibras vermelhas, grossas, fortemente birrefringentes (colágeno tipo I) no perineuro e no endoneuro. Picrosírius red. Barra 50 µm. B. Neurofibroma, fígado de um bovino. Filamentos finos, esverdeados, fracamente birrefringentes (colágeno tipo III) são observados em grande quantidade entre fibras amarelas fortemente birrefringentes (colágeno tipo I). Picrosírius red. Barra 50 µm.....	89
FIGURA 19 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Os pontos pretos representam as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR). A. Schwannoma bem diferenciado, região cervical de um canino (AgNOR=1,69). AgNOR. Barra 30 µm. B. Schwannoma pouco diferenciado, plexo braquial de um canino (AgNOR=1,87). AgNOR. Barra 30 µm. C. Neurofibroma bem diferenciado, região cervical de um bovino (AgNOR=1,69). AgNOR. Barra 30 µm. D. Neurofibroma pouco diferenciado, fígado de um bovino (AgNOR=1,84). AgNOR. Barra 30 µm.....	91
FIGURA 20 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Neurofibroma, região cervical de um bovino. No centro da imagem observa-se um grupo de mastócitos. Azul de toluidina. Barra 30 µm. B. Schwannoma, região cervical de um canino. Raros mastócitos são detectados no tumor. Azul de toluidina. Barra 30 µm.....	93

FIGURA 21 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Controle negativo, anticorpo anti-vimentina, não há marcação nas células neoplásicas. Imunoistoquímica. Barra 50 µm. B e C. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observa-se forte marcação do citoplasma das células e seus prolongamentos pelo anticorpo anti-vimentina. Imunoistoquímica. Barra 30 µm.....	95
FIGURA 22 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, língua de um bovino. As células neoplásicas fusiformes do neurofibroma estão imunomarcadas pelo anticorpo anti-vimentina. Observe a ausência de marcação nos linfócitos presentes entre as células neoplásicas. Imunoistoquímica. Barra 30 µm.....	97
FIGURA 23 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Controle negativo, anticorpo anti-S100, não há marcação nas células neoplásicas e nos osteócitos. Imunoistoquímica. Barra 50 µm. B. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observe a forte marcação das células neoplásicas e dos osteócitos pelo anticorpo anti-S100. Imunoistoquímica. Barra 50 µm. C. Schwannoma, olho de um canino. Há forte marcação do citoplasma das células em paliçada pelo anticorpo anti-S100. Imunoistoquímica. Barra 30 µm.....	99
FIGURA 24 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Neurofibroma, fígado de um bovino. As células neoplásicas estão marcadas pelo anticorpo anti-S100. Observe que as células de Schwann presentes no fascículo nervoso também apresentam imunomarcação. Imunoistoquímica. Barra 50 µm. B. Neurofibroma, região cervical de um bovino. As células neoplásicas do neurofibroma estão intensamente marcadas pelo anticorpo anti S100. Imunoistoquímica. Barra 30 µm.	101
FIGURA 25 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma, região cervical de um canino. Há uma marcação irregular do citoplasma das células neoplásicas pelo anticorpo anti-GFAP. Imunoistoquímica. Barra 30 µm.....	103
FIGURA 26 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, fígado de um bovino. Não há marcação das células neoplásicas do neurofibroma pelo anticorpo anti-GFAP. Nos fascículos nervosos há forte marcação das células de Schwann. Imunoistoquímica. Barra 50 µm.....	103

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Principais diferenças entre as células da crista migrantes e os precursores de células de Schwann em ratos e camundongos. Fonte: Mirsky & Jessen, 2001.....	28
QUADRO 2 – Principais diferenças entre os precursores das células de Schwann e células de Schwann imaturas do nervo ciático de ratos e camundongos. Fonte: Mirsky <i>et al.</i> , 2001.....	30
QUADRO 3 - Ações das neurotrofinas na regeneração do sistema nervoso. Fonte: Levitan & Kaczmarek, 2001.....	40
QUADRO 4 – Principais eventos bioquímicos após lesão aos axônios periféricos. Fonte: modificado de Brown, 2001.	43
QUADRO 5 – Caracterização histoquímica e ultra-estrutural dos tipos de colágenos mais comuns Fonte: Montes & Junqueira, 1991.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Distribuição dos tumores de SNP (schwannomas e neurofibromas) nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria entre os anos de 1964 e 2004.65
- GRÁFICO 2 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Associação entre as neoplasias (neurofibroma e schwannoma) e a frequência de AgNOR. As linhas horizontais (vermelhas) representam a média de AgNOR em cada tumor.73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Distribuição dos schwannomas de acordo com a espécie, sexo, idade e raça.	66
TABELA 2 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Distribuição dos neurofibromas de acordo com a espécie, sexo, idade e raça.	67
TABELA 3 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Características histológicas dos schwannomas e neurofibromas.	70
TABELA 4 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Presença e quantificação do tecido conjuntivo fibroso nos neurofibromas e schwannomas.	71
TABELA 5 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Quantificação do número de mastócitos nos neurofibromas e schwannomas.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	Acetil colina
A	Adenina
BE	Brometo de etídio
B-FABP	Proteína ácida de ligação da gordura cerebral
BMP	Proteína morfogenética do osso
BDNF	Fator derivado da neurotropina do encéfalo
C	Citosina
cAMP	AMP cíclico
Cga	Campo de grande aumento
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<i>C-Jun</i>	Gene C-Jun FT
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
Con	Conexina
<i>C-ret</i>	Gene C-Ret
CS	Célula de Schwann
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EMA	Antígeno de membrana epitelial
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FT	Fator de transcrição
G	Guanina
GAP	Junções comunicantes
GDNF	Fator neurotrófico derivado glial
GGF	Fator de crescimento glial
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLM	Membrana limitante glial
GrF	Fator liberador da gonadotrofina
L1	Molécula de adesão L1
IL	Interleucina
IFG	Fator semelhante à insulina
LDP	Linha densa principal
LEU-7	Glicoproteína associada à mielina
LIF	Fator inibidor da leucemia
LI	Linha intraperiódica
MAG	Glicoproteína associada à mielina
MAP	Proteína ativada mitogênica
MBP	Proteína básica da mielina

MDM	Membranas derivadas da mielina
MMPS	Matriz metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
N-CAM	Molécula de adesão neural
NG2	Proteoglicano de superfície celular
NGF	Fator de crescimento do nervo
NGFR	Receptores do fator do crescimento do nervo
NT	Neurotropina
NRG	Neuregulinas do crescimento
NSE	Enolase específica do neurônio
P	Substância P
P ₂	Proteína mielínica 2
P ₀	Proteína mielínica zero
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator do crescimento derivado das plaquetas
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PLC γ	Fosfolipase C gama
PLP	Proteína proteo-lipídica
PMP	Proteína mielínica periférica
<i>Ras</i>	Sistema da renina angiotensina
S100	Filamento intermediário intracitoplasmático
SRY	“motif” do gene determinante do testículo
SMAD	Proteínas moderadoras do fator do crescimento transformante
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
STAT	Transdutores e ativadores do sinal de transcrição
T	Timina
TBSNP	Tumores benignos do sistema nervoso periférico
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TMBNP	Tumores malignos de bainha de nervo periférico
TSNP	Tumores do sistema nervoso periférico
tRK	Receptores de auto-afinidade

LISTA DE ANEXOS

ANEXO (A) 1 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Método do Tricrômico de Masson.....	120
ANEXO (B) 2 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas Técnica do Picrosírius red (Sírius Red)	125
ANEXO (C) 3 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Técnica de AgNOR..	126

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE (A) 1 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Protocolo de imunoistoquímica (IHQ) para vimentina, S100 e GFAP.	127
---	-----

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE GRÁFICOS	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
LISTA DE ANEXOS	16
LISTA DE APÊNDICES	18
SUMÁRIO.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Histofisiologia dos Nervos Periféricos.....	22
2.1.1 Epineuro	22
2.1.2 Perineuro.....	23
2.1.3 Endoneuro.....	25
2.2 Origem da linhagem das células de Schwann na crista neural.....	25
2.3 Moléculas que regulam a geração, proliferação e diferenciação das células de Schwann	26
2.4 Funções das células de Schwann.....	33
2.4.1 Durante o desenvolvimento do sistema nervoso	33
2.4.2 Mielinização do sistema nervoso periférico	33
2.4.3 Reparação do sistema nervoso periférico	35
2.4.4 Remielinização do sistema nervoso central (SNC)	44

2.5	As células de Schwann e o modelo do Brometo de etídio (BE).....	46
2.6	Neoplasias do Sistema Nervoso Periférico.....	48
2.6.1	Schwannoma.....	49
2.6.2	Neurofibroma	53
2.6.3	Perineuroma.....	55
2.6.4	Tumores malignos de bainha de nervo periférico (TMBNP).....	57
2.7	Regiões Organizadoras Nucleolares Arginofílicas (AgNOR).....	58
2.8	Método do Picrosírius Polarizado	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1	Aspecto histológico	61
3.2	Tricrômico de Masson.....	62
3.3	Picrosírius Red.....	62
3.4	AgNOR.....	63
3.5	Azul de toluidina	63
3.6	Imunoistoquímica	64
4	RESULTADOS	65
4.1	Epidemiologia.....	65
4.2	Apresentação dos tumores de SNP de acordo com os aspectos macroscópico e histológico	67
4.3	Quantificação do tecido conjuntivo fibroso nas neoplasias do SNP (tricrômico de Masson)	71
4.4	Qualificação do tecido conjuntivo nas neoplasias do SNP (Picrosírius Red)	72
4.5	Técnica de AgNOR nas neoplasias de SNP	72
4.6	Técnica do Azul de toluidina para quantificação de mastócitos nas neoplasias de SNP	73
4.7	Imunoistoquímica	74
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÕES	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	ANEXOS.....	120
	APÊNDICE	127

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso, juntamente com o sistema endócrino, é responsável pela maioria das funções de controle do organismo. O sistema nervoso é único na imensa complexidade das ações de controle que pode realizar (GUYTON, 1989). Ele é formado por um grupo complexo de órgãos que são constituídos de neurônios, tecido conjuntivo ou glia e componentes vasculares (HIATT & GARTNER, 1997).

O sistema nervoso pode ser dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNP recebe estímulos e os traduz para informações úteis, na forma de potenciais de ação, transmitindo estas informações para o SNC (HIATT & GARTNER, 1997). Devido a essa rápida transmissão através de finas fibras nervosas, o sistema nervoso é capaz de integrar funções motoras, sensitivas e cognitivas dos seres humanos e animais (TRAPP *et al.*, 2004).

Dentre os vários tipos celulares, as células de Schwann são as principais constituintes do SNP. Elas são confinadas ao SNP e em situações normais raramente são vistas no SNC. As células de Schwann migram da crista neural e assumem a função de mielinizar ou envolver os axônios do SNP (MIRSKY & JESSEN, 2001). São células extremamente labéis, que tem um papel crucial na formação dos nervos e auxiliam o SNC e o SNP nos processos regenerativos (MIRSKY & JESSEN, 2001).

De um ponto de vista prático, as patologias do SNP podem ser divididas em três grandes categorias: neuropatias do SNP, lesões traumáticas e neoplásicas (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Uma variedade de estruturas podem ser identificadas em tumores do SNP, estas incluem células perineurais, células de Schwann, axônios e neurônios (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). Histologicamente, o grau de participação de cada um desses tipos celulares na histogênese dos tumores de bainha é controverso, assim como sua nomenclatura e o diagnóstico nos animais domésticos (ARIZA *et al.*, 1988).

O diagnóstico freqüentemente depende da análise histológica do tumor e da detecção do componente celular que forma a neoplasia e sua relação com as estruturas normais do nervo (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). Com a aplicação de técnicas acuradas de diagnóstico, como por exemplo, a microscopia eletrônica e a imunistoquímica, houve um incremento significativo no diagnóstico dessas patologias, mas o resultado obtido

dessas técnicas, em especial a imunohistoquímica, ainda é controverso quanto a esses tumores (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Os objetivos desse estudo foram de atualizar o conhecimento sobre processos fisiológicos e neoplásicos que envolvem os nervos periféricos e fazer um levantamento dos tumores dessas estruturas nos animais domésticos entre 1964 e 2004 no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Para tal foram aplicadas técnicas histoquímicas: Tricrômico de Masson, Picrosírius red, azul de toluidina e AgNOR. A marcação imunohistoquímica, com o uso dos anticorpos anti-vimentina, anti-S100 e proteína ácida fibrilar glial (GFAP), também foi utilizada como ferramenta diagnóstica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histofisiologia dos Nervos Periféricos

Os nervos periféricos são uma linha de condução que leva informações sensoriais da pele, músculos e outros órgãos ao SNC e informações motoras do SNC para os músculos somáticos e órgãos efetores controlados pelo sistema nervoso autônomo. Eles são feixes de fibras nervosas (axônios), mielinizadas ou não, reunidas por tecido conjuntivo de maneira específica (RIET-CORREA, 2001). Na macroscopia, os nervos do SNP se apresentam como feixes ou fascículos brancos e brilhantes que são unidos por tecido conjuntivo. Microscopicamente, nas secções dos nervos periféricos, é possível observar a arquitetura intrincada desse tecido. Os axônios e células de Schwann estão localizados em compartimentos endoneurais, que são rodeados pelo perineuro; este por sua vez forma fascículos individuais que são envoltos por tecido fibroso epineural (Figura 1) (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

2.1.1 Epineuro

O epineuro consiste de uma pequena quantidade de tecido conjuntivo que tem a função de manter os fascículos neurais reunidos e funcionar como uma barreira semipermeável. Ele funde-se com o tecido adiposo que margeia os nervos periféricos, particularmente no tecido subcutâneo (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). Além de fibroblastos, o epineuro também apresenta mastócitos, colágeno e fibras elásticas. A quantidade de tecido epineural é variável, sendo mais abundante próximo às articulações (HAM & CORMACK, 1979). O epineuro possui vasos sanguíneos que irrigam os nervos maiores. Os ramos desses vasos penetram no perineuro, carregando inicialmente com eles uma bainha perineural, que depois têm o mesmo percurso no nervo (RIET-CORREA, 2001).

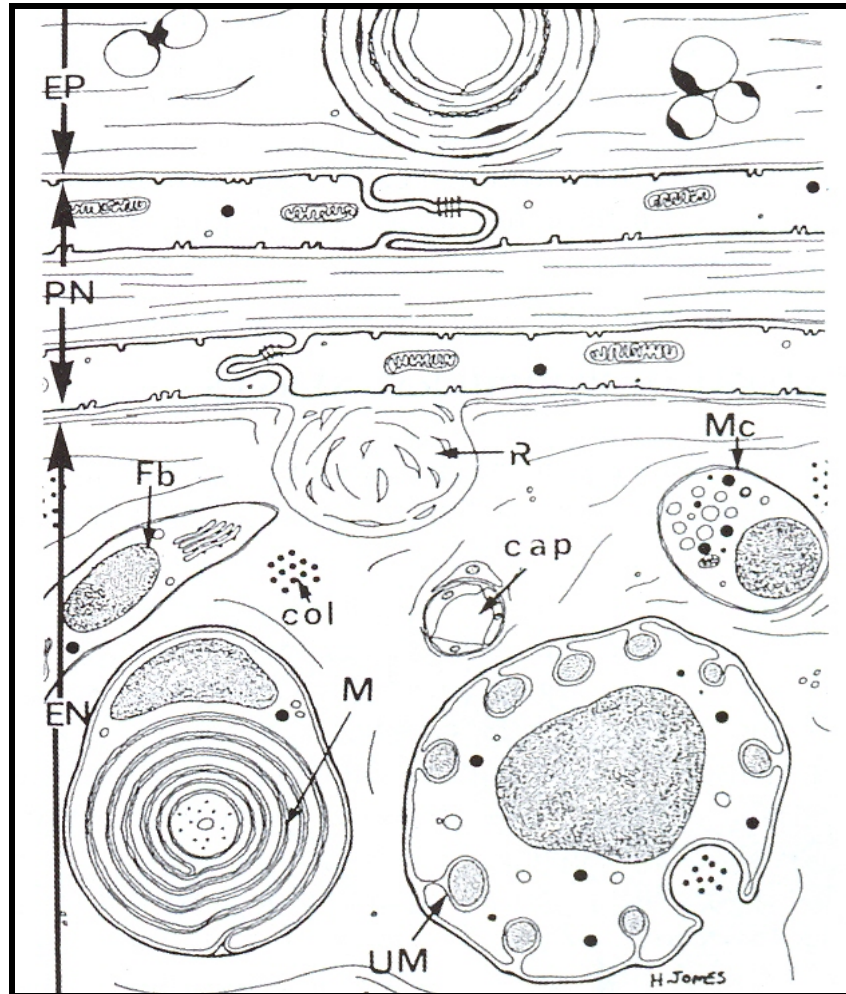


Figura 1 – Diagrama dos componentes do SNP. O epineuro (EP) contém colágeno, vasos sanguíneos e algum tecido adiposo. As células planas do perineuro (PN) são unidas por junções oclusivas formando camadas lamelares separadas por fibras de colágeno. Os corpos de Renaut (R) projetam-se para o endoneuro (EN). As células de Schwann formam lamelas de mielina (M) que circundam os axônios de maior diâmetro. Múltiplos axônios não mielinizados (UM) são invaginados através do citoplasma das células de Schwann. Outros elementos incluindo fibroblastos (Fb), mastócitos (Mc), capilares (cap) e colágeno (col) também são vistos. Fonte: Ortiz-Hidalgo & Weller, 1997.

2.1.2 Perineuro

O perineuro é formado por camadas concêntricas de células delgadas que são separadas por lâminas de colágeno. O número de camadas celulares varia de nervo para nervo e depende do tamanho do fascículo nervoso (Figura 2) (ORTIZ-HIDALGO & WELLER,

1997). As células perineurais eventualmente fundem-se com os axônios dos nervos sensitivos na sua porção terminal (HAM & CORMACK, 1979).

A superfície interna é revestida por várias camadas de células epiteliais unidas por junções oclusivas e envoltas por uma membrana basal que isola o ambiente neural. Essas células são contráteis e apresentam uma quantidade apreciável de microfilamentos característicos das células musculares lisas. Além disso, nos casos em que há duas ou mais camadas celulares, ocorre a presença de fibras de colágeno entre as camadas, mas os fibroblastos típicos estão ausentes (RIET-CORREA, 2001).

