

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 .

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 .

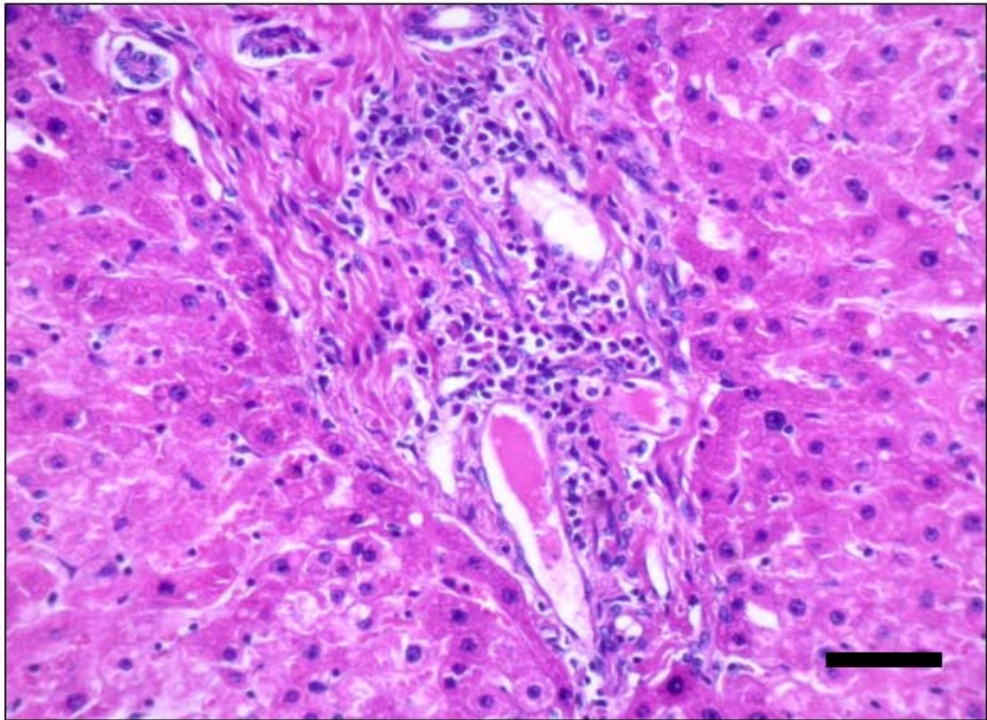
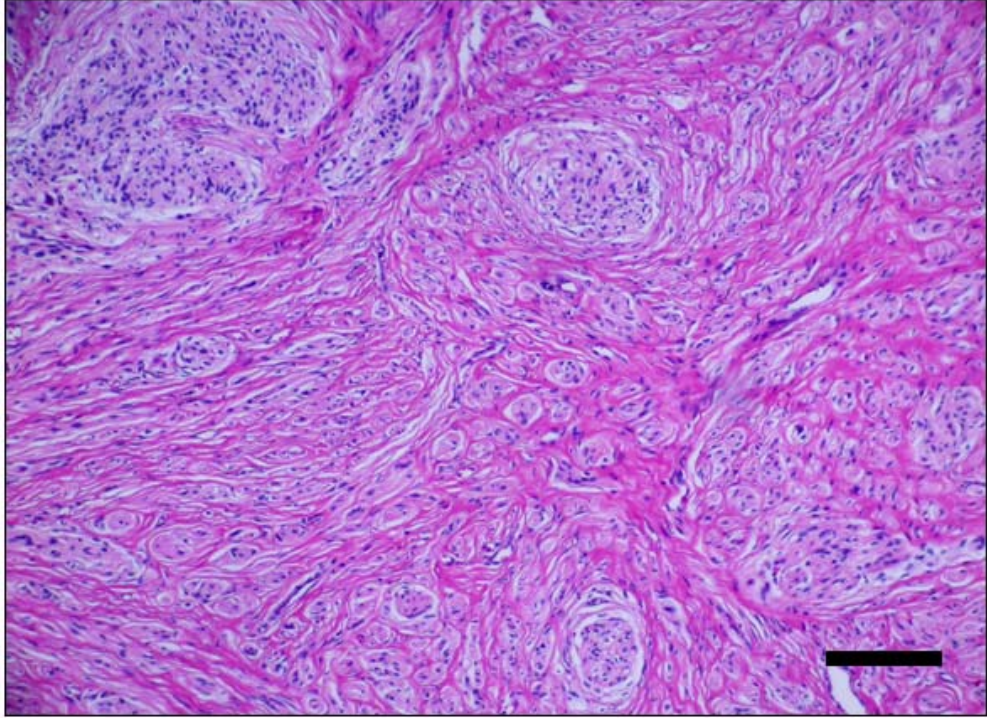