À semelhança do que é observado no SNC em relação à barreira hematoencefálica, existe a barreira sangue nervo, que impede a livre difusão dos componentes do plasma para o tecido nervoso periférico. As veias do endoneuro e do perineuro, em particular, são relativamente impermeáveis a muitas proteínas e íons, embora haja uma marcada variação entre as espécies. Tanto o perineuro quanto os capilares endoneurais previnem seletivamente a passagem de substâncias para o espaço extracelular que envolve as fibras nervosas no endoneuro, limitando a penetração de macromoléculas e controlando a passagem de íons para o espaço endoneural, que protege as fibras nervosas de vários agentes nocivos (CAVANAGH, 1990).

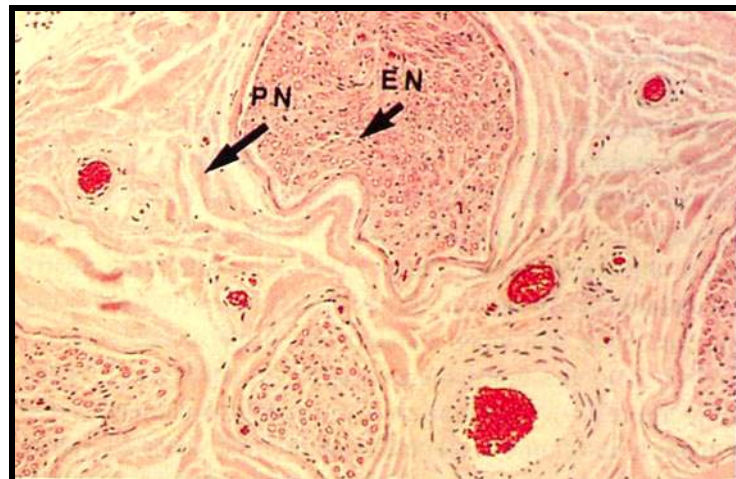


Figura 2 – O compartimento endoneural (EN) contém fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas e células de Schwann que é cercada pelo perineuro (PN). Fonte: Ortiz-Hidalgo & Weller, 1997.

2.1.3 Endoneuro

No endoneuro se localizam os axônios envoltos pelas células de Schwann além de fibras colágenas, fibroblastos, capilares e alguns mastócitos (Figura 2) (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). O espaço endoneural é interno ao perineural e contém uma matriz extracelular constituída de glicoproteínas produzidas pelas células endoneurais, pelos fibroblastos ou pelas células de Schwann. Essa matriz lubrifica as fibras nervosas para que elas deslizem durante o movimento do corpo, essa matriz ainda é responsável pela manutenção do ambiente iônico das fibras nervosas favorável à condução do impulso nervoso (RIET-CORREA, 2001).

2.2 Origem da linhagem das células de Schwann na crista neural

As células da crista neural migram do pólo dorsal da crista e se diferenciam em uma variedade de tipos celulares em diferentes localizações embrionárias. Esses tipos celulares incluem neurônios periféricos, células de Schwann, melanócitos, células endócrinas, músculos lisos, cartilagem e tecido ósseo (SHAN *et al.*, 1994).

Os mecanismos pelos quais essas células diversificam seus fenótipos têm sido o propósito de muitos estudos. Uma possibilidade é que a escolha dos fenótipos pelas células da crista neural é ditada por interações do ambiente, ou seja, as células se diferenciam ao longo da sua migração, de acordo com o meio ao qual são expostas, até o seu sítio final de localização. Uma segunda possibilidade é que a diversidade fenotípica seja inerente a cada célula da crista neural. Nesse caso a crista neural seria uma mistura heterogênea de células com o destino já predeterminado (FRASER & FRASER, 1991).

Análises das linhagens celulares do sistema nervoso central (SNC) e do sistema nervoso periférico (SNP) de vertebrados revelaram que muitos progenitores celulares neurais são multipotenciais, e algumas células da crista neural são pluripotenciais, ou seja, capazes de originar a maioria ou todas as linhagens celulares que derivam da crista neural, incluindo linhagens mesoectodérmicas e neurais (ANDERSON, 1993).

O desenvolvimento das células de Schwann a partir da crista neural, ainda é pobremente entendido, em termos das funções dos sinais epigenéticos, interações célula-célula, escolha na natureza e na condução de mudanças fenotípicas e da localização das células multipotentes que iram originar as células de Schwann (JESSEN *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da linhagem das células de Schwann pode ser dividido em três pontos críticos: transição das células da crista para precursores, precursores para células de Schwann imaturas e finalmente, a formação de dois tipos de células de Schwann maduras mielinizantes e não mielinizantes, vistas nos nervos adultos (Figura 3) (MIRSKY *et al.*, 2001).

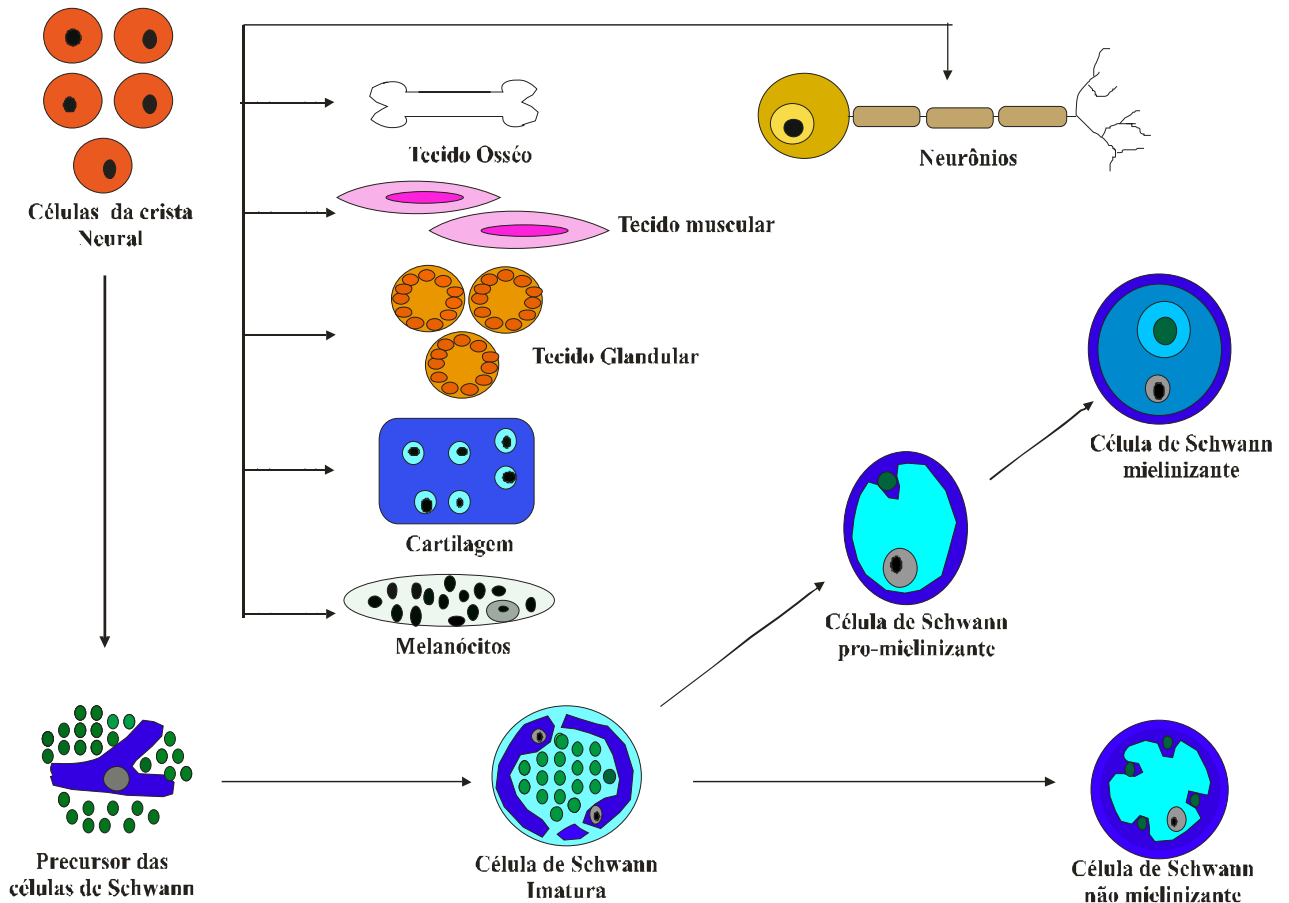


Figura 3 – Desenvolvimento das células de Schwann (CS) a partir das células da crista neural.

2.3 Moléculas que regulam a geração, proliferação e diferenciação das células de Schwann

Em ratos, três fatores de crescimento já foram identificados na diferenciação das células oriundas da crista neural originando linhagens distintas. O fator de crescimento glial (GGF), uma neuregulina que promove a diferenciação glial, o fator de crescimento transformador β (TGF- β) que promove a diferenciação da musculatura lisa, e as proteínas morfogenéticas do osso 2 e 4 (BMP2/4) que promovem a diferenciação dos neurônios autônomos e menos intensamente músculos lisos. Existem evidências de que o GGF também

O fator de transcrição de maior importância no desenvolvimento das células da crista é o fator de transcrição *Sox-10*. Em camundongos nocauteados para o *Sox-10*, os precursores e células de Schwann imaturas são ausentes e os melanócitos são reduzidos. Esses efeitos são atribuídos à diminuição de receptores para a β -neuregulina-, pois o *Sox-10* regula a expressão dos receptores ErbB3 e ErbB2 (SHARMA *et al.*, 1995). O *Sox-10* é membro de uma família multigênica que tem em comum um “motif” denominado SRY (“motif” do gene determinante do testículo - SRY box). O SYR é um grupo de proteínas associadas à cromatina. A proteína *Sox* tem uma ligação característica com o DNA através de uma seqüência palindrômica A/TA/TCAAA/T em uma hélice de DNA (TOPILKO & MEIJER, 2001).

O *Sox-10* é expresso na crista neural e nos seus derivados do SNP. No SNC o *Sox-10* é expresso pelos precursores dos oligodendrócitos durante seu desenvolvimento e maturação. No SNP o *Sox-10* está ativo nos gânglios sensorio-sensitivos e nas células de Schwann, sendo que nestas a expressão ocorre em todos os estágios de diferenciação só diminuindo após o nascimento (TOPILKO & MEIJER, 2001).

Em algumas células migrantes da crista neural de ratos e galinhas, foi detectada a expressão do gene para a proteína mielínica periférica (P_0) (MIRSKY *et al.*, 2001). O gene P_0 começa a ser detectado a partir das células de Schwann imaturas; apesar dos níveis serem baixos, eles vêm sendo usados como marcadoras para os precursores das células de Schwann. Isso porque marcadores para a proteína S100 e para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) não podem ser usados, pois essas proteínas são expressas tardiamente no desenvolvimento da linhagem celular. Em nervos de ratos adultos, a expressão do gene P_0 é restrita às células de Schwann mielinizantes. Agregados de células da crista, positivos para a proteína P_0 tendem a estar localizados próximos a axônios β 3-tubulina positiva, os quais são projetados além do tubo neural (Quadro 1) (MIRSKY *et al.*, 2001).

Células da crista migrantes	Precursos das células de Schwann
β -neuregulina -1, não promove sobrevivência.	β -neuregulina -1, promove sobrevivência.
P_0 negativa	P_0 positiva
Proteína mielínica periférica (PMP22) negativa	Proteína mielínica periférica (PMP22) positiva
PLP negativo	PLP positivo
GAP-43 negativo	GSP-43 positivo
CD ₉ negativo	CD ₉ positivo
B-FABP negativa	B-FABP positiva

Quadro 1 – Principais diferenças entre as células da crista migrantes e os precursores de células de Schwann em ratos e camundongos. Fonte: Mirsky & Jessen, 2001.

Os precursores das células de Schwann são tipicamente encontrados nos nervos de ratos no décimo quarto e décimo quinto dias de vida embrionária, e as células de Schwann imaturas estão presentes por volta do décimo sétimo dia (MIRSKY & JESSEN, 2001).

A geração de células de Schwann a partir dos seus precursores é realizada abruptamente, e as diferenças entre essas duas células estendem-se por um número de diversos e aparentemente não relatados fenótipos (Quadro 2). Uma das maiores e mais notáveis características dos precursores é a dependência marcada dos sinais de sobrevivência axonais. Um dos sinais axonais que regula a sobrevivência dos precursores celulares é a β -neuregulina-1 (MIRSKY & JESSEN, 2001).

O GGF há muito tempo é um dos suspeitos de participar ativamente no desenvolvimento e sobrevivência dos precursores das células de Schwann (JESSEN *et al.*, 1994). O GGF-II foi identificado recentemente como uma isoforma da β -neuregulina-1 (MIRSKY & JESSEN, 2001). Jessen & Mirsky (1994) estudaram como a geração de dois tipos celulares, neurônios e células de Schwann, são afetados pela adição de GGF-II. Sob condições basais, cerca de 90% dos clones sobreviviam em meio de cultivo por cerca de 16 dias, dentre estes se observavam neurônios e células de Schwann, mas somente 10% dessas células eram células de Schwann. Quando adicionado GGF-II, esse quadro era alterado drasticamente; somente 5% das células sobreviviam e 95% delas eram células de Schwann.

O GGF quando purificado, consiste de três proteínas distintas, GGF-I (34 Kd), GGF-II (59 Kd), e GGF-III (45 Kd), e todos podem estimular a diferenciação dos precursores das células de Schwann, para células de Schwann imaturas. Os GGFs são produtos oriundos de “splicing” alternativo de um único gene (JESSEN & MIRSKY, 1994). O RNA mensageiro (mRNA) do GGF-II pode ser detectado facilmente em embriões de ratos a partir do 13^o dia de gestação (SHAN *et al.*, 1994).

Um dos primeiros relatos da ação da β -neuregulina-1 relacionada à sobrevivência dos precursores das células de Schwann e das células de Schwann recém formadas, demonstrou que precursores não podem sobreviver por mecanismos autócrinos. A sobrevivência dessas células é agudamente dependente de sinais neuronais liberados pelos axônios, as β -neuregulinas-1. Durante o período embrionário a β -neuregulina-1 é expressa pelos gânglios da raiz dorsal (DRG) e pelos neurônios motores, e ela vai se acumulando ao longo dos tratos axonais em associação com o proteoglicano heparan sulfato (MIRSKY & JESSEN, 2001).

Além dos sinais de sobrevivência a β -neuregulina-1 estimula a migração das células de Schwann. Quando essa migração é reduzida, os precursores e as células de Schwann apresentam anormalidades, pois os nervos formados não irão possuir nenhuma célula de Schwann na sua superfície. A concentração de β -neuregulina-1 cai drasticamente com a transformação dos precursores em células de Schwann maduras (MIRSKY & JESSEN, 2001).

Os precursores das células de Schwann, presentes no décimo quarto dia, expressam receptores de baixa afinidade para a neurotropina p75, P₀, e proteína mielínica periférica (PMP) (JESSEN & MIRSKY, 1994).

Precursosores das células de Schwann	Células de Schwann imaturas
Morte por apoptose quando removidas dos axônios e plantadas <i>in vitro</i>	Sobrevivência das células sob as mesmas condições
S100 citoplasmático +	S100 citoplasmático -
Não se dividem em resposta ao FGF	Dividem-se em resposta ao FGF
Nivelam-se quando em contato cel-cel <i>in vitro</i>	Bi ou tri polar <i>in vitro</i>
Motilidade +++	Motilidade+
04 antígeno negativo	04 antígeno positivo
GFAP negativo	GFAP positivo

Quadro 2 – Principais diferenças entre os precursores das células de Schwann e células de Schwann imaturas do nervo ciático de ratos e camundongos. Fonte: Mirsky *et al.*, 2001.

Segundo Mirsky & Jessen (2001), uma maior concentração de cAMP e a presença de um grupo de fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico tipo 2 (FGF-2), o fator semelhante à insulina (IGFs) e fatores de transcrição, estimulam a escolha das células de Schwann imaturas em células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes.

Mudanças morfológicas e bioquímicas ocorrem em ambas as células, mas são mais acentuadas nas células mielinizantes, há uma grande expressão protéica nestas células com modificações na síntese de membrana para a produção das lamelas de mielina (MIRSKY *et al.*, 2001).

Os dois tipos de células de Schwann expressam diferentes tipos de moléculas. As células de Schwann não mielinizantes expressam altos níveis de moléculas de adesão celular neural (NCAM) e molécula de adesão 1 (L1), modestos níveis de receptores do fator de crescimento do nervo (NGFR/p75), uma proteína associada ao crescimento (GAP-43) e um conjunto distinto de proteínas do citoesqueleto incluindo a GFAP, mas não expressam

proteínas relacionadas com a mielinização. Ao contrário as células de Schwann mielinizantes expressam pouco ou nenhum NCAM, L1, NGFR/p75, GAP-43, e GFAP, mas, altos níveis de proteínas mielinizantes, incluindo proteína P₀, proteína básica mielinica (MBP), PMP de 22 kDA, conexina 32, glicoproteína associada à mielina (MAG) e periaxina (SCHERER & SALZER, 2001).

Essa marcada diferença entre as moléculas das células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes é o resultado da expressão de diferentes fatores de transcrição específicos de cada tipo celular (SCHERER & SALZER, 2001; MIRSKY *et al.*, 2001).

Os fatores de transcrição Krox-20 e Krox-24 são membros da família de genes *Egr* (fator responsável pelo crescimento inicial). O *Egr* possui um domínio de ligação altamente conservado composto de três “motifs Zinc finger”, juntos esses domínios reconhecem nove pares de base ricos em guanina (G) e citosina (C) no DNA. A expressão do Krox -20 e o Krox-24 somente é inibida com a expressão da proteína NAB1 e NAB2, os NABs atuam reprimindo uma série de “promoters” (TOPILKO & MEIJER, 2001).

Camundongos nocauteados para Krox-20 morrem antes do nascimento e demonstram defeitos na segmentação do encéfalo, formação do osso e formação e desenvolvimento das células de Schwann. Nocauteados para Krox-24 tem defeitos no crescimento e esterilidade em ambos os sexos devido a uma severa disfunção na hipófise (TOPILKO & MEIJER, 2001).

A análise da atividade dos Krox-20 e 24 em animais, revelou que esses fatores têm múltiplos locais de expressão incluindo precursores das células de Schwann e células de Schwann maduras. O Krox-24 é restrito aos precursores das células de Schwann e o Krox-20 às células de Schwann imaturas. Ambos os genes são ativados por volta do décimo dia de vida embrionária e são mantidos até o décimo quarto dia de gestação. A partir do décimo quinto dia, mudanças importantes ocorrem na expressão desses genes: Krox-20 é ativado ao longo de muitos nervos periféricos em sub-populações das células de Schwann imaturas, enquanto que o Krox-24 é sub-expresso. Essa observação sugere que a decisão de mielinização coincide com o período de conversão dos precursores das células de Schwann para células de Schwann imaturas (TOPILKO & MEIJER, 2001).

Animais Krox-20 nocauteados demonstraram severa perturbação no processo mielinizante. O Krox-20 em células de Schwann S100 positivas induz a mielinização através da produção de MAGs, e liberações expressivas de P₀, MBP, PMP22 e proteína mielinica dois (P₂). Análises da ativação do fator Krox-20 revelaram que é necessário um contato axonal contínuo para que essa expressão ocorra (TOPILKO & MEIJER, 2001).

Outro fator de transcrição, o Oct-6, é membro de um grupo de proteínas nucleares caracterizadas por alta conservação do domínio POU. O domínio POU constitui-se de um domínio ligado ao DNA com duas regiões conservadas separadas por uma pequena seqüência de ligação. O POU reconhece uma seqüência de nucleotídeos octâmeros ATTTGCAT (TOPILKO & MEIJER, 2001).

Altas concentrações intracelulares de cAMP levam a uma super expressão do gene Oct-6. Altas concentrações de cAMP também levam à super expressão de genes que codificam P₀ e o P₂. *In vivo*, a expressão do Oct-6 é observada inicialmente em precursores de células de Schwann e células de Schwann imaturas. A super regulação de Oct-6 precede a expressão do Krox-20; durante o desenvolvimento pós-natal o Oct-6 é expresso em altos níveis nas células pró-mielinizantes e mielinizantes, e em baixos níveis em células não mielinizantes (TOPILKO & MEIJER, 2001).

O Oct-6 estimula a expressão de genes que incluem o Krox-20, isso faz com que ocorra um direcionamento das células de Schwann de um estágio promielínico para um estágio mielínico. Em células mielinizantes o Oct-6 funciona como um repressor de seu próprio gen, e possivelmente de outros. Essa característica inibe uma super mielinização axonal, isso nos demonstra que o Oct-6 possui diferentes funções em diferentes estágios do desenvolvimento das células de Schwann: ativador em células promielinizantes e repressor em células mielinizantes. A expressão do Oct-6 gradualmente vai se extinguindo após a primeira semana de vida, essa baixa regulação é dependente da maturação do nervo, sugerindo a existência de um “feedback” negativo envolvendo o Oct-6 e a diferenciação terminal das células de Schwann (TOPILKO & MEIJER, 2001).

O Pax-3, semelhante ao domínio POU, possui uma proteína de ligação de dois “motifs” bipartidos, os quais se ligam com uma seqüência TAAT ou TGGA. Camundongos homozigotos para o alelo Pax-3 morrem *in utero* por volta do décimo quarto dia de gestação com defeitos severos no tubo neural, ausência da musculatura, defeitos no SNP e de pigmentação. Em particular os nervos periféricos não possuem células de Schwann ou possuem um número muito reduzido (TOPILKO & MEIJER, 2001).

O Pax-3 é expresso em dois momentos no desenvolvimento da linhagem das células de Schwann, o primeiro até o décimo quinto dia da vida embrionária e o segundo recomeça por volta do nascimento. Acredita-se que o Pax-3 funcione como um repressor dos genes mielinizantes, caracterizando as células de Schwann não mielinizantes (TOPILKO & MEIJER, 2001).

2.4 Funções das células de Schwann

2.4.1 Durante o desenvolvimento do sistema nervoso

Em roedores, nos primeiros dias de vida, as células de Schwann imaturas divergem em função: as mielinizantes envolvem os axônios de maior diâmetro e os mielinizam e as não mielinizantes acomodam-se superficialmente sobre os axônios de menor diâmetro formando uma membrana celular (MIRSKY *et al.*, 2001). Esse processo é guiado por sinalização dos axônios, apesar da natureza dessa comunicação ainda permanecer alusiva (JESSEN & MIRSKY, 1994).

A função e a arquitetura axonal têm uma forte correlação com a presença da mielina que é formada pelas células de Schwann mielinizantes. Em camundongos mutantes “Trembler” que sofrem de um defeito na PMP22, os axônios tem um diâmetro reduzido, incremento na densidade do neurofilamento e reduzida fosforilação do neurofilamento. A taxa de transporte axonal também é baixa, o que não ocorre em segmentos de axônios normais (MIRSKY & JESSEN, 2001).

O tecido perineural que cerca os nervos periféricos atua como uma barreira de proteção para o SNP. Evidências obtidas demonstraram que uma molécula secretada pelas células de Schwann, *Desert Hedgehog*, que é membro da família de moléculas sinalizantes *Hedgehog*, está envolvida na formação, não somente do perineuro, mas também no tecido conectivo endo e epineural (MIRSKY & JESSEN, 2001).

2.4.2 Mielinização do sistema nervoso periférico

O desenvolvimento dos nervos periféricos envolve um processo de interação simbiótica e dinâmica, entre axônios e células de Schwann (JESSEN & MIRSKY, 1994). As células de Schwann e seus precursores têm um papel crucial na geração dos nervos periféricos (MIRSKY & JESSEN, 2001). A interação começa com um sinal do axônio que age no recrutamento de populações celulares potencialmente mielinizantes, na sua diferenciação e proliferação e na iniciação da síntese e manutenção das moléculas específicas da mielina (GRAÇA, 1988).

Quando os precursores das células de Schwann entram em contato com os axônios, elas ativamente se dividem, e pavimentam células GAP-43 positivas e β 3-tubulina positivas. Esta subsequente diferenciação das células de Schwann em ratos ocorre em torno do décimo sexto ao décimo sétimo dia de vida embrionária, e esse período é marcado pela aquisição de morfologia bipolar e imunorreatividade à S100 (JESSEN & MIRSKY, 1994).

Nesse estágio, as células migrantes estendem processos, que penetram entre os axônios e segregam progressivamente pequenas quantidades de mielina. A proliferação das células de Schwann e segregação de mielina continuam no recém nascido, e cada segmento de axônio mielinizado é envolto por uma célula de Schwann mielinizante (JESSEN & MIRSKY, 1994).

O processo de mielinização se inicia quando uma projeção da célula-bainha envolve um axônio e forma uma espiral frouxa ao seu redor. Com o tempo, as camadas formadas se compactam pela expulsão do citoplasma e formam uma estrutura lamelar com bandas eletrodensas espessas - derivadas da aposição das faces citoplasmáticas das membranas - e menos eletrodensas - derivadas da aposição das faces externas das membranas. Ambas as bandas recebem a denominação de linha densa principal (LDP) e linha intraperiódica (LI), respectivamente (GRAÇA, 1988).

Após o nascimento, o ciclo de desenvolvimento das células de Schwann se prolonga por dois a quatro dias; no final do processo de mielinização, a mielina fornecida pelas células de Schwann torna o axônio maior em diâmetro em uma proporção de 1:1 (SYROID *et al.*, 1996).

O método pelo qual o número de células de Schwann é regulado para produzir uma relação axônio/células de Schwann mielinizantes de 1:1, ainda permanece inexplorado. Syroid (1996) deixa claro que existe uma clara inibição da proliferação das células de Schwann, iniciado principalmente no terceiro dia após o nascimento. Esse processo é marcado por uma série de transformações morfológicas intrínsecas à célula e relacionadas com a apoptose (SYROID *et al.*, 1996).

A morte programada da linhagem da célula de Schwann é iniciada por uma relativa deficiência na síntese de fator de crescimento e diferenciação (NRG) e do fator do crescimento neural (NGF), produzido por um decréscimo na quantidade de receptores ErbB2 e ErbB3 (SYROID *et al.*, 1996, MIRSKY *et al.*, 2001). Esse mecanismo apoptótico também ocorre em células de Schwann indevidamente posicionadas ou mal formadas (SYROID *et al.*, 1996).

Estudos em cultura de células têm demonstrado que quatro agentes, NGF, progesterona, fator 1 do crescimento Insulina-“like” (IGF-1) e NGF derivado do cérebro, podem sustentar ou aumentar a mielinização de pequenos axônios *in vitro*. Outros dados obtidos *in vitro* demonstraram que o fator neurotrópico derivado glial (GDNF) é outro agente capaz de sustentar a mielinização das fibras nervosas (HOKE *et al.*, 2003).

Outro evento no desenvolvimento neuronal que é regulado pelas células de Schwann é a formação dos nodos de Ranvier. Há uma forte correlação entre a presença de células de Schwann (não necessariamente em contato direto com o axônio), e a presença de agregados focais de canais de sódio (Na⁺) nas membranas axonais. Isto é visto em um grande número de situações: durante o desenvolvimento do nervo, durante o reparo seguido por destruição química da mielina e quando células de Schwann são acrescentadas a axônios *in vitro* (MIRSKY & JESSEN, 2001).

2.4.3 Reparação do sistema nervoso periférico

Os processos mielinizantes regenerativos do SNP são muito semelhantes aos observados na mielinização durante o desenvolvimento (HOKE *et al.*, 2003).

Invertebrados e vertebrados como anfíbios primitivos, podem regenerar axônios e refazer conexões precisas nos sistemas nervosos central e periférico. Em contraste, em mamíferos superiores, lesões no sistema nervoso podem levar à paralisia permanente. Entretanto, o SNP, pode recuperar muito das funções que foram perdidas após injúria (Figura 5) (FAWCETT *et al.*, 2001).

Quando um nervo periférico é cortado ou comprimido, os axônios do local da lesão são desconectados dos seus respectivos corpos celulares e começam a degenerar, processo conhecido como degeneração walleriana. O sinal que inicia a degeneração walleriana não é conhecido. Uma possibilidade é a diminuição do fator neuronal que mantém o fenótipo mielinizante das células de Schwann, como a β -neuregulina-1. Essa mudança fenotípica causa uma mutação genética que resulta na triplicação de um fator “tandem” que forma uma proteína quimérica de fusão da ubiquitina e degradação da proteína 2 (Ufd2). Essas proteínas, que não existiam previamente, desencadeiam o processo de degeneração walleriana (SCHERER & SALZER, 2001).

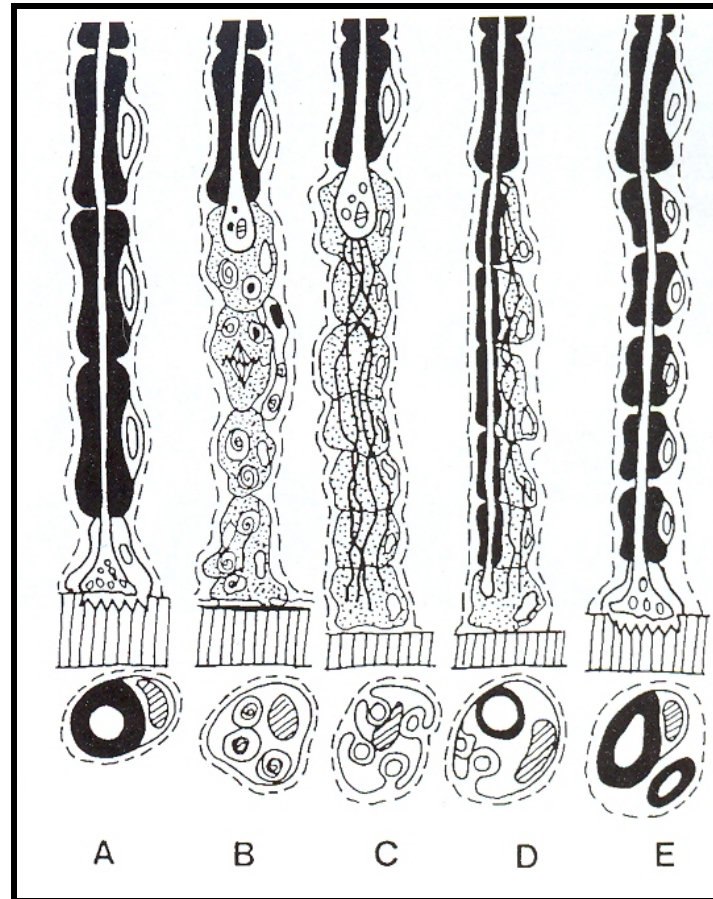


Figura 5 – Diagrama resumindo os eventos que ocorrem durante a degeneração e regeneração dos axônios. A. Nervos normais. B. Sete dias após a lesão axonal; observam-se células de Schwann, restos de axônios e debris de mielina. As células de Schwann estão em mitose para formar novas bandas de Büngner. C. Projeções axonais são emitidas a partir do final tumefeito do axônio proximal. D. O axônio começa a ser mielinizado. E. A conexão com o órgão é restabelecida, e os internódios regenerados são curtos. Fonte: Ortiz-Hidalgo & Weller, 1997.

A mielina que envolve os axônios também degenera, mas as células de Schwann não são afetadas, pois, elas são mantidas por fatores autócrinos de sobrevivência. Esses mecanismos autócrinos de sobrevivência são detectados a partir do décimo oitavo dia de vida embrionária. O sucesso desse processo reside em um “cocktail” de três fatores de crescimento IGF-2, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-2), e neurotropina (NT-3) que atuam sinergicamente para bloquear a morte da célula de Schwann. Há evidências de que o

fator inibidor da leucemia (LIF) e fatores como FGF-2, TGF- β e o fator do crescimento de hepatócitos também estejam implicados nesse processo das células de Schwann (MIRSKY & JESSEN, 2001).

Durante a primeira semana pós-injúria as porções distais dos axônios fragmentam-se e desaparecem. E as bainhas de mielina se separam formando estruturas ovóides. Após algumas semanas, essa mielina é fagocitada pelos macrófagos que migram da circulação sanguínea para o nervo lesionado. Muito do colesterol, que provem da porção fosfolipídica das bainhas de mielina originais, é reincorporado para formar novas lamelas de mielina. Os macrófagos e os fibroblastos endoneurais são os responsáveis por esse processo. Eles secretam lipoproteínas que contém o colesterol reciclado e ácidos graxos que são reincorporados às células de Schwann por receptores lipoprotéicos de baixa densidade (SCHERER & SALZER, 2001).

As células de Schwann são estimuladas a se dividir intensivamente entre 3 e 5 dias (SCHERER & SALZER, 2001). Elas próprias secretam vários fatores de crescimento incluindo neurotrofinas (NGF) e fator neurotrópico derivado do encéfalo (BDNF). Em resposta à transecção de um nervo, a expressão de mRNA do GDNF, aumenta drasticamente, o que nos leva a crer que o GDNF está fortemente implicado na regeneração dos nervos periféricos. O GDNF também tem sua expressão aumentada em modelos experimentais de neuropatias motoras em ratos, várias neuropatias humanas e em nervos humanos traumatizados (HOKE *et al.*, 2003).

Quando ocorre a perda do contato axonal, as células de Schwann mielinizantes expressam muitas proteínas de adesão nas suas membranas, características das células de Schwann não mielinizantes, como a NCAM, L1, NGFR/p75 e GAP-43, e diminuem drasticamente a síntese de proteínas mielínicas e glicolipídios. Essas mudanças na expressão protéica e glicolipídica são provavelmente adaptativas, para promover a adesão das células de Schwann à lâmina basal do axônio lesionado. Em tecidos não lesionados, axônio/célula de Schwann são unidos e envoltos por uma lâmina basal composta de moléculas como colágeno, laminina e fibronectina. Exceto quando destruída, essa lâmina permanece intacta no nervo degenerado. As novas células de Schwann que são formadas, vão aderindo à lâmina basal e formando um tubo, dentro do qual os brotamentos axonais são orientados. Essa união da lâmina basal mais as células de Schwann é chamada de banda de Büngner (SCHERER & SALZER, 2001).

Os genes mielinizantes são re-expressos quando ocorre a reinervação; nessa etapa há um decréscimo na expressão das moléculas de adesão e aumento na ativação de fatores de

transcrição pro-mielinizantes (Tst-1, Oct-6, SCIP) e mielinizantes (Krox-20) (SHERER & SALZER, 2001). O Krox-20 é super expresso em células expostas a fatores tróficos como a β -neuregulina-1, CNTF e FGF-2 (TOPILKO & MEIJER, 2001; SCHERER & SALZER, 2001).

Os eventos celulares que ocorrem no local da lesão vão depender da natureza da injúria. Quando a lesão danifica substancialmente a lamina basal, e as células de Schwann morrem, o tecido lesionado é substituído por tecido cicatricial. A combinação de injúria e reparo causa uma considerável proliferação de fibroblastos, perineurais e endoneurais. Os fibroblastos do SNP produzem grande quantidade de um proteoglicano inibidor NG2, que impede a regeneração axonal na área lesada. Se a regeneração ocorrer de uma forma inadequada, o tecido cicatricial pode se sobrepor e se tornar uma barreira para a regeneração, formando assim um tecido cicatricial, denominado neuroma (FAWCETT *et al.*, 2001).

Os axônios sofrem muitas mudanças estruturais e bioquímicas em resposta à agressão sofrida. A primeira ocorre no local da lesão, aproximadamente uma hora após a injúria, a linha de corte é lacrada, e há a formação de uma estrutura semelhante a um cone de crescimento. Esse cone tem como função evitar que íons axonais sejam transportados para o meio e que íons do meio sejam transportados para o corpo do axônio, além de promover uma maior acurácia na regeneração axonal. Maiores mudanças vão ocorrendo na expressão gênica e produção de proteínas. Com o decorrer do tempo, novas proteínas são transportadas através do corpo celular, como proteínas do citoesqueleto e a tubulina T α 1, que servem como base para o alongamento do axônio (FAWCETT *et al.*, 2001).

Diferentes fatores tróficos auxiliam no processo regenerativo do SNP. Os nervos degenerados são uma fonte importante de fatores tróficos assim como as células de Schwann mielinizantes ou não. Esses fatores são o conjunto de aproximadamente cinco famílias de moléculas e seus receptores que vão manter o crescimento e sobrevivência dos axônios e neurônios motores e sensitivos, após injúria tecidual (Figura 6) (LEVITAN & KACZMAREK, 2002).