Figura 14 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, região cervical de um bovino. Infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário e neutrofílico moderado é observado entre as células neoplásicas. H&E. Barra 30 μm .

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 .

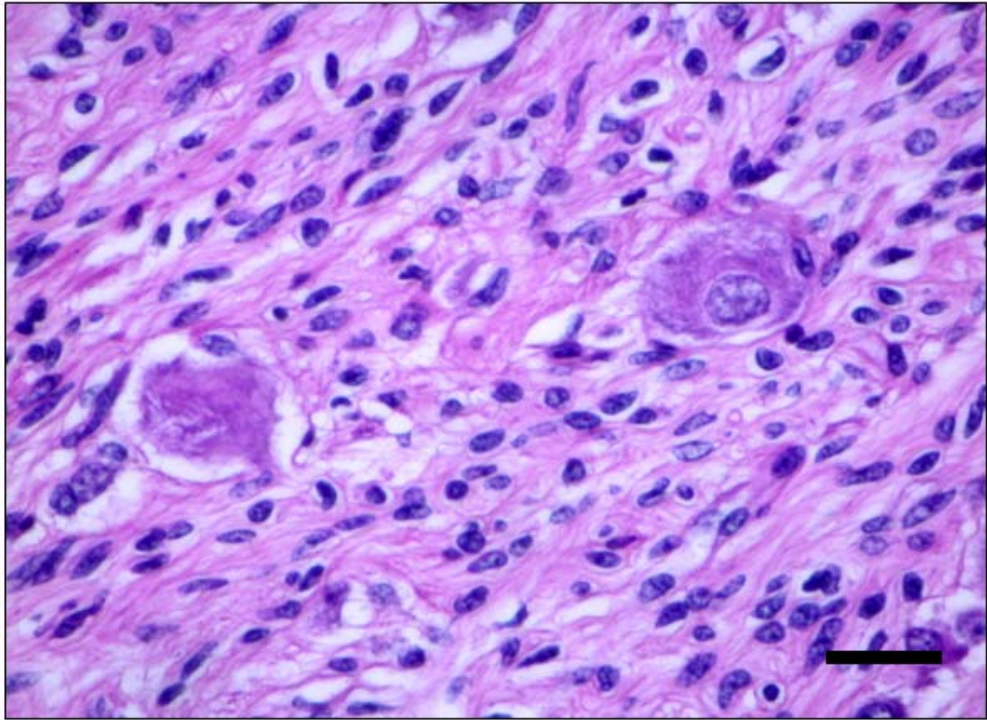
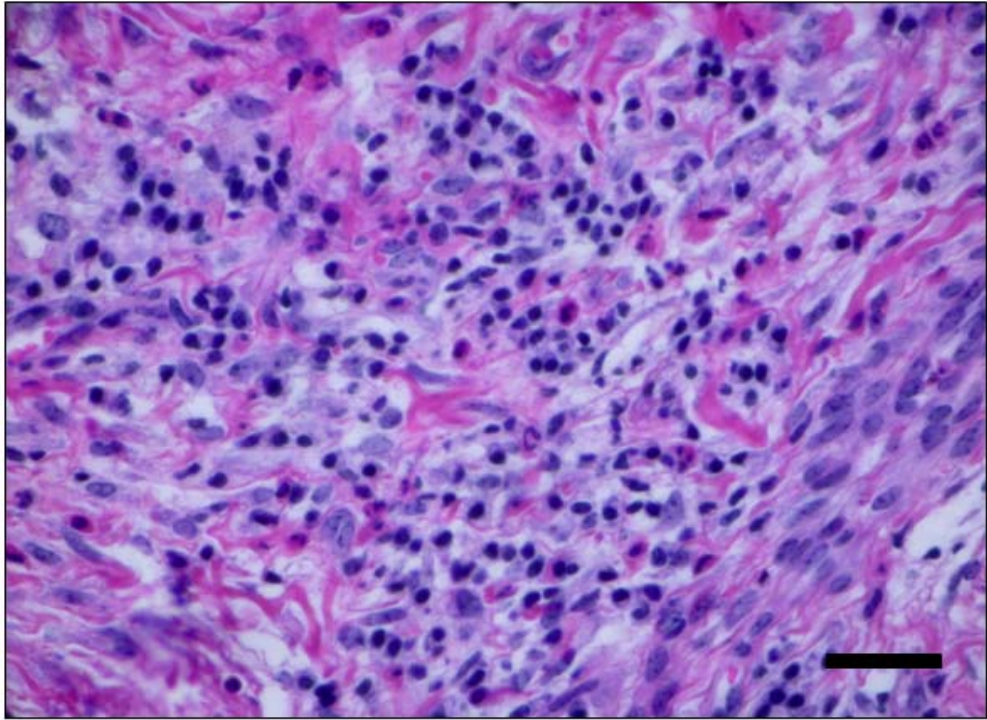