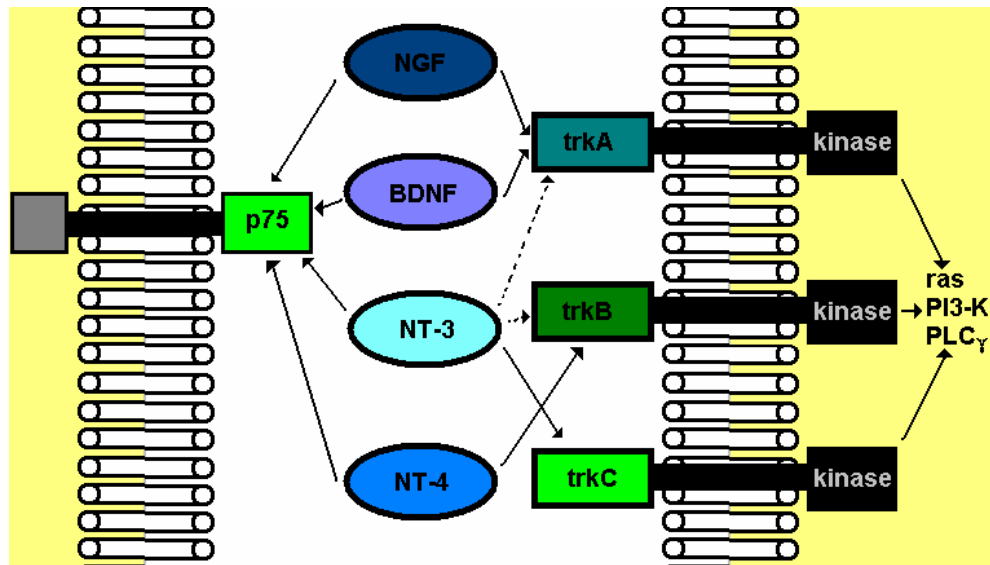


Figura 6 – Principais fatores tróficos que auxiliam no processo regenerativo do sistema nervoso periférico, receptores e mecanismo de ação mais importante. BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo), NT (neurotropina), NGF (fator do crescimento do nervo), trk (receptor de alta afinidade).

Em mamíferos, a família das neurotrofinas tem quatro membros: NGF, BDNF, NT-3 e NT-4. Essas neurotrofinas têm origem tecidual distinta, como neurônios específicos, células de glia e tecidos periféricos como, por exemplo, os músculos, mas todos têm ação semelhante promovendo o crescimento dos nervos e sobrevivência dos neurônios autônomos sensitivos e motores (Quadro 3) (LEVITAN & KACZMAREK, 2002). Muitos neurônios respondem a mais de uma neurotrofina; cada neurotrofina se liga ao neurônio respectivo através de um receptor de alta afinidade, TrkA, TrkB e TrkC e não seletivamente a um receptor de baixa afinidade, o p75. Os receptores Trk dimerizam e são autofosforilados via domínio quinase intracelular, que ativa vários sinais intracelulares que incluem o *ras*, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) e a fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ) (SCHERER & SALZER, 2001).

Dentre as neurotrofinas, a mais conhecida é o NGF, que tem como receptor o TrkA. Interrupções no transporte retrogrado dessa neurotrofina resultam em profundas mudanças nos neurônios que incluem o decréscimo na expressão do mRNA do receptor p75, e nas subunidades dos neurofilamentos assim como certos peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os níveis de NGF aumentam em nervos submetidos à injúria; esse incremento está relacionado à presença de interleucinas, principalmente a interleucina 1 (IL-1) liberada pelos macrófagos que migraram para o local da

lesão. Testes de hibridização *in situ* demonstraram altas concentrações de mRNA do NGF em fibroblastos, sendo que as células de Schwann também aparecem como uma fonte potencial de NGF (SCHERER & SALZER, 2001).

Os neurônios motores expressam os receptores TrkB e TrkC, portanto somente as neurotrofinas BDNF, NT-3 e NT-4 suportam a sobrevivência dos neurônios motores em cultura, após injúria neonatal, e em modelos animais de doenças em neurônios motores. Em lesões de neurônios motores adultos, a administração exógena de BDNF ou NT-4 diminuiu a perda de colil-acetiltransferase. O uso de NT-3 ou NT-4 impede que ocorra uma diminuição na velocidade de condução do impulso no nervo motor e mantém o potencial excitatório pós-sináptico (SCHERER & SALZER, 2001). O NT-3 exógeno aumenta o poder regenerativo de axônios motores e a reinervação dos músculos esqueléticos (ANDERSON, 1997).

As células de Schwann desnervadas expressam altos níveis de receptores p75, isso ocorre somente quando há perda do contato com os axônios. Quando a regeneração começa, a expressão de receptores p75 cai drasticamente. Outros receptores como o TrkB e o TrkC também podem ser encontrados. Ainda não é conhecida a função exata desses receptores, e qual é o seu mecanismo de ação junto às células de Schwann (FAWCETT *et al.*, 2001).

Propriedade	Ação
Sobrevivência neuronal	Prevenção da morte dos neurônios
Crescimento do nervo	Estimulação da alongação de axônios e dendritos
Brotamento do nervo	Estimulação da brotação de axônios e dendritos nos nervos adultos
Ações anabólicas	Incremento no tamanho neuronal
Diferenciação	Indução da síntese de proteínas necessárias para o fenótipo neuronal
Modulação da transmissão	Aumento da síntese de neurotransmissores, neuropeptídeos e suas enzimas sintetizantes
Propriedades eletrolíticas	Alteração da atividade e níveis dos canais iônicos

Quadro 3 - Ações das neurotrofinas na regeneração do sistema nervoso. Fonte: Levitan & Kaczmarek, 2001.

Outros fatores tróficos importantes no processo regenerativo são os fatores de crescimento transformadores β (TGF- β). Essa família compreende três isoformas: o TGF- β 1, - β 2 e - β 3, em adição, esse grupo contém uma enorme gama de proteínas homólogas pertencentes às “activinas”, a proteína morfogenética do osso e o GDNF. Essas proteínas

requerem a ativação de proteases extracelulares e, em muitos tecidos, executam uma função crucial na regulação do crescimento celular e diferenciação durante o desenvolvimento após a injúria. Os receptores da família TGF- β são os receptores tipo I, tipo II e tipo III (β - glicano), o sinal gerado pelos receptores ativa um conjunto de moléculas de sinalização conhecida como SMADs. Os receptores da família GDNF, entretanto não são relatados, mas acredita-se que tenham receptores em comum com a proteína tirosina quinase, c-ret (SCHERER & SALZER, 2001).

As células de Schwann sintetizam todas as três isoformas de TGF- β s, e essa expressão é regulada por interações axonais. As células de Schwann possuem os receptores tipo I, II, III e o efeito das TGF- β 1, - β 2, - β 3 parece ser o mesmo. O TGF- β 1 é um fator mitogênico para células de Schwann *in vitro*, o TGF- β 1 aumenta a expressão de NCAM, L1, colágeno tipo IV e do fator inibidor do plasminogênio, e diminui o fator ativador do plasminogênio o que promove uma acumulação da matriz extracelular. Esses achados sugerem que a expressão dos TGF- β s na parte distal do nervo lesionado pode aumentar a regeneração axonal devido à transformação das células de Schwann para um fenótipo não mielinizante, como também promover um infiltrado de macrófagos (SCHERER & SALZER, 2001).

Os GDNF são os mais novos fatores tróficos descritos e possuem uma importante função nos neurônios do SNP e do SNC. Cada um dos fatores GDNF possui um receptor preferencial chamado fator liberador da somatotrofina (GRF α) (GRF α 1, GRF α 2 e c-ret), mas pode haver ligações cruzadas. As GDNF são essenciais para a formação de muitos neurônios motores e sensitivos no período pré-natal e durante o processo de regeneração (SCHERER & SALZER, 2001).

O fator de crescimento ciliar (CNTF), fator inibidor da leucemia (LIF) e a IL-6, também são enquadrados como fatores tróficos, seus receptores são os mesmos das citocinas, como por exemplo, a proteína intrínseca de membrana gp130. Um dos responsáveis pela produção *in vivo* do CTNF e do LIF são as células Schwann. A atuação desse grupo de fatores leva à ativação de um grupo de proteínas citoplasmáticas denominadas STAT, que impulsiona a liberação de fatores de transcrição somente ativados durante o processo regenerativo. A diminuição no número de neurônios do SNP em camundongos nocauteados para os receptores acima, demonstra que essa família de fatores de crescimento atua também durante o desenvolvimento fetal do SNP (FAWCETT *et al.*, 2001).

O IGFs-1 e 2 são expressos por vários tecidos. Como já visto anteriormente, IGFs estão presentes em vários estágios do desenvolvimento do SNP exercendo uma grande

variedade de funções. As IGFs são transportadas por fluxo axonal retrógrado e também promovem a regeneração dos axônios sensitivos e motores. A IGF-1 e o CNTF são fundamentais na sobrevivência dos axônios lesados (STERNE *et al.*, 1997).

Existe ainda uma grande família de fatores de crescimento, os FGFs, que interagem com até quatro receptores diferentes. O FGF tem ação ampla sobre muitos tipos celulares; nas células de Schwann é considerado um fator pró-mitótico e de sobrevivência. As concentrações de FGF-2 aumentam muito após lesão axonal, acredita-se que sua origem esteja relacionada às células de Schwann, mas sua função específica junto ao processo regenerativo não é conhecida (SCHERER & SALZER, 2001).

Quanto ao papel regenerativo das β -neuregulinas -1, existem duas hipóteses de ação. A primeira seria que as β -neuregulinas-1 promoveriam a sobrevivência e a proliferação das células de Schwann no local da lesão. Outra possibilidade é que as β -neuregulina-1 reforçariam o poder regenerativo do nervo lesado por promoverem uma migração das células de Schwann para o local primário de lesão, e também por incrementar a expressão de neurotrofinas relacionadas à regeneração axonal (SCHERER & SALZER, 2001).

Outra proteína em particular que tem gerado muitos estudos é a proteína associada ao crescimento GAP-43. Essa proteína está localizada no interior dos cones de crescimento e somente é expressa em axônios que tem capacidade de regeneração. O GAP-43 interage com várias quinases, e provavelmente executa uma importante função na comunicação entre o cone de crescimento e os fatores tróficos do meio (STERNE *et al.*, 1997).

Em adição, eventos tróficos ao redor dos corpos celulares nos gânglios periféricos também são importantes. A inflamação circunjacente aos neurônios sensitivos, causa um aumento na liberação de citocinas, principalmente a citocina II que é liberada pelos macrófagos, que também estimula o processo regenerativo (Quadro 4) (FAWCETT *et al.*, 2001).

Corpo celular	Super regulação de c-jun, Gap-43, T α 1-tubulina, actina, CGRP (nos neurônios motores), GGF.
	Baixa regulação de neurofilamentos, LNGFR (axônios sensitivos).
	Em alguns casos apoptose.
Axônio	Ativação de um programa de auto-destruição normalmente mediado por fatores derivados do corpo celular resultando em degeneração walleriana.
	Liberação de FGFs
Células de Schwann	Super regulação de NCAM, L1, IGFs, NGF, BDNF, LIF, Proteases (MMPS), lipases.
	Baixa regulação de proteínas associadas à mielina, CNTF.
Fibroblastos e macrófagos	Super regulação de NGF, IL-1, IL-6, TGF α e β , proteases, lipases.

Quadro 4 – Principais eventos bioquímicos após lesão aos axônios periféricos. Fonte: modificado de Brown, 2001.

Não somente os axônios regeneram no SNP. Funções relacionadas com as conexões motoras dos músculos, e conexões funcionais sensitivas com a pele também são restabelecidas (SCHERER & SALZER, 2001).

Somente após a regeneração completa do axônio é que é restabelecida a inervação. Os axônios motores regenerados reconectam-se com os músculos, e axônios sensitivos reconectam-se com estruturas sensoriais. No caso dos axônios motores a reconexão com o músculo ocorre exatamente no antigo local de ligação. Isso indica que há alguma marcação molecular que o axônio regenerado reconhece (FAWCETT *et al.*, 2001).

Uma molécula candidata a essa função é a *agrina*, encontrada no local da sinapse e secretada pelo neurônio motor e músculos. Essa molécula inibe o crescimento do axônio motor em cultivo celular, e tem uma íntima relação com a acetilcolina (AChE). Outra molécula de relevância é a S-laminina, somente encontrada nas junções sinápticas, *in vitro*, ela também inibe o crescimento do axônio motor (SCHERER & SALZER, 2001).

O processo de reinervação sensorial é menos claro. Alguns órgãos sensitivos como o corpúsculo de Pacini, degeneram após a desnervação, e regeneram e reinervam rapidamente. Entretanto, a maioria das sinapses na pele não estão associadas a órgãos sensitivos, estão

simplesmente ramificadas na pele; a reinervação, portanto, ocorre em locais diferentes dos existentes anteriormente (FAWCETT *et al.*, 2001).

A lâmina basal que circunda os axônios tem uma importante aplicação funcional no que se refere a uma perfeita reconexão axonal. Ela funciona como um túnel conduzindo o axônio, impedindo assim que o axônio degenerado perca o contato entre as duas extremidades separadas. Em casos em que a lâmina basal é destruída, as bandas de Büngner são formadas, mas a sua união com o outro fragmento do nervo ocorre ao acaso. Uma vez que ocorra a ligação errada entre duas bandas de Büngner, elas não são capazes de corrigir o engano formando assim uma conexão errônea (Figura 7) (FAWCETT *et al.*, 2001).

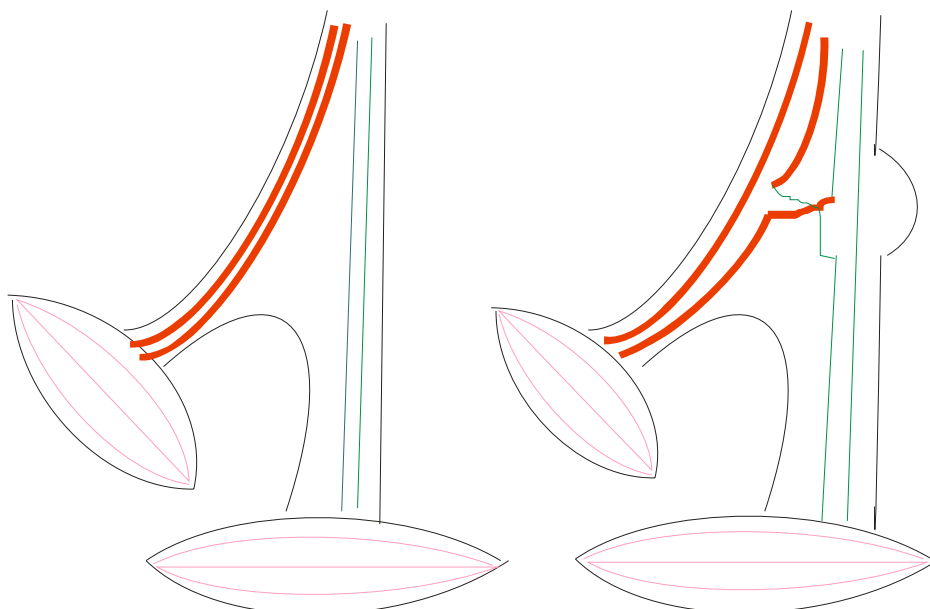


Figura 7 – Mecanismo pelo qual os axônios são guiados erroneamente na regeneração. Durante o reparo os axônios podem crescer dentro da banda de Büngner do nervo colateral, o que promove a conexão errada.

2.4.4 Remielinização do sistema nervoso central (SNC)

No SNC os oligodendrócitos colocam várias voltas da sua membrana citoplasmática ao redor de um ou mais axônios formando uma estrutura espiralada de lamelas de mielina que origina pequenos tubos denominados internódos. No SNP as bainhas de mielina são formadas pelas células de Schwann. Cada célula de Schwann forma um internodo em um único axônio de aproximadamente 1 mm de comprimento composto por mais de trezentas lamelas concêntricas. Os oligodendrócitos formam segmentos similares, mas

estendem processos mielinizantes para muitos axônios, em alguns casos mais de duzentos (PEIREIRA *et al.*, 1996).

As células de Schwann têm como característica serem confinadas ao SNP. Em situações normais elas nunca são encontradas no sistema nervoso central. Entretanto, após lesões em humanos e animais as células de Schwann podem invadir o SNC (LI *et al.*, 1999). Está claro que essa invasão do SNC por células de Schwann está relacionada com a perda dos astrócitos, que causa uma abertura na membrana limitante glial (GLM) promovendo uma entrada livre das células de Schwann através do parênquima do SNC (GRAÇA *et al.*, 2001).

Os axônios desprovidos de suas bainhas são remielinizados por oligodendrócitos e/ou células de Schwann, dependendo do grau de destruição dos astrócitos e da espécie animal (GRAÇA, 1989a). Isso porque os oligodendrócitos e seus processos não migram através de áreas que não contêm astrócitos, ou seja, os processos astrocíticos são requeridos pelos oligodendrócitos para a formação das bainhas de mielina (PEREIRA *et al.*, 1998).

Os fatores que permitem ou impedem a remielinização por oligodendrócitos têm sido discutidos. É fundamental que haja disponibilidade dessas células na lesão, e como possíveis fontes têm-se os oligodendrócitos remanescentes e os oriundos da proliferação de uma linhagem de células precursoras de oligodendrócitos e de astrócitos do tipo 2, que são conhecidos como O/2A (OPCs) (adultas) e que permanecem em estado quiescente no SNC (LI *et al.*, 1999). Outros fatores que impedem a remielinização por oligodendrócitos são: a existência de diferenças entre as espécies quanto à capacidade proliferativa dos oligodendrócitos, a diminuição absoluta do número de oligodendrócitos devido à desmielinização crônica com estímulos persistentes; presença de anticorpos inibidores de mielina, anormalidades axonais que impossibilitem a remielinização, e a persistência de membranas derivadas da mielina (MDM) no espaço extracelular, em função da baixa atividade macrófágica no local, o que parece retardar ou impedir o processo de remielinização. A presença de cicatriz glial, e o tamanho das lesões parecem não interferir no processo de remielinização (FERNANDES *et al.*, 1997). Mais ainda, a protuberância da cicatriz glial parece ser um fator dependente do processo de desmielinização persistente mais do que sua causa (SALLIS, 2005).

Dois sinais possíveis para a penetração das células de Schwann podem ser: a presença de mielina degenerada, e a exposição de membranas axonais não mielinizadas. *In vitro*, macrófagos contendo mielina são um grande estímulo mitogênico para as células de Schwann. Acredita-se que esses macrófagos aumentam a secreção de citocinas que liberam fatores de crescimento e também fatores de membrana axonal. Em adição, os axônios regulam

o fenótipo das células de Schwann por moléculas difusas, e neuregulinas axonais solúveis que induzem a migração e proliferação das células de Schwann (LI *et al.*, 1999).

O evento primário na área reativa perilesional é a morte de oligodendrócitos com fagocitose da mielina, resultando em desmielinização do axônio. Esses processos estimulam as células da microglia que entram em ação eliminando os detritos celulares (LI *et al.*, 1999). O tamanho e gravidade da lesão induzem uma maior ou menor atividade macrofágica. Se a invasão dos macrófagos é escassa, há um maior acúmulo de MDM ao redor dos axônios, nesse caso as células de Schwann não encontram matriz estável para poder remielinizar os axônios desmielinizados, as interações entre axônios e as células de Schwann são incompletas e a membrana basal não se forma totalmente ao redor da célula (GRAÇA, 1989b).