Figura 16 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma com diferenciação óssea, plexo braquial de um canino. O tecido ósseo está suavemente corado em azul. Tricrômico de Masson. Barra 50 μm . B. Neurofibroma, fígado de um bovino. Observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo ao redor dos nervos (perineuro). No endoneuro as fibras de tecido conjuntivo estão dispostas em pequenos feixes aleatórios. Tricrômico de Masson. Barra 50 μm .

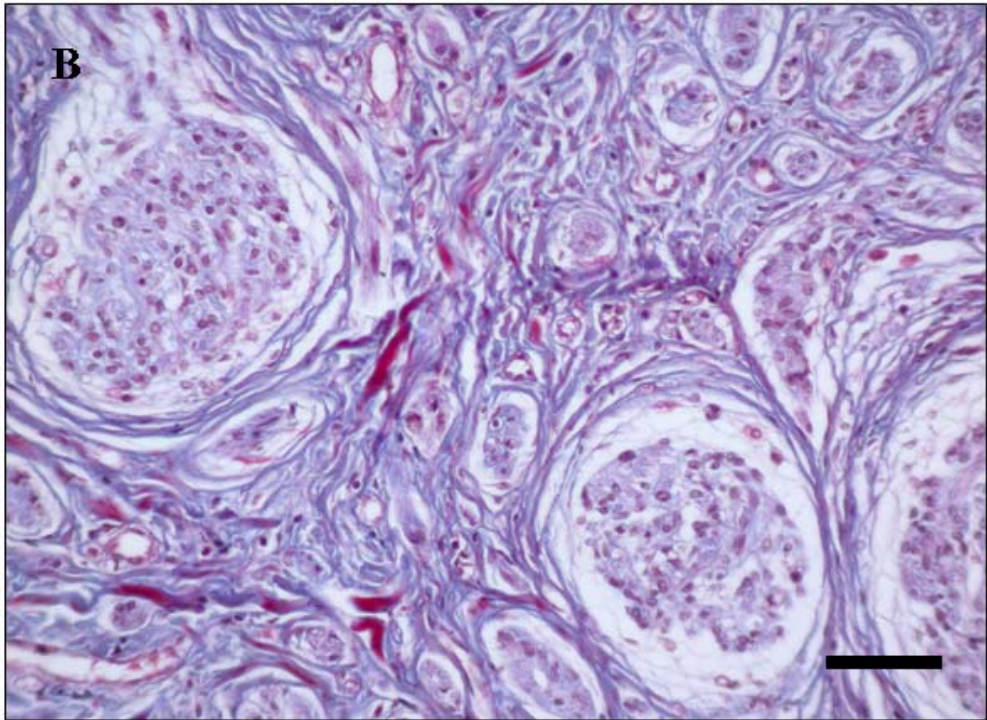
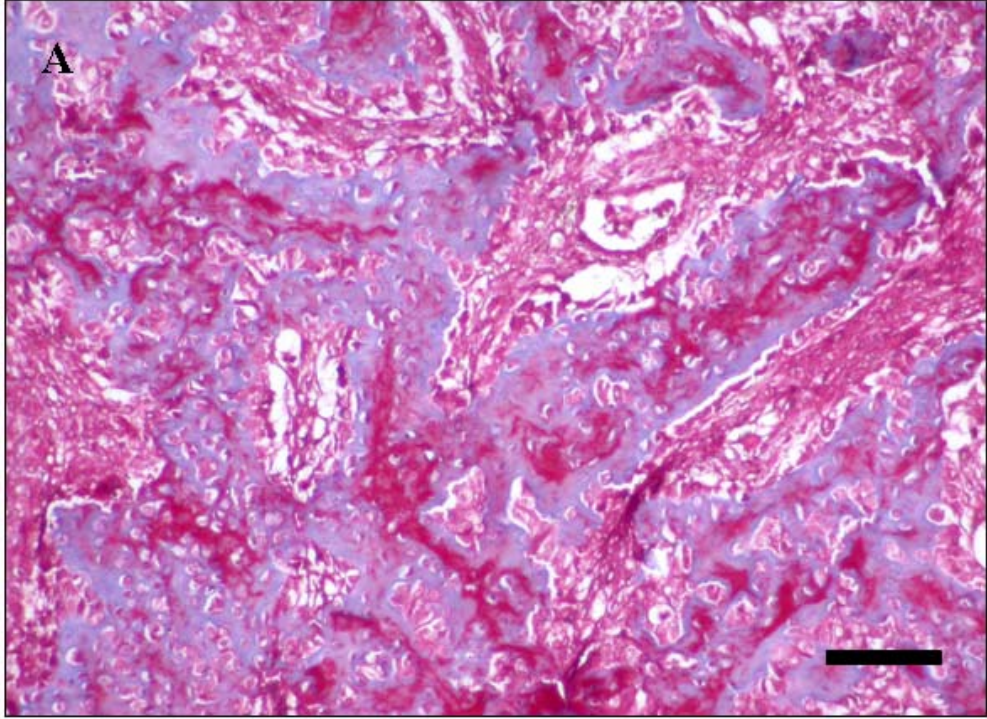


Figura 17 - Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma, região cervical de um canino. Há uma intensa proliferação de fibras grossas, vermelhas fortemente birrefringentes (colágeno tipo I) na cápsula da neoplasia. Picrosírius red. Barra 50 μ m. B. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observam-se filamentos finos e esverdeados, fracamente birrefringentes, (colágeno tipo III) entremeados às fibras de colágeno tipo I. Picrosírius red. Barra 30 μ m.

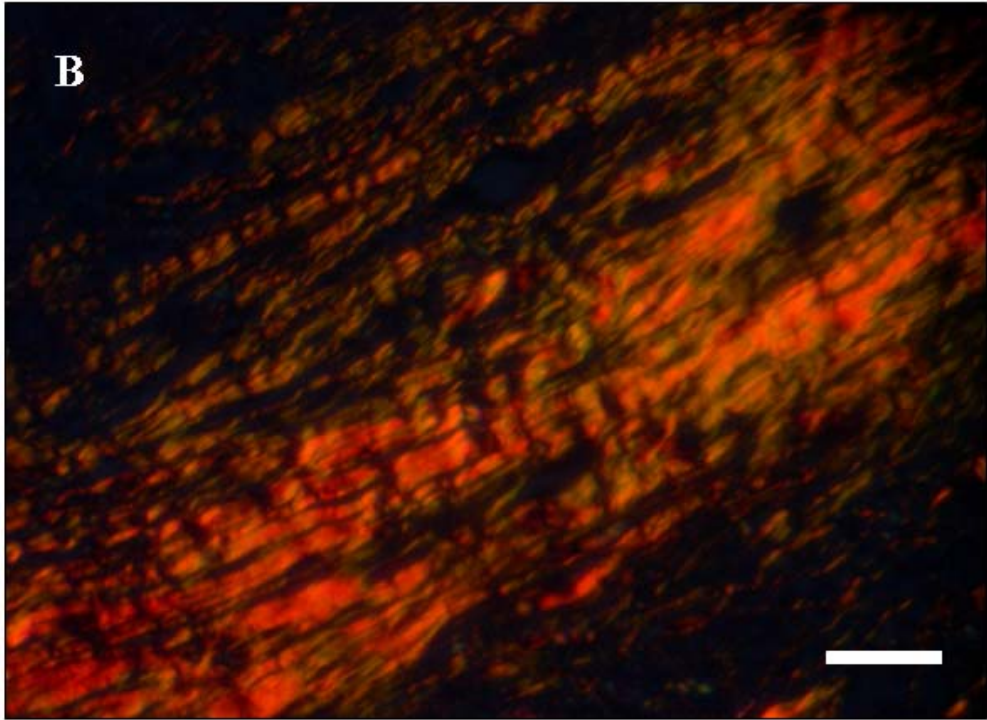