Após a completa retirada da mielina pelos macrófagos, as células de Schwann migram entre os axônios e usam umas as outras como passadeira. Para tanto fabricam fibras colágenas de pequeno diâmetro, que são observadas entre duas células de Schwann contíguas. Esse fato confirma a necessidade de colágeno, o terceiro elemento do SNP para a mielinização (axônio – célula de Schwann - colágeno) (BUNGE *et al.*, 1978; GRAÇA, 1989b)

As células de Schwann interagem com os axônios de várias maneiras, de acordo com a localização destes dentro da lesão e com a presença ou ausência de componentes da matriz no espaço extracelular. Assim, as áreas próximas às superfícies piaais e aos vasos do centro da lesão são remielinizadas antes, em ambientes nos quais são vistas fibras colágenas e substância floculada extracelular. Uma célula de Schwann se associa ora com um único axônio de grande diâmetro, ora com mais de um axônio de tamanhos variados (BONDAN *et al.*, 1999).

Os internódos reconstituídos são reconhecidos principalmente pela espessura da bainha de mielina, que é mais fina que o normal para o diâmetro do axônio. A distinção entre um internódo reconstruído por um oligodendrócito ou por uma célula de Schwann se faz pela periodicidade das lamelas de mielina – que é maior no SNP - e pela membrana basal das células de Schwann (GRAÇA, 1988).

2.5 As células de Schwann e o modelo do Brometo de etídio (BE)

Áreas de desmielinização podem ser induzidas no SNC de animais por injeção de pequenos volumes de drogas gliotóxicas na substância branca. O corante intercalante brometo de etídio (BE), extensamente usado como tripanocida nos países africanos é atualmente utilizado num modelo experimental, devido à sua potente ação gliotóxica, para estudo da

patofisiologia da desmielinização e remielinização tóxica do SNC em mamíferos (PEREIRA *et al.*, 1998).

Até onde se sabe, o BE afeta inicialmente o DNA mitocondrial, o que resulta numa privação de energia e metabólitos nas células da substância branca (GRAÇA *et al.*, 1997). O tecido nervoso adquire um aspecto conhecido com *status spongiosus*, que é caracterizado por degeneração das células gliais, separação das lamelas de mielina devido à formação de vesículas, e aumento do espaço extracelular, mas com preservação das estruturas vasculares (FERNANDES *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 1998). As bainhas de mielina podem sofrer alterações antes de serem fagocitadas, tais como vesiculação e formação de *favos*, micropinocitose vermiforme e desnudamento, associado a profusa infiltração macrofágica (GRAÇA, 1988).

A remielinização de axônios do SNC por células de Schwann foi relatada após desmielinização induzida por lisolecitina em ratos e em gatos. O mesmo ocorre no SNC do rato após desmielinização induzida por 6-aminonicotinamida (BLAKEMORE *et al.*, 1983). No modelo desmielinizante do BE os axônios desmielinizados são posteriormente remielinizados por células de Schwann quando se localizam sob a pia e no centro da lesão – áreas que não contêm astrócitos – e por oligodendrócitos na periferia das lesões – áreas que contêm astrócitos (GRAÇA, 1989b).

A origem das células de Schwann e o mecanismo da sua migração ainda não estão claros. Em estudos na medula espinhal, o processo de reparo é predominantemente carregado por células de Schwann e em menor proporção por oligodendrócitos. Em contraste, quando o BE é injetado no encéfalo de ratos o reparo da lesão ocorre predominantemente por oligodendrócitos que têm distribuição aleatória (PEREIRA *et al.*, 1998).

O tempo, o tipo e a extensão da remielinização são influenciados pelos eventos locais ocorridos após a injeção do tóxico. Após injeções intramedulares de BE em ratos Wistar, as alterações degenerativas evoluíram até o sétimo dia após a aplicação (GRAÇA, 1989b).

O fato mais notável nas lesões induzidas pelo BE na medula espinhal dos ratos foi a variação na natureza do processo de degradação das bainhas de mielina e a diferença na velocidade em que as lesões se reparam. A desmielinização primária é normalmente caracterizada pela ativação macrofágica e o rápido processamento das bainhas de mielina. Nessas circunstâncias, a remielinização por oligodendrócitos e células de Schwann é rápida tão logo o estímulo desmielinizante seja removido. O acúmulo de mielina vesiculada em lesões lentas ocorre em áreas com poucos macrófagos ativados, indicando que ela forma e

persiste quando a degradação tem lugar na ausência ou sem a adequada indução de resposta macrofágica normal após a morte dos oligodendrócitos (GRAÇA, 1989a).

As lesões induzidas por dose alta podem ser rápidas, não só por ocorrer pronta desmielinização, mas por haver estimulação não específica para a entrada de macrófagos na área. Na ausência de tal estímulo a entrada de macrófagos é retardada, ocorrendo o acúmulo de mielina vesiculada, o qual protai a reparação do tecido (GRAÇA, 1989a).

Quanto ao SNP, injeções de BE induzem desmielinização segmentar seguida por remielinização por células de Schwann, semelhantemente ao observado no SNC. Em contraste com o SNC, não há destruição das células mielinizantes, mas a intoxicação das células de Schwann, que logo após a administração do BE, apresentam vacuolização do citoplasma e rejeição das bainhas de mielina. Os debris mielínicos são detectados como densos grânulos citoplasmáticos que são fagocitados. Os axônios permanecem intactos, exceto alguns ao longo do trato da agulha, que sofrem degeneração walleriana. A atividade intensa dos macrófagos e a ativação de estruturas celulares como os fibroblastos aumenta a produção de fibras colágenas caracteristicamente observadas após múltiplas aplicações. Os macrófagos ativados secretam moléculas como a interleucina 1 e NGF o qual estimula os fibroblastos a produzir e secretar fibras colágenas apesar das células de Schwann também serem capazes de produzir colágeno neste modelo (RIET-CORREA *et al.*, 2002).

2.6 Neoplasias dos Nervos Periféricos

Os tumores dos NP pertencem a um grupo heterogêneo de neoplasias que se originam tanto de células de Schwann como de fibroblastos e células perineurais. Os tumores dos nervos periféricos (TSNP) são classificados, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), como schwannomas, neurofibromas, perineuromas e tumores malignos do SNP, dependendo da sua origem celular (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Baseado nas condutas biológica e morfológica, os TSNP são divididos em benignos (TBSNP) e malignos (TMBNP). Em caninos os TBSNP são designados como neurofibromas e schwannomas, e os TMBNP incluem os neurofibrossarcomas e schwannomas malignos, mas, nas outras espécies animais essas designações freqüentemente não são claras (BROWER *et al.*, 2005).

Em humanos e animais domésticos, os TSNP têm uma grande variedade histológica e diferenciações heterogêneas já foram descritas incluindo TSNP epitelióides e TSNP com diferenciação divergente rabiomioblástica (tumor de Triton maligno),

cartilaginosa, óssea, melanocítica, angiomatosa e glandular. Entretanto, morfologias atípicas dos tumores como glóbulos eosinofílicos intracitoplasmáticos também podem ocorrer tanto em tumores benignos como em malignos. Em adição, muitos TBSNP apresentam alterações atípicas ou padrão epitelíóide o que dificulta a distinção entre tumores benignos e malignos (CHIJIWA *et al.*, 2004).

Várias hipóteses já foram propostas para a origem dessa grande variedade de diferenciações, desde a proliferação de duas linhagens celulares distintas até a produção de substâncias ectópicas pelas células de Schwann neoplásicas. Essas teorias são asseguradas pela origem embrionária comum das demais células com as células de Schwann: a crista neural (PATNAIK *et al.*, 1984).

2.6.1 Schwannoma

Os schwannomas são neoplasias comuns dos nervos periféricos e representam aproximadamente 8% das neoplasias intracraniais e 29% dos tumores primários da medula espinhal (WOODRUFF *et al.*, 2000). Em cães, gatos e bovinos, os tumores benignos presumivelmente originários das células de Schwann são chamados de schwannomas (KOESTNER & HIGGINS, 2002). Os schwannomas afetam mais freqüentemente os nervos espinhais, cranianos e plexos. Já foram descritos em muitas espécies animais como caninos, felinos, eqüinos, bovinos, roedores e caprinos (PUMAROLA *et al.*, 1996, KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Nos seres humanos, os schwannomas, também chamados de neurilemomas, são as neoplasias mais comuns dos nervos espinhais, craniais e nervos periféricos. Os schwannomas caninos são geralmente considerados benignos, apesar de alguns relatos descreverem uma alta incidência da forma maligna. Schwannomas malignos estão particularmente associados à doença de Von Recklinghausen (PUMAROLA *et al.*, 1996).

Em cães, os schwannomas tendem a ocorrer em animais idosos por volta dos 8 anos e não há predisposição sexual. Esses tumores são encontrados mais comumente unilaterais aos nervos da medula, e com grande freqüência nos nervos que envolvem a formação do plexo braquial, menos freqüentemente no plexo lombossacro e menos freqüentemente ainda no tecido subcutâneo envolvendo os nervos periféricos distais. Os TSNP localizados no plexo braquial comumente causam metástases pulmonares. Quanto aos nervos cranianos, o nervo trigêmio é o mais envolvido (KOESTNER & HIGGINS, 2002). Nesse caso o animal afetado pode apresentar depressão e desorientação, marcada ataxia,

inclinação da cabeça, déficits de postura em todos os quatro membros, atrofia acentuada do músculo masseter com ausência de movimentos e sensibilidade e algumas vezes estrabismo, sendo que todos os sintomas são mais acentuados no lado onde se localiza o tumor. A massa normalmente comprime estruturas como a ponte, medula oblonga e nervos craniais adjacentes (PUMAROLA *et al.*, 1996).

Em bovinos velhos, schwannomas multicêntricos são muito comuns, mas não causam deficiências neurológicas. Esses tumores têm predileção pelo sistema nervoso autônomo, incluindo o plexo epicárdico, gânglios simpáticos torácicos e cervicais, plexo nervoso mediastinal, língua, nervos intercostais e plexo braquial. Quando há envolvimento intracraniano, normalmente, os nervos vestibulo-cocleares estão envolvidos (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Difusão centrípeta através dos plexos braquiais ou lombares pode resultar em compressão medular intra ou extradural. Nesses casos de invasão medular ou quando há metástases pulmonares, sugere-se maior agressividade do tumor. Em schwannomas do plexo braquial e lombossacral, freqüentemente há uma fusão e maior envolvimento dos nervos individuais do tronco, o que promove uma sintomatologia multicêntrica dificultando o diagnóstico (PUMAROLA *et al.*, 1996, KOESTNER & HIGGINS, 2002).

A maioria dos schwannomas são massas globóides que variam de alguns centímetros a 10 cm de diâmetro (WOODRUFF *et al.*, 2000). Em cães, a macroscopia dos schwannomas se caracteriza por massas nodulares distintas ou como uma massa fusiforme ou varicosa engrossando os nervos espinhais ou craniais. Os tumores podem ser muito firmes ou moles e gelatinosos, brancos a cinza e brilhantes com a superfície lisa. Muitos se difundem nos nervos e são confinados por uma cápsula de tecido conjuntivo proveniente do epineuro (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Os schwannomas consistem de um denso agregado uniforme de células com uma forma ovóide ou fusiforme alongada, bordas citoplasmáticas bem definidas e embebidas em uma matriz densa e variável de colágeno. Os tumores são compostos por um denso padrão celular entrelaçado contínuo ou concêntrico. Em humanos, essa forma de schwannoma é designada de padrão Antoni tipo A. Em cães, os padrões de paliçada ou de espinha de peixe com orientação nuclear são incomuns. Os corpos de Verocay, formados por numerosos processos celulares tumorais e núcleos arranjados em paliçadas irregulares intercalados com abundante colágeno, são extremamente raros quando comparados com a freqüência em que ocorrem nos tumores humanos. As figuras de mitose são raras, o pleomorfismo nuclear e formas bizarras são incomuns (WOODRUFF *et al.*, 2000; KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Os schwannomas podem ter áreas onde há baixa densidade celular, com um núcleo pequeno e escuro embebido em uma estrutura frouxa de estroma fibroso, em humanos denominada padrão Antoni tipo B (KAWAMURA *et al.*, 1998; KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Os schwannomas podem apresentar também um ou múltiplos focos de diferenciação mucóide, óssea e cartilaginosa (KOESTNER & HIGGINS, 2002). Metaplasia óssea e cartilaginosa podem potencialmente levar a um erro no diagnóstico avaliando os schwannomas como tumores osteogênicos. Em casos semelhantes, a observação de fascículos celulares e folhas compostas por diferentes tipos celulares podem ajudar no diagnóstico, assim como a observação de uma continuidade com o nervo na análise microscópica ou macroscópica (WOODRUFF *et al.*, 2000).

O processo pelo qual a diferenciação mencionada acima ocorre ainda não está bem esclarecido; muitos patologistas introduziram o conceito de tecido ectomesenquimal. As células oriundas da crista neural, além de se diferenciarem em melanócitos, células de Schwann e células nervosas, podem contribuir na formação de músculos, osso e cartilagem nas regiões do pescoço e cabeça o que pode explicar esse tipo de diferenciação osteogênica (CHIJIWA *et al.*, 2004). Há relatos de TSNP composto de células neoplásicas repletas de glóbulos eosinofílicos intracitoplasmáticos, o que induziria a uma aparência de tumores de células granulares (KAWAMURA *et al.*, 1998).

Freqüentemente, pequenos números de células tumorais estão infiltrados através do nervo a alguma distância da massa tumoral macroscópica. Essas células são visíveis microscopicamente e muitas vezes são as responsáveis pelas recidivas após a remoção cirúrgica (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Em gatos, os schwannomas tendem a ser menos celulares e as células são mais alongadas ou fusiformes com um padrão contínuo mais acentuado, maior quantidade de matriz mucóide ou colágena e células em paliçada do que normalmente é visto em caninos. Infiltrados inflamatórios linfocitários são freqüentemente encontrados, principalmente ao redor de vasos ou distribuídos pela massa tumoral. O padrão celular dos schwannomas felinos usualmente consiste de uma massiva desorganização celular dos nervos, focos concêntricos múltiplos de formações celulares formando estruturas plexiformes e por vezes os axônios periféricos podem ser vistos entremeados com essas áreas. Os gânglios, quando afetados, são grossos, celulares, com as fibras nervosas desorganizadas infiltradas por células fusiformes. Os corpos neuronais não são afetados (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Provavelmente o que melhor define o aspecto ultra-estrutural dos schwannomas é a lâmina basal externa circundando as células de Schwann neoplásicas e seus processos.

Comparado com as células de Schwann normais, a lâmina basal dos tumores é mais espessada, freqüentemente pregueada ao longo de aparentes e redundantes voltas e em alguns casos parece ser duplicada. Nem todos os tumores apresentam somente esse padrão celular ultra-estrutural, algumas vezes as células de Schwann neoplásicas estão intercaladas por fibroblastos ou outras células basais o que pode confundir o diagnóstico. Desmossomos podem ser encontrados em continuidade entre as células, assim como fibras colágenas (WOODRUFF *et al.*, 2000; KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Na citologia, os schwannomas são caracterizados por escassos agregados densos de células fusiformes. Algumas vezes fragmentos de axônios obtidos no aspirado tornam o diagnóstico mais fácil (KOESTNER & HIGGINS, 2002). Colorações especiais também podem ser utilizadas como uma ferramenta de auxílio no diagnóstico. Se o tumor tiver diferenciação epitelióide, o ácido periódico de Schiff demonstra pequenos aglomerados de mucopolissacarídeos entre as células epitelióides. A coloração de Bielschowsky e Luxol fast blue demonstram a presença de fibras nervosas normais ou fragmentadas presentes no interior do tumor (PUMAROLA *et al.*, 1996).

Não existem marcadores antigênicos específicos para os schwannomas. Com exceção da vimentina, a marcação em cães e gatos não é consistente e uniforme para todos os marcadores, muitas vezes impossibilitando o diagnóstico. Em cães e gatos, schwannomas fixados em formalina e emblocados em parafina somente podem ser marcados imunoistoquimicamente com proteína S100, GFAP, vimentina, colágeno IV ou laminina, sendo que esses dois últimos estão localizados no espaço extracelular. A marcação para fibrilas de reticulina usualmente é muito inconstante. Frequentemente ocorre a expressão do anticorpo Leu-7. As metástases pulmonares são positivas para a proteína S100 (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Apesar da proteína S100 ser muito usada para detecção e diagnóstico dos TSNP e melanomas, ela também é detectada em uma variedade de tumores não neurais e não melanogênicos como o histiocitoma fibroso maligno de felinos e caninos, carcinomas mamários humanos e hemangiopericitomas (CLARK *et al.*, 1985). Por vezes, o uso da proteína S100 impede um correto diagnóstico devido à grande marcação multicelular nos tecidos neoplásicos (PEREZ *et al.*, 1996).

Entretanto, marcadores adicionais específicos das células de Schwann como, por exemplo, a proteína mielínica do SNP, proteína básica mielínica, proteína P₂ e proteína P₀ podem ser usadas para diferenciar schwannomas de neoplasias de outras origens que também são S100 positivas (CLARK *et al.*, 1985).

Cerca de 33% dos schwannomas apresentam marcação imunoistoquímica para GFAP. Essa irregularidade, ao que tudo indica, está diretamente relacionada com a localização do tumor, tumores próximos do SNC tendem a ser mais positivos para GFAP do que aqueles localizados nas extremidades (KAWAHARA *et al.*, 1988; GRAY *et al.*, 1989). Receptores para NGF (NGFR) são freqüentemente expressos e demonstrados nos nervos periféricos em células de Schwann normais e no perineuro de humanos, mas a sua expressão nos animais domésticos não é observada (CHIJIWA *et al.*, 2004).

Os schwannomas devem ser diferenciados de outras neoplasias mesenquimais fusiformes incluindo o leiomiossarcoma, sarcoma sinovial, fibrossarcoma, histiocitoma maligno fibroso, sarcoma epitelióide e outros sarcomas de células claras (GRAY *et al.*, 1989). Os meningeomas caninos também podem ser considerados no diagnóstico diferencial dos schwannomas, particularmente em tumores intra ou extra-durais da medula ou no tecido subcutâneo. Os meningeomas fibrosos podem lembrar os schwannomas devido à sua formação celular fusiforme por vezes desarranjada (CHIJIWA *et al.*, 2004).

Os hemangiopericitomas são tumores que têm como origem o pericito vascular, e são comuns nos seres humanos e caninos. Esses tumores devem ser cuidadosamente diferenciados dos demais tumores do SNP. Ao contrário dos schwannomas, as células tumorais dos hemangiopericitomas estão organizadas preferencialmente ao redor de vasos, às vezes com compressão dos mesmos, e possuem forte marcação imunohistoquímica para a actina muscular, ausente nos schwannomas (PEREZ *et al.* 1996).

O resultado das intervenções cirúrgicas indica que o prognóstico dos TSNP particularmente dos schwannomas é desfavorável. Os tumores localizados distalmente da medula tem melhor prognóstico do que os tumores localizados próximos aos nervos descendentes e dos plexos braquiais e lombossacro (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

2.6.2 Neurofibroma

As folhas de tecido conjuntivo que recobrem os nervos do SNP são compostas de células de Schwann, células perineurais e fibroblastos; os neurofibromas podem conter essas células em várias proporções, mas acredita-se que há uma predominância das células perineurais em sua constituição (USHIGONE *et al.*, 1986; ZAMECNIK & MICHAL, 2001). Os neurofibromas são comuns e ocorrem solitários ou de uma forma difusa (WOODRUFF *et al.*, 2000). Esse crescimento ocorre de uma forma infreqüente em todas as espécies animais

com exceção dos bovinos (KOESTNER & JONES, 1997). Todas as idades são afetadas e não há predisposição sexual (WOODRUFF *et al.*, 2000).

Essas neoplasias se localizam intracranialmente de uma forma bem demarcada ou extracranialmente de uma forma difusa e infiltrativa. Como os schwannomas, os neurofibromas tendem a se localizar ao longo do curso de um nervo, ou num plexo ou gânglio. Nos bovinos, essas massas são observadas mais freqüentemente no miocárdio, às vezes com mais de um tumor ocorrendo no mesmo órgão. Em seres humanos ocorrem grandes quantidades de neurofibromas cutâneos no mesmo paciente – num quadro conhecido como neurofibromatose de von Recklinghausen. Um distúrbio com características semelhantes já foi descrito em cães e bovinos (KOESTNER & JONES, 1997; WOODRUFF *et al.*, 2000).

A neurofibromatose do tipo 1 (NF1) é uma das doenças genéticas mais proeminentes do sistema nervoso de humanos. A presença de neurofibromas múltiplos está associada a uma mutação no gene NF1, que em condições normais codifica a neurofibromina que funciona como um supressor dessas neoplasias (ZHU *et al.*, 2002).

Os neurofibromas subcutâneos são massas nodulares ou polipóides bem circunscritas e em alguns casos podem ser difusas envolvendo a pele e o tecido subcutâneo. Ao corte são firmes, brilhantes e levemente bronzeadas. As neoplasias confinadas aos nervos são fusiformes e bem circunscritas. Neurofibromas plexiformes são alongados e multinodulares e envolvem vários fascículos nervosos (WOODRUFF *et al.*, 2000). O principal sinal clínico observado é de hiperestesia contínua ou oscilante (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

O tumor é composto por células de Schwann neoplásicas, células perineurais e fibroblastos envoltos em uma matriz de fibras colágenas e mucosubstâncias. Inicialmente as células neoplásicas se distribuem ao longo dos nervos e com o passar do tempo envolvem a sua estrutura. Os núcleos são ovóides ou fusiformes, freqüentemente curvados e menores do que aqueles observados nos schwannomas (WOODRUFF *et al.*, 2000). As figuras de mitose são raras. Os processos celulares são finos e geralmente não são visíveis no microscópico de luz. Tipicamente, as células são rodeadas por fibras colágenas e por uma matriz mixóide azul alciano positiva. O colágeno possui um crescimento irregular formando nódulos semelhantes a “shredded carrots”, em alguns tumores observa-se a presença de melanócitos. Ao contrário do que é visto nos schwannomas, não há hialinização de vasos sanguíneos (USHIGOME *et al.*, 1986; KOESTNER & JONES, 1997).

Os neurofibromas são caracterizados pela presença de mastócitos que ultra estruturalmente ficam próximos às células perineurais (SANGUINETTI *et al.*, 1992). A

análise dessa observação leva os autores a assumir a existência de uma interação metabólica entre esses dois tipos celulares onde os mastócitos estariam envolvidos na evolução do tumor estimulando o crescimento celular ou alterando o fenótipo da célula tumoral (KIRKPATRICK & CURRY, 1988; SANGUINETTI *et al.*, 1992). Nos schwannomas, os mastócitos são menos freqüentes e, quando presentes, estão restritos às áreas de padrão Antoni tipo B (SANGUINETTI *et al.*, 1992).

A microscopia eletrônica demonstra uma grande variedade de tipos celulares nos neurofibromas. Os dois tipos mais observados são as células de Schwann, associadas ou não aos axônios, e as células perineurais (WOODRUFF *et al.*, 2000). Ultra-estruturalmente as células perineurais nos neurofibromas são bem características, mas pode haver similaridades com as células de Schwann. Processos citoplasmáticos alongados bipolares ou tripolares são arranjados em padrão reticular ou lamelar. Os processos celulares tendem a aderir uns aos outros com junções celulares semelhantes a desmossomos. Lâmina basal, vesículas pinocíticas evidentes e filamentos intracitoplasmáticos abundantes são observados freqüentemente (USHIGONE *et al.*, 1986).

Marcação pela proteína S100 é invariavelmente vista, mas a proporção de células reativas é menor do que a observada em schwannomas (HIROSE *et al.*, 1998). Uma forte marcação por S100 é observada no centro da neoplasia, em uma posição que corresponde às células de Schwann pré-existentes (ARIZA *et al.*, 1988). Os neurofibromas exibem acentuada marcação por vimentina e marcação irregular por Leu γ (HIROSE *et al.*, 1998).

O antígeno de membrana epitelial (EMA), em alguns casos, apresenta uma marcação irregular e escassa. Acredita-se que esse fenótipo negativo é devido à existência de características transicionais nos componentes das células perineurais. Sabe-se que quanto maior a expressão de células perineurais em um tumor, maior será a expressão do EMA (ARIZA *et al.*, 1988).

O diagnóstico diferencial deve ser estabelecido entre os schwannomas, fibromas, TMBNP, e dos sarcomas indiferenciados. Os neurofibromas plexiformes e os neurofibromas localizados em nervos de grande calibre devem ser observados com atenção, pois, em muitos casos tendem a malignizar (WOODRUFF *et al.*, 2000).

2.6.3 Perineuroma

Os perineuromas são tumores benignos compostos inteiramente de células neoplásicas perineurais. Essas neoplasias são extremamente raras, e ocorrem como tumores

únicos ou múltiplos ao longo do nervo. Histologicamente consistem de distintos feixes concêntricos de células alongadas, em torno de uma grande quantidade de axônios mielinizados. Na medicina veterinária há relatos da sua ocorrência em caninos e em *Gallus gallus domesticus* (SCHEITHAUER *et al.*, 2000; KOESTNER & HIGGINS, 2002; TOYODA *et al.*, 2005).

Em humanos os perineuromas são classificados de duas formas distintas: 1) extraneural e 2) intraneural, nesse caso caracterizados por nervos periféricos cilíndricos e hipertróficos (neuropatia hipertrófica). O perineuroma extra-neural é infreqüente e não há relatos da sua ocorrência nos animais domésticos (TOYODA *et al.*, 2005).

Os sinais clínicos são de fraqueza muscular progressiva com ou sem atrofia muscular seguida de distúrbios sensoriais. Os nervos periféricos das extremidades são primariamente afetados. Lesões nos nervos craniais são raras. As aves demonstram uma paralisia progressiva dos membros, como resultado da degeneração e perda das fibras dos nervos periféricos (TOYODA *et al.*, 2005).

Macroscopicamente os fascículos nervosos afetados são engrossados e pálidos, a maioria das lesões são pequenas, mas em alguns casos podem ter mais de 40 cm. O tumor envolve múltiplos fascículos como uma massa bem circunscrita não encapsulada. Ao corte os perineuromas são firmes, brancos acinzentados e algumas vezes possuem aspecto mixóide (SCHEITHAUER *et al.*, 2000).

Perineuromas intraneurais consistem de células neoplásicas perineurais que proliferam através do endoneuro formando lâminas concêntricas ao redor dos nervos na forma característica de pseudo “onion bulbs”. As células perineurais neoplásicas invadem o perineuro e o endoneuro. Essas células são citologicamente normais e concentricamente dispostas em múltiplas camadas e ao redor das fibras nervosas. Algumas lâminas de células perineurais neoplásicas podem envolver numerosas fibras nervosas. Com o passar do tempo as pseudo “onions bulbs” começam a se anastomosar uns com os outros formando uma rede endoneural (SCHEITHAUER *et al.*, 2000). As fibras nervosas são gradualmente comprimidas pelo crescimento celular resultando na degeneração e colapso dos axônios e bainhas de mielina. Macrófagos e linfócitos ocasionalmente infiltram os nervos afetados em vários graus. As mitoses são raras (TOYODA *et al.*, 2005).

Ultra-estruturalmente observam-se processos bipolares de vários tamanhos. O citoplasma fusiforme ocasionalmente contém vesículas pinocíticas e uma lâmina basal descontínua. O diagnóstico diferencial inclui os schwannomas e os neurofibromas que são as neoplasias mais comuns do SNP (TOYODA *et al.*, 2005).

As células fusiformes dos perineuromas são negativas para a proteína S100 α/β e vimentina. O principal marcador para as células perineurais normais e neoplásicas é o EMA (ARIZA *et al.*, 1988).

2.6.4 Tumores malignos de bainha de nervo periférico (TMBNP)

Os TMBNP são neoplasias malignas que se originam dos nervos periféricos e demonstram diferenciação nervosa, com exceção dos tumores que se originam do epineuro e do tecido vascular perineural. Esses tumores compõem 5% das neoplasias do SNP e na maioria dos casos se originam de neurofibromas (WOODRUFF *et al.*, 2000).

Todas as espécies animais são afetadas. As fêmeas adultas são mais acometidas e os nervos de maior diâmetro os mais lesados, incluindo o plexo braquial e região paraespinal (WOODRUFF *et al.*, 2000). Ao exame clínico observa-se um aumento de volume na região afetada e os sinais neurológicos podem ou não estar presentes (HIROSE *et al.*, 1998).

A aparência macroscópica dos TMBNP é de massas globóides e fusiformes, aparentemente encapsuladas de consistência firme. O local de adesão ao nervo é freqüentemente observado. Ao corte, a massa é cinza pálida com focos de necrose e hemorragia que algumas vezes são extensos (HIROSE *et al.*, 1998).

As massas tumorais dos TMBNP freqüentemente são pouco ou não circunscritas, e as células neoplásicas exibem um padrão agressivo com alta celularidade e variação morfológica. Na grande maioria dos casos, os tumores são compostos por uma população homogênea de células redondas, arranjadas em folhas ou cordões com ou sem entrosamento das fibras reticulares. Células fusiformes ou alongadas se entrelaçam com conjuntos de fibras vindas de outras direções. Múltiplos agregados de células grandes, poligonais e fusiformes formam estruturas semelhantes a “onion bulbs”. Os núcleos variam de redondos a ovais e vesiculares com um nucléolo proeminente. Em alguns tumores malignos às vezes são observados grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, positivos para PAS e azul alciano. Células mononucleares ou multinucleares atípicas são comumente observadas, assim como focos de necrose acompanhados por pseudopaliçadas celulares e infiltrado inflamatório intenso de linfócitos, plasmócitos, e macrófagos. Mais de quatro figuras de mitose são observadas por campo, assim como, depósitos de hemossiderina e rara formação de rosetas (KOESTNER & HIGGINS, 2002, CHIJIWA *et al.*, 2004).

Os TMBNP dos felinos têm marcado pleomorfismo celular com núcleos grandes e irregulares, nucléolo proeminente, citoplasma eosinofílico bipolar, estroma colágeno,

muitas figuras de mitose, algumas bizarras, e, em alguns casos, intensa invasão local dos tecidos adjacentes como músculo e osso. Como nos cães, os TMBNP dos felinos e eqüinos podem ser localmente invasivos (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Devido à pobre diferenciação das células que compõem os TMBNP a microscopia eletrônica é de pouca utilidade no diagnóstico (CHIJIWA *et al.*, 2004). Imunoistoquimicamente, os TSNP são geralmente positivos para vimentina e S100, entretanto TMBNP anaplásicos e heterogêneos tendem a ser negativos para S100. Alguns autores têm especulado que a ausência da marcação para S100 indica caráter de malignidade (KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Células neoplásicas positivas para citoqueratina podem aparecer como resultado de uma diferenciação divergente. A imunorreatividade para citoqueratina dos TMBNP pode induzir algumas confusões em relação ao diagnóstico diferencial principalmente dos sarcomas sinoviais (CHIJIWA *et al.*, 2004).

Receptores para NGF (NGFR) são freqüentemente expressos e demonstrados nos nervos periféricos, em células de Schwann normais e perineuro. Existem alguns estudos da imunorreatividade ao NGFR em caninos, que demonstraram uma variação entre a marcação em caninos e humanos. Em caninos uma maior positividade do NGFR é observada nos rabdomiossarcomas o que pode ajudar a distinguir os TBSNP desses tumores (CHIJIWA *et al.*, 2004) Os TBSNP são altamente agressivos e possuem um mau prognóstico (WOODRUFF *et al.*, 2000).

2.7 Regiões Organizadoras Nucleolares Arginofílicas (AgNOR)

A atividade proliferativa alterada é uma das maiores características das células tumorais e é fortemente correlacionada com o prognóstico das neoplasias. Conseqüentemente, as taxas de proliferação são usadas como indicador de prognóstico. A marcação pela prata nas regiões organizadoras nucleolares ativas (NORs), as quais são conhecidas com AgNORs, vem sendo aplicada em uma série de tumores no intuito de indicar o grau de atividade nucleolar. A eficiência dessa técnica já foi comprovada em mastocitomas caninos e carcinomas de células escamosas em humanos (KORNEVEY *et al.*, 2000; RECH, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A técnica de marcação pela prata é diretamente relacionada com o nível de transcrição do r-DNA (DNA ribossômico), pois o aumento na quantidade de r-DNA é característico das células que estão entrando em mitose (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.8 Método do Picrosírius Polarizado

O colágeno constitui uma família de proteínas alongadas que formam fibras. Elas compreendem mais de uma dúzia de tipos, das quais quatro são as mais conhecidas. Estas são denominadas tipo I, II, III e IV (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). Em certas localizações anatômicas, como nos nervos, artérias, músculo liso e na pele, os tipos de colágeno estão segregados em diferentes compartimentos e quantidades (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

O colágeno tipo I está localizado no epineuro, na adventícia dos vasos sanguíneos e nas camadas profundas da derme. Já o colágeno tipo III é observado no endoneuro, na túnica média das artérias e na adventícia da derme (MONTES & JUNQUEIRA, 1991). O colágeno tipo II é característico das cartilagens elásticas e o tipo IV da lâmina basal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Muitas técnicas de coloração, em especial as do grupo dos Tricrômicos, são utilizadas para auxiliar na diferenciação das fibras colágenas e musculares. Apesar da funcionalidade, essas técnicas apresentam uma marcação quantitativa e não qualitativa, ou seja, elas não indicam os tipos de colágeno presentes na amostra analisada (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Através do método do Picrosírius, que utiliza o ácido Sirius Red, o colágeno intersticial demonstra diferentes intensidades de cores quando observado sob luz polarizada. O colágeno tipo I apresenta fibras amarelas ou vermelhas grossas, fortemente birrefringentes, o colágeno tipo III é fino, esverdeado com pouca birrefringência. O colágeno tipo II não forma fibras e demonstra uma birrefringência de cores variadas. Já o colágeno tipo IV é fino e amorfo com uma fraca birrefringência nas lâminas basais (Quadro 5) (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Tipo de Colágeno	I	III	II	IV
Máximo nível de organização corporal	Feixes de fibras grossas (2-10 μm)	Fibras individuais (0,5-1,5 μm de diâmetro)	Fibrilas (20-30 nm de diâmetro)	Microfibrilas contendo moléculas organizadas (1,5 nm de largura)
Aspectos histológicos quando analisados sob o método do Picrosírius Polarizado	Feixes densos e grossos fortemente birrefringentes. Fibras amarelas ou vermelhas. <i>Fibras colágenas.</i>	Aglomerado frouxo de fibras finas, fracamente birrefringentes. Fibras esverdeadas. <i>Fibras de reticulina.</i>	Cadeia frouxa de colágeno demonstrando uma fraca birrefringência de cores variadas.	Microfibrilas finas amorfas fracamente birrefringentes nas lâminas basais.
Ultra-estrutura	Feixes densos e grossos (75 nm) fibrilas com marcada variação de diâmetro.	Fibras finas agregadas frouxamente (45 nm) com fibrilas de diâmetro uniforme.	Sem fibras. Fibrilas muito finas embebidas em abundante substância amorfa.	Nenhuma fibra ou fibrila, somente microfibrilas são detectadas.

Quadro 5 – Caracterização histoquímica e ultra-estrutural dos tipos de colágenos mais comuns Fonte: Montes & Junqueira, 1991.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram revisados todos os protocolos de biópsia e necropsia de janeiro de 1964 a dezembro de 2004, no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Desse levantamento, os seguintes dados foram coletados: espécie, idade, sexo, raça e o número total de neoplasias do sistema nervoso periférico diagnosticado em todas as espécies de animais domésticos. A idade dos animais foi agrupada em três grupos; animais de 1 a 5 anos, 6 a 10 anos e mais de 10 anos.

Das neoplasias diagnosticadas, além das informações acima citadas, recolheram-se dados como localização, presença de metástases, tempo de evolução, sinais clínicos e aspecto macroscópico quando mencionados. Foram encontrados 12 tumores sendo, onze de biópsias e um de necropsia. Destes, 7 eram schwannomas e 5 eram neurofibromas. Nove tumores (4 schwannomas e 5 neurofibromas) foram submetidos a métodos histoquímicos e imunoistoquímicos. Os métodos histoquímicos tinham como objetivo avaliar o aspecto histológico, quantificar e qualificar o colágeno, observar a presença de regiões organizadoras nucleolares arginofílicas (argiophilic nucleolar organizer region–AgNORS) e avaliar a presença e número de mastócitos. A imunoistoquímica visou avaliar a marcação das neoplasias pelos anticorpos vimentina, S100 e GFAP.