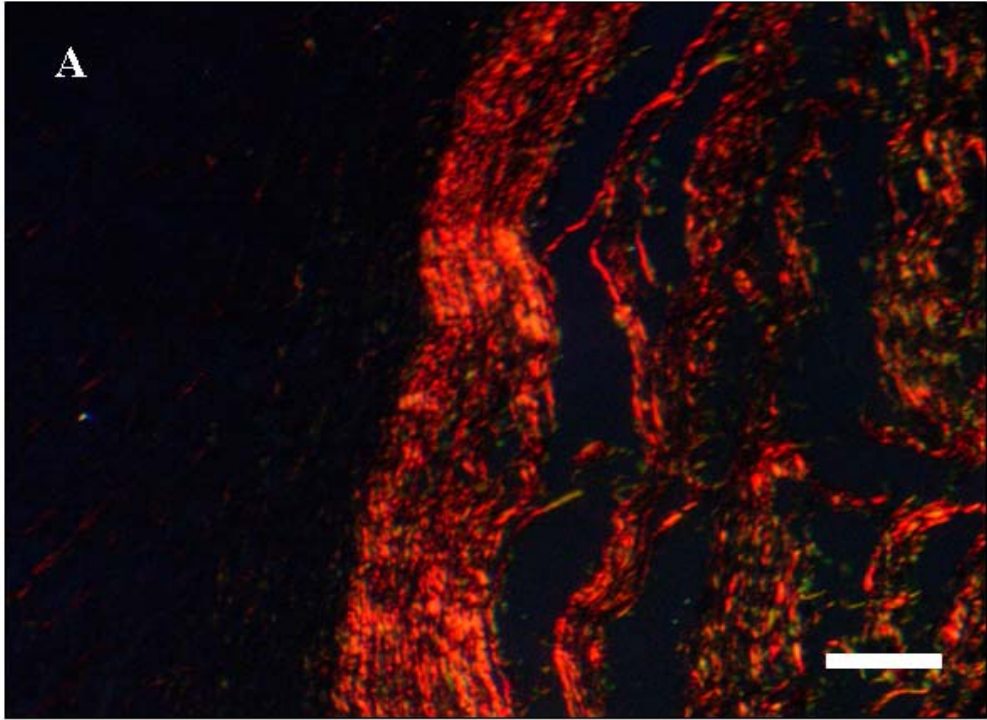


Figura 18 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Neurofibroma, região cervical de um bovino. Há grande quantidade de fibras vermelhas, grossas, fortemente birrefringentes (colágeno tipo I) no perineuro e no endoneuro. Picosírius red. Barra 50 μm . B. Neurofibroma, fígado de um bovino. Filamentos finos, esverdeados, fracamente birrefringentes (colágeno tipo III) são observados em grande quantidade entre fibras amarelas fortemente birrefringentes (colágeno tipo I). Picosírius red. Barra 50 μm .

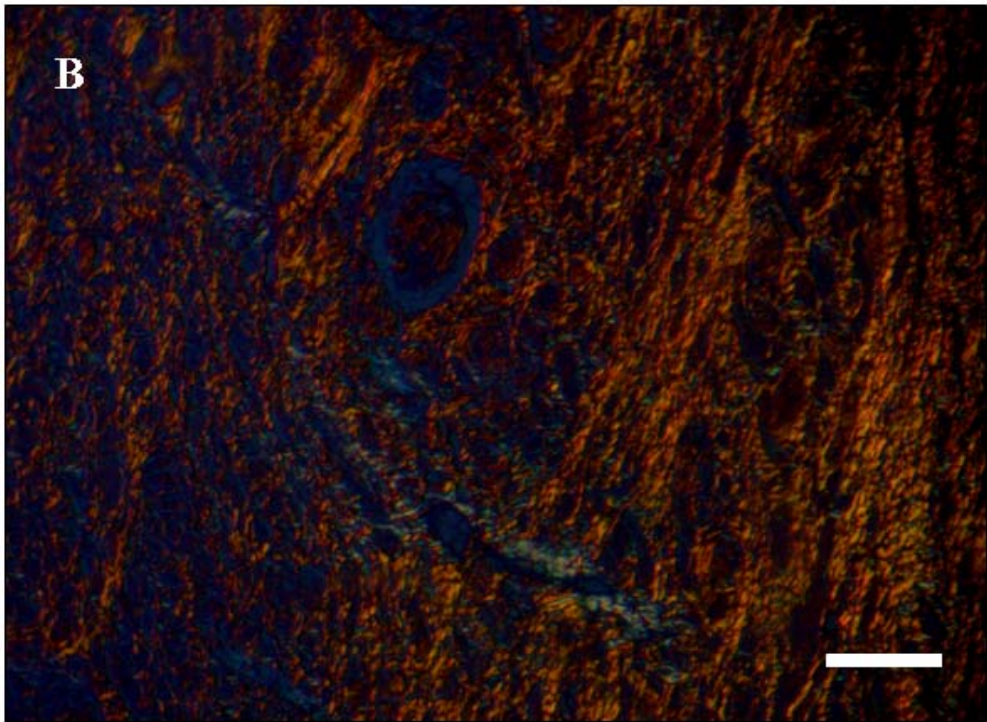
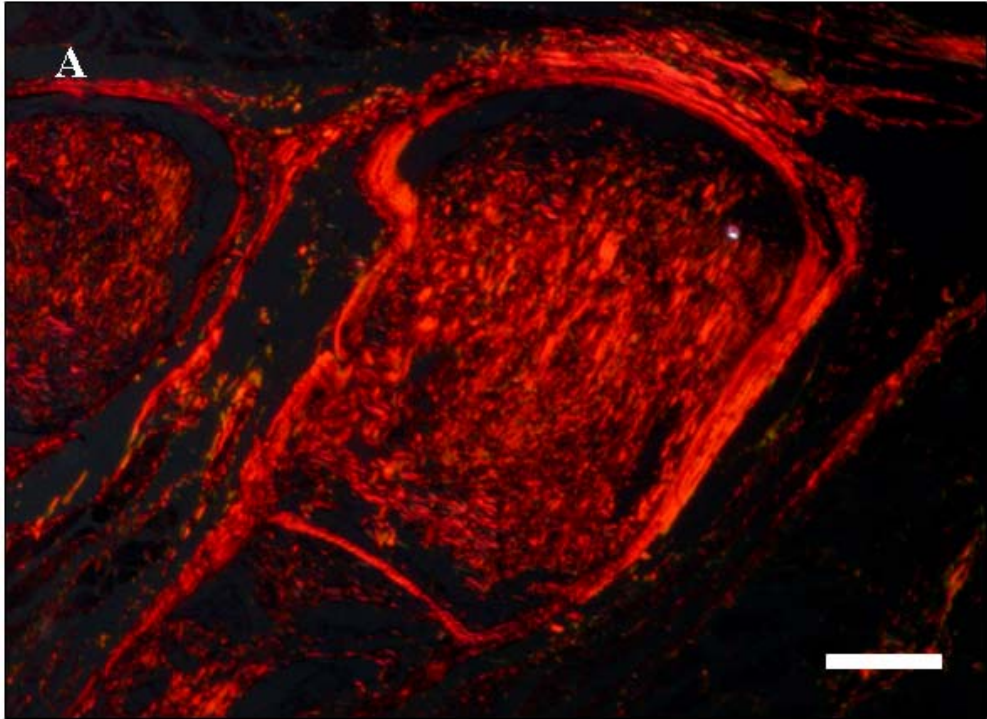


Figura 19 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Os pontos pretos representam as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR). A. Schwannoma bem diferenciado, região cervical de um canino (AgNOR=1,69). AgNOR. Barra 30 μ m. B. Schwannoma pouco diferenciado, plexo braquial de um canino (AgNOR=1,87). AgNOR. Barra 30 μ m. C. Neurofibroma bem diferenciado, região cervical de um bovino (AgNOR=1,69). AgNOR. Barra 30 μ m. D. Neurofibroma pouco diferenciado, fígado de um bovino (AgNOR=1,84). AgNOR. Barra 30 μ m.