3.1 Aspecto histológico

Secções de 5 µm de espessura foram obtidas de cada tumor e coradas com hematoxilina-eosina (H&E) (CULLING *et al.*, 1985). Cada tumor foi classificado e avaliado de acordo com os critérios propostos por Woodruff *et al.*, (2000). Esses critérios incluem caracterização do tipo celular neoplásico, forma e diferenciação celular, número de mitoses (1 a 2 mitoses por cga raras, 3-5 mitoses por cga moderadas, mais de 5 mitoses por cga acentuada), presença de cápsula e infiltração das células neoplásicas no tecido além de outras alterações como edema, hemorragia e necrose. Esses dados permitem diferenciar as neoplasias do sistema nervoso periférico entre si e avaliar a malignidade do tumor.

3.2 Tricrômico de Masson

Essa técnica permite visualizar e quantificar as fibras colágenas nos tecidos; além de diferenciar fibras colágenas de fibras musculares. As fibras colágenas se coram intensamente por azul enquanto que as fibras musculares não se coram (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Cortes de 5 µm de espessura de cada neoplasia foram desparafinizados e hidratados em água destilada. A coloração foi realizada com o kit “Easy Path®”^{*} para Tricrômico de Masson de acordo com as instruções do fabricante. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas e montadas (CULLING *et al.*, 1985) (ANEXO A).

Os cortes histológicos foram analisados e a presença de tecido conjuntivo foi avaliada subjetivamente e classificada em graus: ausente (-) quando não havia marcação para o tecido conjuntivo, leve (+) quando a marcação não excedia 30%, moderada (++) quando a marcação variava de 30 a 70 % e acentuada (+++) quando a marcação do tecido conjuntivo variava de 70 a 100%.

3.3 Pícosírius Red

Essa técnica permite caracterizar os diferentes tipos de colágeno I, II, III e IV através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Cortes de 5 µm de espessura foram desparafinizados, hidratados em água destilada e corados por uma hora em uma solução de Sirius Red a 0,1% dissolvida em ácido pícrico. Após, as lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente e contra coradas em uma solução de Hematoxilina de Harris por 6 minutos. Depois de montadas, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional com o auxílio de dois filtros polarizadores que promoviam a birrefringência no colágeno corado (MONTES & JUNQUEIRA, 1991) (ANEXO B).

Sob a luz polarizada o colágeno tipo I se apresenta como fibras grossas, birrefringentes na cor amarela ou vermelha, o colágeno tipo III aparece em feixes finos pouco refringentes de cor esverdeada. O colágeno tipo II assume um padrão frouxo de colágeno

^{*} Easy Path, Erviegas. São Paulo, SP

demonstrando uma fraca birrefringência de cores variadas. Microfibrilas finas amorfas fracamente birrefringentes nas lâminas basais são características do colágeno tipo IV (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

3.4 AgNOR

Foi obtido um corte de 5 μm de espessura de cada neoplasia. Os cortes foram desparafinizados e hidratados em água deionizada e posteriormente corados em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50% na proporção de 1:2. As lâminas ficaram imersas nessa solução por 45 minutos em temperatura ambiente. Foram lavadas em água deionizada por 1 minuto, desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (RECH, 2003) (ANEXO C).

Para definir a frequência de AgNOR, foram contados os pontos pretos no interior dos núcleos em 100 células tumorais em campos aleatórios e representativos de maior aumento (1000x). Um campo representativo é definido como uma área do tumor de pelo menos 10 células tumorais entre a junção normal e as células neoplásicas. A frequência foi obtida dividindo-se o número de AgNOR por 100 (RECH *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

As neoplasias foram divididas em quatro grupos: schwannomas benignos, schwannomas malignos, neurofibromas benignos e neurofibromas malignos. Essa classificação prévia permitiu uma melhor análise do resultado de AgNOR obtido.

3.5 Azul de toluidina

Essa técnica permite visualizar grânulos citoplasmáticos orto e metacromáticos em mastócitos, o que auxilia à visualização dessas células no tecido (CULLING *et al.*, 1985). O azul de toluidina ainda é usado para a confirmação do diagnóstico de mastocitomas, além de servir como ferramenta para a diferenciação dos graus histológicos dessas neoplasias (RECH, 2003).

Cortes de 5 μm de espessura das neoplasias do SNP foram desparafinizados e hidratados em água destilada e posteriormente imersos em solução de toluidina a 0,1% por 2 minutos. Após esse procedimento as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas e montadas (CULLING *et al.*, 1985). Foram coletados fragmentos do nervo trigêmeo de um bovino e do plexo braquial de um canino para serem usados como controle na

quantificação dos mastócitos nas neoplasias. Para a contagem do número de mastócitos foram analisados 10 campos aleatórios no aumento de 400X.

3.6 Imunoistoquímica

Amostras das neoplasias foram processadas rotineiramente para a realização da técnica de imunoistoquímica. Para a imunomarcção da vimentina, S100 e GFAP em neurofibromas e schwannomas foram utilizados o anticorpo primário monoclonal anti-vimentina Clone V9 produzido em camundongo (DakoCytomation – Código M0725), o anticorpo policlonal anti-S100 produzido em coelho (DakoCytomation – Código Z0311) e anticorpo anti-GFAP produzido em camundongo (Dako Cytomation – M0761), respectivamente. O detalhamento do protocolo de imunoistoquímica encontra-se no Apêndice A.

4 RESULTADOS

4.1 Epidemiologia

Nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, no período de janeiro de 1964 a dezembro de 2004 (41 anos), foram encontrados doze protocolos (11 biópsias e 1 necropsia) de animais domésticos com tumores de sistema nervoso periférico. Destes, 7 (7/12) eram schwannomas e 5 (5/12) eram neurofibromas (Gráfico 1).

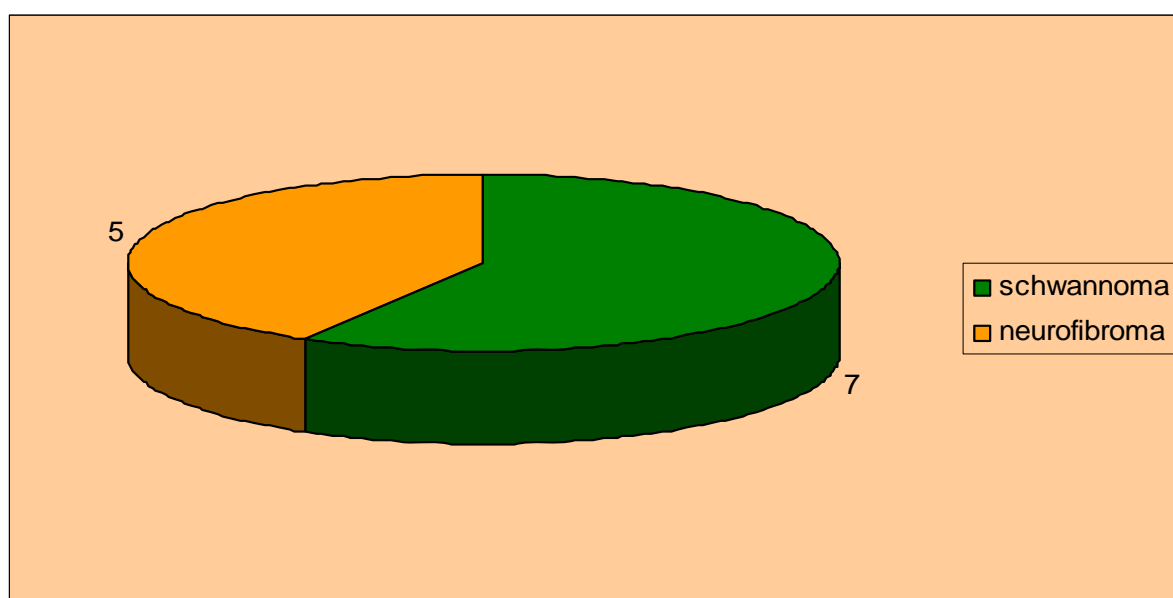


Gráfico 1 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Distribuição dos tumores de SNP (schwannomas e neurofibromas) nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria entre os anos de 1964 e 2004.

Os schwannomas corresponderam ao maior grupo (7/12) de neoplasias do SNP, e foram todos diagnosticados em cães. Destes, quatro (4/7) eram machos e três (3/7) eram fêmeas. Dos animais com schwannomas, um (1/7) tinha 1 a 5 anos, cinco (5/7) tinham de 6 a 10 anos e um (1/7) tinha mais de 10 anos. A média de idade dos cães com schwannomas foi 7,8 (\pm 2,4 anos). Esses tumores foram mais frequentes em cães com mais de 6 anos (5/7). A Tabela 1 mostra a distribuição dos schwannomas de acordo com a espécie, sexo, idade, raça e localização.

Tabela 1- Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Distribuição dos schwannomas de acordo com a espécie, sexo, idade e raça.

Caso	Espécie	Sexo	Idade (anos)	Raça	Localização
V231-82	Canina	Macho	10	SRD	MAD
V818-89	Canina	Macho	6	Pastor Alemão	MPE
V390-96	Canina	Fêmea	11	Collie	Psc
V248-98(B)	Canina	Macho	6	Cocker	MAE
V133-99	Canina	Macho	10	Husky Siberiano	Olho
V208-04	Canina	Fêmea	7	Pastor Alemão	PBr
Vn109-88	Canina	Fêmea	5	Pastor Alemão	V NCr

MAD (membro anterior direito); MPE (membro posterior esquerdo); Psc (pescoço); MAE (membro anterior esquerdo); PBr (plexo braquial); V NCr (V nervo craniano).

Quanto à localização anatômica, os schwannomas encontrados distribuíram-se na seguinte ordem de frequência: cabeça 2 (2/7) um deles afetando o olho (1/7) e o outro o V par craniano (nervo trigêmio) (1/7), tronco 2 (2/7) sendo que um destes estava localizado no plexo braquial, e membros 3 (3/7). Somente em um dos casos (1/7) houve metástases, e estas se localizavam no pulmão. Quanto ao tempo de evolução, em três casos esse dado não foi informado. Nos casos informados, o tempo de evolução variou entre vinte dias (sic) e um ano.

Os sinais clínicos foram de claudicação do membro afetado, deficiência neurológica, proprioceptiva e do reflexo flexor além de sensibilidade superficial e profunda diminuída (3/7). No caso de comprometimento pulmonar o animal apresentou dispnéia. Cegueira, anorexia e incordenação motora foram características quando havia envolvimento do V par craniano (1/7).

Os neurofibromas corresponderam ao menor grupo (5/12) de neoplasias do SNP, e foram diagnosticados em bovinos (3/5) e caninos (2/5). Dos bovinos, em dois casos o sexo do animal não foi informado (2/5), e um caso foi diagnosticado em uma fêmea (1/5). Um dos animais tinha 8 anos e em dois protocolos a idade não foi informada (2/5). A raça dos bovinos com neurofibroma não foi informada em dois casos (2/5), o outro bovino era SRD (1/5).

Quanto à localização anatômica, os neurofibromas se localizavam na língua (1/5), pescoço (1/5) e fígado (1/5) e neste caso havia envolvimento da vesícula biliar. O tempo de evolução em dois casos não foi informado (2/5). No caso em que o tempo de evolução

constava, este era de um ano (1/5). O sinal clínico mais citado nos casos de neurofibroma era de hiperestesia acentuada (2/5).

Um canino macho de seis anos, da raça Cocker apresentou um neurofibroma no membro anterior esquerdo. O tempo de evolução era de um ano e houve recidiva 6 meses após a cirurgia. A Tabela 2 demonstra os casos de neurofibroma diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria de acordo com a espécie, sexo, idade, raça e localização.

Tabela 2 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Distribuição dos neurofibromas de acordo com a espécie, sexo, idade e raça.

Caso	Espécie	Sexo	Idade (anos)	Raça	Localização
V77-79	Bovina	ni	ni	ni	Lng
V01-90	Bovina	Fêmea	8	SRD	Psc
V318-94	Bovina	ni	ni	ni	Fíg
V77-98	Canina	Macho	6	Cocker	MAE
V248-98 (A)	Canina	Macho	6	Cocker	MAE

Ni (não informado); Lng (língua); Psc (pescoço); Fig (fígado); MAE (membro anterior esquerdo).

4.2 Apresentação dos tumores de SNP de acordo com os aspectos macroscópico e histológico

Os schwannomas mediam de 2 a 7 cm de diâmetro, e se caracterizaram como estruturas ovais brancas (6/7) ou avermelhadas (1/7) com (2/7) ou sem (5/7) envolvimento macroscópico de um fascículo nervoso. Os tumores eram firmes (5/7), duros (1/7) ou friáveis (1/7). Ao corte apresentavam uma cor esbranquiçada (6/7) ou amarelada (1/7). A tumoração assumia um padrão concêntrico (1/7), ou homogêneo (6/7) com focos deprimidos de aspecto lardáceo (3/7) (Figura 8). Macroscopicamente, os schwannomas eram localmente invasivos (3/7), comprimindo o encefálo (1/7) ou desarranjando a arquitetura do globo ocular (1/7). Em uma das neoplasias observou-se formação óssea multifocal acentuada (1/7).

Macroscopicamente, os neurofibromas caracterizavam-se por estruturas nodulares (4/5) ou elípticas (1/5) que variavam de 1 mm a 25 cm de diâmetro. Essas nodulações eram brancas (5/5), firmes (4/5) ou moles (1/5). Ao corte todas eram branco acinzentadas (5/5) com aspecto liso, brilhante, homogêneo (4/5) ou irregular lobululado (1/5). As neoplasias eram localmente invasivas (5/5) com radiações brancas para o tecido muscular (4/5) ou hepático (1/5).

Nove dos tumores de SNP diagnosticados entre 1964 e 2004 foram analisados microscopicamente de acordo com os critérios propostos por Woodruff *et al.* (2000). Quatro (4/9) desses tumores foram diagnosticados como schwannomas e cinco (5/9) como neurofibromas.

Microscopicamente os schwannomas se caracterizavam por uma proliferação neoplásica altamente celular composta de células fusiformes que se arranjavam ora em paliçada (padrão Antoni tipo A) (2/4) (Figura 9A), ora em ninhos e feixes dispostos em vários sentidos (4/4) (Figura 9B). Em um dos tumores havia áreas pouco celulares onde as células se organizavam numa textura frouxa envoltas por uma matriz mixóide basofílica (padrão Antoni tipo B) (1/4) (Figura 9C). O citoplasma das células era eosinofílico, e indistinto (4/4). Os núcleos eram fusiformes (4/4) e/ou ovais (2/4) e apresentavam a cromatina condensada (4/4) e frouxa (2/4) com 1 a 3 nucléolos evidentes (3/4) ou mais de três nucléolos evidentes (1/4). Em uma das neoplasias observavam-se pequenas ilhas de cartilagem e tecido ósseo envoltas por ninhos e feixes de células fusiformes neoplásicas (1/4) (schwannoma com diferenciação óssea) (Figura 10). Aspecto digitiforme das células tumorais foi observado em áreas multifocais de uma neoplasia (1/4). Não foram observados corpos de Verocay (4/4).

As mitoses eram moderadas, 3 a 5 por cga (1/4) e acentuadas, mais de 5cga (3/4). O pleomorfismo celular e nuclear era moderado (2/4) a acentuado (1/4). Em quase todas as amostras observavam-se focos de hemorragia (3/4) (Figura 11), formação de trombos (3/4) e extensas áreas de necrose (3/4). Nessas áreas havia um infiltrado moderado multifocal de neutrófilos e macrófagos (3/4). Linfócitos, macrófagos e plasmócitos estavam presentes em todos os casos, distribuídos em áreas multifocais entre as células tumorais e na periferia do tumor (4/4). Em um dos casos havia um infiltrado granulomatoso focalmente extenso na derme profunda com células gigantes tipo Langhans e tipo corpo estranho (1/4). Dermatite linfo-histiocitária acentuada foi observada em um dos schwannomas subcutâneos (1/4) (Tabela 3).

Os schwannomas eram envoltos por uma fina cápsula de tecido conjuntivo (2/4), e as células neoplásicas se infiltravam entre as fibras de tecido muscular e adiposo (2/4) adjacente. Em um dos casos as células neoplásicas invadiam a derme superficial, infiltrando-se entre as glândulas anexas da pele até atingir a epiderme (1/4). Na neoplasia ocular as câmaras anterior e posterior do olho estavam repletas de células neoplásicas que se disseminavam sobre o cristalino e alcançavam a córnea (1/4). Nesta havia uma área focal de hiperplasia do epitélio com formação de papilas e metaplasia escamosa. Observava-se ceratite

linfo-histioplasmocitária difusa acentuada com neovascularização e fibrose do estroma corneano (1/4).

Os neurofibromas se caracterizaram por uma proliferação neoplásica de células fusiformes (3/5) (Figura 12), com núcleos basofílicos, ovóides (2/5) e fusiformes (3/5) levemente curvados com um a três nucléolos evidentes (2/5) ou com mais de três nucléolos (3/5). As células se multiplicavam a partir da periferia dos nervos e formavam feixes e ninhos (3/5) ou se distribuíam em manto (2/5). O pleomorfismo celular e nuclear era moderado a acentuado com formas nucleares aberrantes (3/5). As mitoses eram raras (3/5) a moderadas (2/5). O citoplasma era eosinofílico (5/5), escasso (5/5) e indistinto (5/5) (Tabela 3).

As neoplasias eram infiltrativas (5/5) com destruição do tecido muscular adjacente (4/5) e compressão dos ductos biliares causando retenção biliar (1/5) (Figura 13). A presença de uma fina cápsula fibrosa foi observada em dois casos (2/5) e ausente nos demais (3/5). A presença de hipertrofia dos fascículos nervosos (2/5) e a segregação dos feixes axonais (1/4) foram vistas. Nos neurofibromas cutâneos (3/5) observou-se uma dermatite linfo-histioplasmocitária e neutrofílica moderada principalmente na derme superficial (Figura 14). Em um caso foi observada mucosubstância anfófila (1/5) entre as células tumorais, enquanto a presença de corpos neuronais foi detectada em outro (1/5) (Figura 15).

De acordo com os aspectos histológicos, os schwannomas eram bem diferenciados (2/4) ou pouco diferenciados (2/4). Essa classificação também foi realizada nos neurofibromas sendo que dois foram pouco diferenciados (2/5) e três bem diferenciados (3/5).

Tabela 3 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Características histológicas dos schwannomas e neurofibromas.

Achados Histológicos	Schwannomas		Neurofibromas	
	n	%	n	%
Diferenciação				
Bem diferenciado	2/4	50%	3/5	60%
Pouco diferenciado	2/4	50%	2/5	40%
Padrão celular				
Manto celular	-	-	2/5	40%
Digitiforme	1/4	25%	-	-
Ninhos	2/4	50%	3/5	60%
Feixes	4/4	100%	3/5	60%
Paliçada (Antoni A)	2/4	50%	-	-
Mixomatoso (Antoni B)	1/4	25%	-	-
Tamanho da célula				
Uniforme	1/4	25%	2/5	40%
Anisocitose	3/4	75%	3/5	60%
Anisocitose + células gigantes	3/4	75%	1/5	20%
Forma da célula				
Fusifforme	1/4	25%	3/5	60%
Pleomórfico	3/4	75%	2/5	40%
Núcleo				
Anisocariose	4/4	100%	5/5	100%
Núcleos aberrantes	4/4	100%	3/5	60%
Oval	2/4	50%	2/5	40%
Fusifforme	4/4	100%	3/5	60%
Cromatina frouxa	2/4	50%	1/5	20%
Cromatina condensada	4/4	100%	4/5	80%
Mitose				
Rara	-	-	3/5	60%
Moderada	1/4	25%	2/5	40%
Acentuada	3/4	75%	-	-
Nucléolo				
1 a 3	3/4	75%	2/5	40%
> 3	1/4	25%	3/5	60%
Estroma				
Ausente	2/4	50%	-	-
Leve	1/4	25%	3/5	60%
Moderado	1/4	25%	1/5	20%
Acentuado	-	-	1/5	20%
Infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário				
Leve	1/4	25%	3/5	60%
Moderado	2/4	50%	1/5	20%
Acentuado	1/4	25%	1/5	20%
Outras alterações				
Metaplasia	1/4	25%	-	-
Hemorragia	3/4	75%	-	-
Necrose	3/4	75%	-	-
Tricrômico de masson				
Ausente	2/4	50%	2/5	40%
Pouco	1/4	25%	1/5	20%
Moderada	1/4	25%	1/5	20%
Acentuada	-	-	1/5	20%
AgNOR	1,72 ± 0,17	-	1,78 ± 0,11	-
Picrosírius Red				
Colágeno Tipo I	2/4	50%	3/5	60%
Colágeno Tipo III	2/4	50%	3/5	60%

4.3 Quantificação do tecido conjuntivo fibroso nas neoplasias do SNP (tricroômico de Masson)

O método do tricroômico de Masson permitiu observar e quantificar o tecido conjuntivo fibroso nos schwannomas e neurofibromas. Nos schwannomas a proliferação de tecido conjuntivo era moderada nas áreas onde as células neoplásicas estavam dispostas em uma matriz mixóide basofílica (padrão Antoni tipo B) (1/4). A proliferação de tecido conjuntivo era discreta entre as células organizadas em paliçadas; por vezes uma fina camada de tecido conjuntivo envolvia as células neoplásicas (1/4). Na neoplasia com diferenciação óssea, havia coloração azul no tecido ósseo (Figura 16A). Em dois schwannomas não se observou a presença de tecido conjuntivo entre as células neoplásicas; nesses casos o tecido conjuntivo estava distribuído uniformemente na cápsula do tumor (2/4) (Tabela 4).

Nos neurofibromas, o tecido conjuntivo era visto de forma moderada a acentuada ao redor de nervos (perineuro) (2/5) (Figura 16B). No endoneuro as fibras de tecido conjuntivo estavam dispostas em pequenos feixes aleatórios numa forma difusa, moderada a acentuada (2/5). Por vezes a coloração era presente somente nos vasos sanguíneos e era leve no endoneuro (1/5). Não houve coloração pelo tricroômico de Masson em duas neoplasias (2/5) (Tabela 4).

Tabela 4 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Presença e quantificação do tecido conjuntivo fibroso nos neurofibromas e schwannomas.

Caso	Neoplasia	Presença de tecido conjuntivo fibroso
V77-79	neurofibroma	++
V01-90	neurofibroma	+
V318-94	neurofibroma	+++
V77-98	neurofibroma	-
V248-98 (A)	neurofibroma	-
V390-96	schwannoma	+
V248-98 (B)	schwannoma	-
V133-99	schwannoma	-
V208-04	schwannoma	++

- (ausente); + (leve); ++ (moderado); +++ (acentuado).

4.4 Qualificação do tecido conjuntivo nas neoplasias do SNP (Picrosíríus Red)

Através da técnica do Picrosirius red foram analisados 4 schwannomas e 5 neurofibromas. Nos schwannomas havia uma intensa proliferação de fibras de colágeno tipo I na cápsula da neoplasia (Figura 17A) e entre as células em paliçada (2/4) e nas áreas de padrão mixomatoso (2/4). A presença de colágeno tipo III era rara (1/4) a acentuada (1/4) e quando presente estava disposto em feixes curtos entre as fibras colágenas tipo I, e algumas vezes, sozinho entre as células tumorais (Figura 17B).

Os neurofibromas apresentaram grande quantidade de fibras vermelhas e amarelas grossas, fortemente birrefringentes (colágeno tipo I) principalmente no epineuro e perineuro dos nervos de maior calibre e também, em menor quantidade, no endoneuro (3/5) (Figura 18A). O colágeno tipo III aparecia como filamentos finos, esverdeados, fracamente birrefringentes, em grande quantidade no endoneuro (3/5) e perineuro (2/5) (Figura 18B). Em dois casos não foi observada proliferação de nenhum tipo de colágeno entre as células neoplásicas (2/5) com exceção de leve quantidade de colágeno tipo I na cápsula do tumor e na derme superficial. A presença dos colágenos tipo I e tipo III era observada concomitantemente nas neoplasias.

4.5 Técnica de AgNOR nas neoplasias de SNP

As regiões organizadoras nucleolares argirofílicas coraram-se intranuclearmente, como pontos pretos ou marrom-escuros. A média (\pm DP) de contagem de AgNOR em 100 células nos schwannomas benignos foi de $1,66 \pm 0,26$ e nos malignos de $1,78 \pm 0,09$. Nos neurofibromas classificados como benignos a média foi de $1,72 \pm 0,04$ e nos malignos de $1,83 \pm 0,13$. Quando comparadas pelo teste de Tukey, as médias de AgNOR das neoplasias benignas e malignas de ambos os tumores, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). A contagem geral de AgNOR variou de 1,48 a 1,85 com média geral (\pm DP) de $1,72 \pm 0,17$ nos schwannomas e de $1,78 \pm 0,11$ nos neurofibromas (Gráfico 2) (Figura 19).

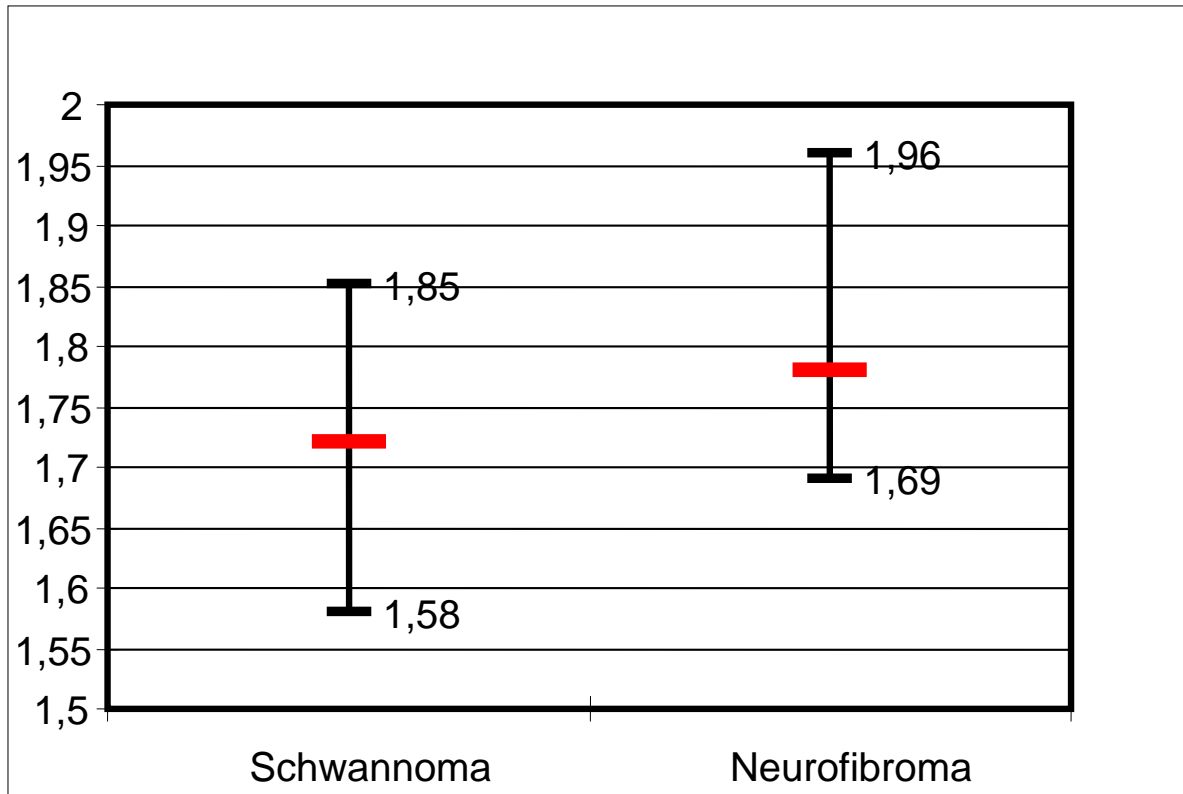


Gráfico 2 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Associação entre as neoplasias (neurofibroma e schwannoma) e a frequência de AgNOR. As linhas horizontais (vermelhas) representam a média de AgNOR em cada tumor.

4.6 Técnica do Azul de toluidina para quantificação de mastócitos nas neoplasias de SNP

Foram analisadas 8 neoplasias* 4 neurofibromas e 4 schwannomas. Nos nervos dos animais normais o número de mastócitos foi de 16 nos bovinos e de 3 em caninos. Os schwannomas não apresentaram uma grande variação na quantidade de mástocitos, com exceção de um tumor, média de $10 \pm 15,4$. Os neurofibromas apresentaram um grande número de mastócitos em média $38,75 \pm 30,4$. (Tabela 5) (Figura 20).

* O quinto neurofibroma mostrou-se inadequado para a realização da técnica.

Tabela 5 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Quantificação do número de mastócitos nos neurofibromas e schwannomas

Caso	Número de mastócitos	
	Schwannoma	Neurofibroma
V390-96/V01-90	33	37
V133-99/V318-94	2	82
V248-98(B)/V77-98	4	14
V208-04/V248-98(A)	1	22
Média	10	38,7
Desvio padrão	30,4	30,04

4.7 Imunoistoquímica

As células neoplásicas dos schwannomas e neurofibromas foram fortemente positivas para a vimentina (4/4 e 5/5) (Figuras 21 e 22) e para S100 (4/4 e 5/5) (Figuras 23 e 24), detectadas através da técnica de imunoistoquímica.

Com relação ao GFAP três schwannomas foram positivos (3/4) e um (1/4) não apresentou marcação. A marcação era difusa acentuada (1/3) ou multifocal aleatória (2/3) em pequenos grupos de células (Figura 25). Os neurofibromas não apresentaram marcação nas células neoplásicas. Somente as células de Schwann, que estavam presentes nos fascículos nervosos, foram marcadas (Figura 26).

Figura 8 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma localizado no plexo braquial de um canino. Ao corte, a neoplasia apresenta uma cor esbranquiçada homogênea de aspecto concêntrico.

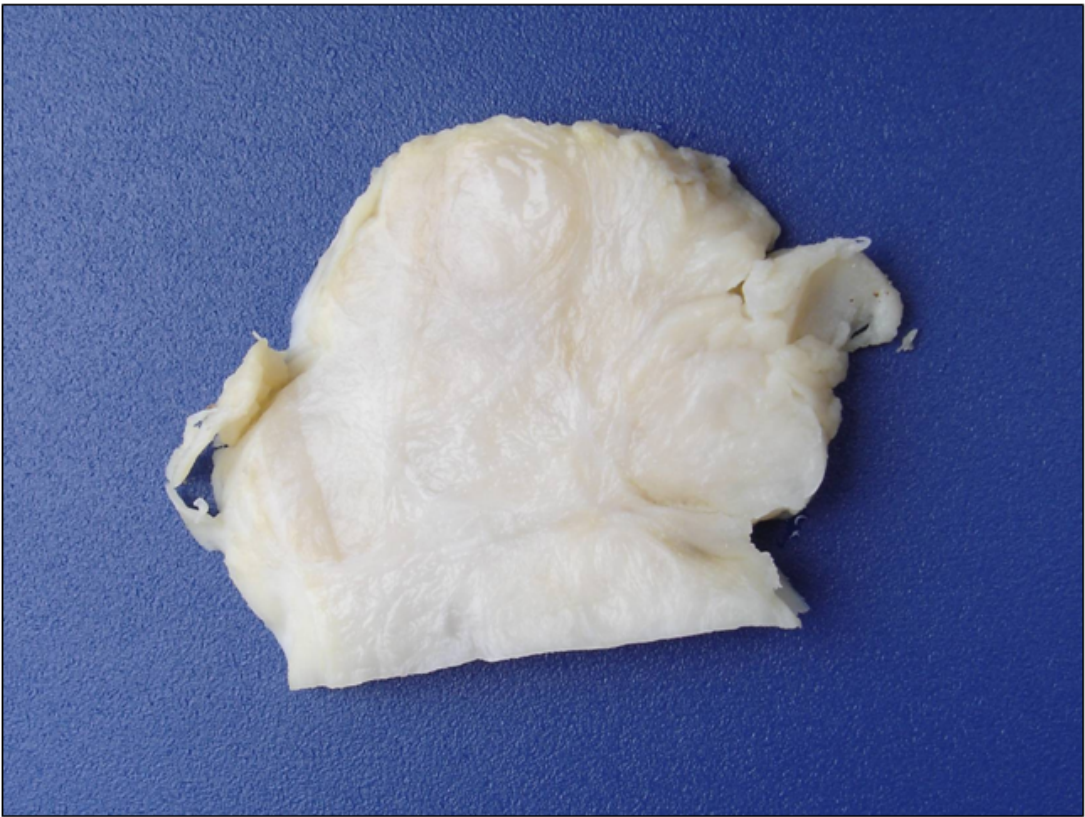


Figura 9 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma ocular de um canino. Observa-se uma proliferação neoplásica composta de células fusiformes que se arranjam em paliçada (padrão Antoni tipo A). H&E. Barra 50 μm . B. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Células de Schwann neoplásicas dispostas em vários sentidos. H&E. Barra 30 μm . C. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Há áreas pouco celulares onde as células se organizam numa textura frouxa, envoltas por uma matriz mixóide basofílica (padrão Antoni tipo B). H&E. Barra 30 μm .

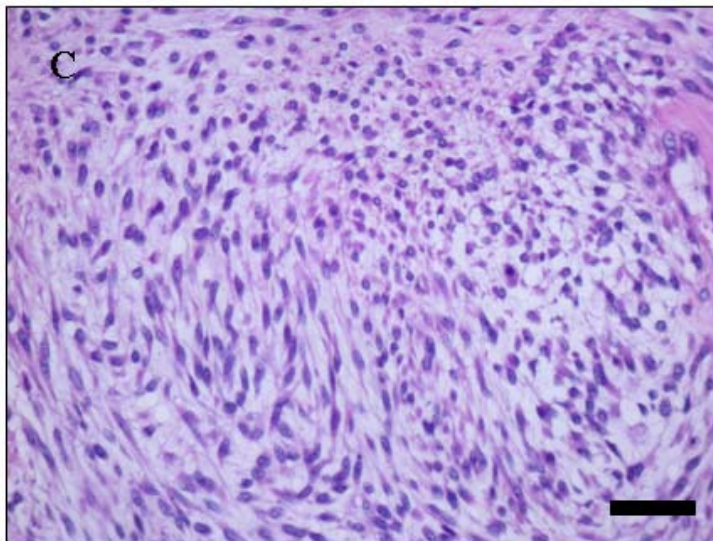
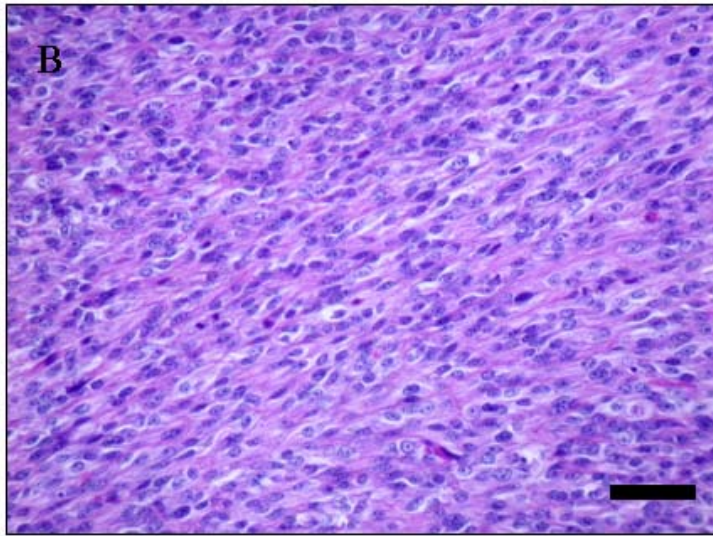
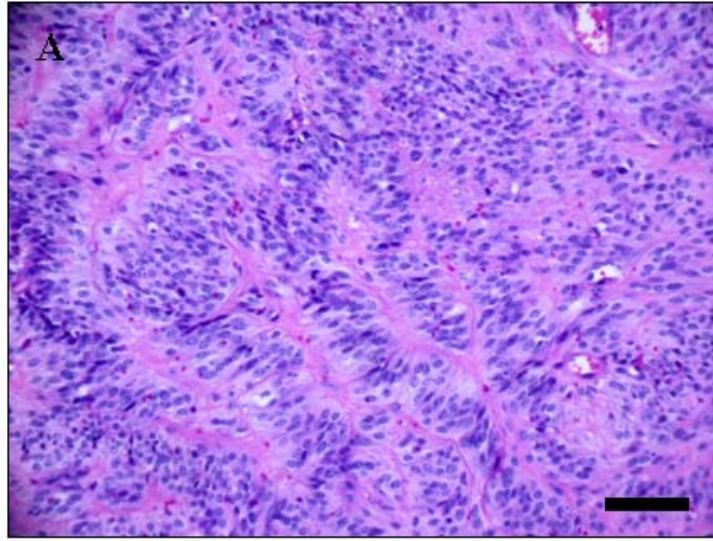


Figura 10 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observam-se pequenas ilhas de tecido ósseo envoltas por ninhos de células fusiformes neoplásicas (schwannoma com diferenciação óssea). H&E. Barra 30 μm .

Figura 11 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma, região cervical de um canino. Área focalmente extensa de hemorragia. H&E. Barra 50 μm .