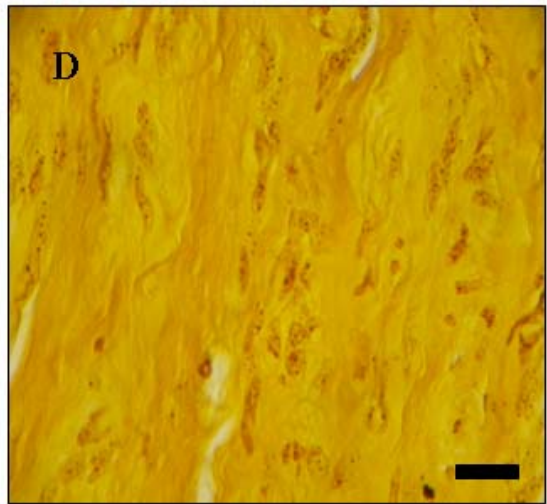
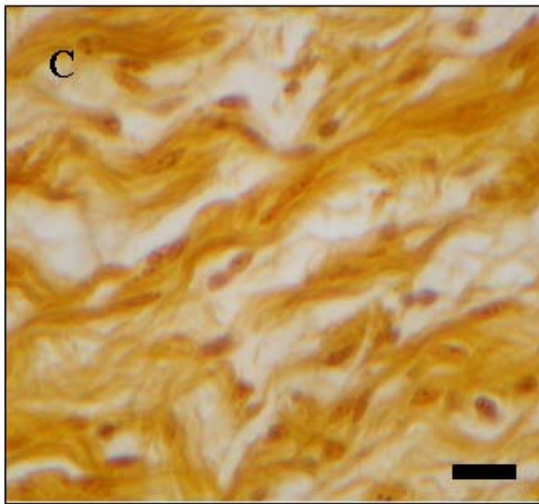
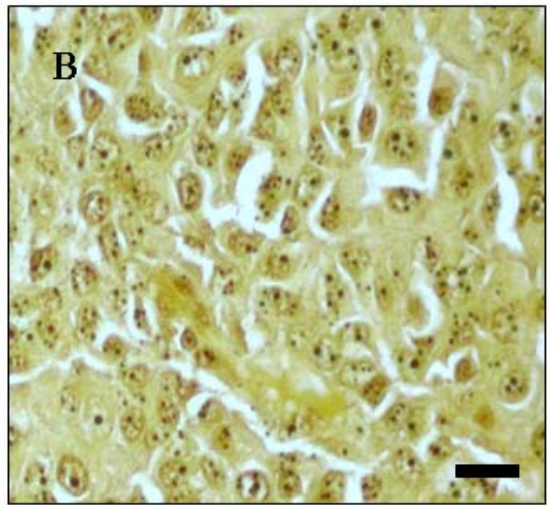
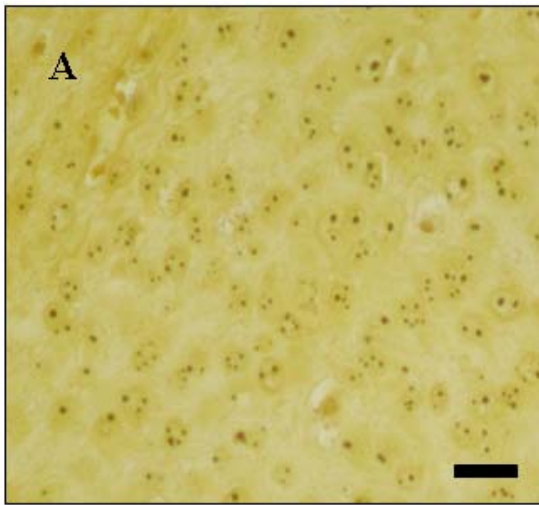


Figura 20 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Neurofibroma, região cervical de um bovino. No centro da imagem observa-se um grupo de mastócitos. Azul de toluidina. Barra 30 μm . B. Schwannoma, região cervical de um canino. Raros mastócitos são detectados no tumor. Azul de toluidina. Barra 30 μm .

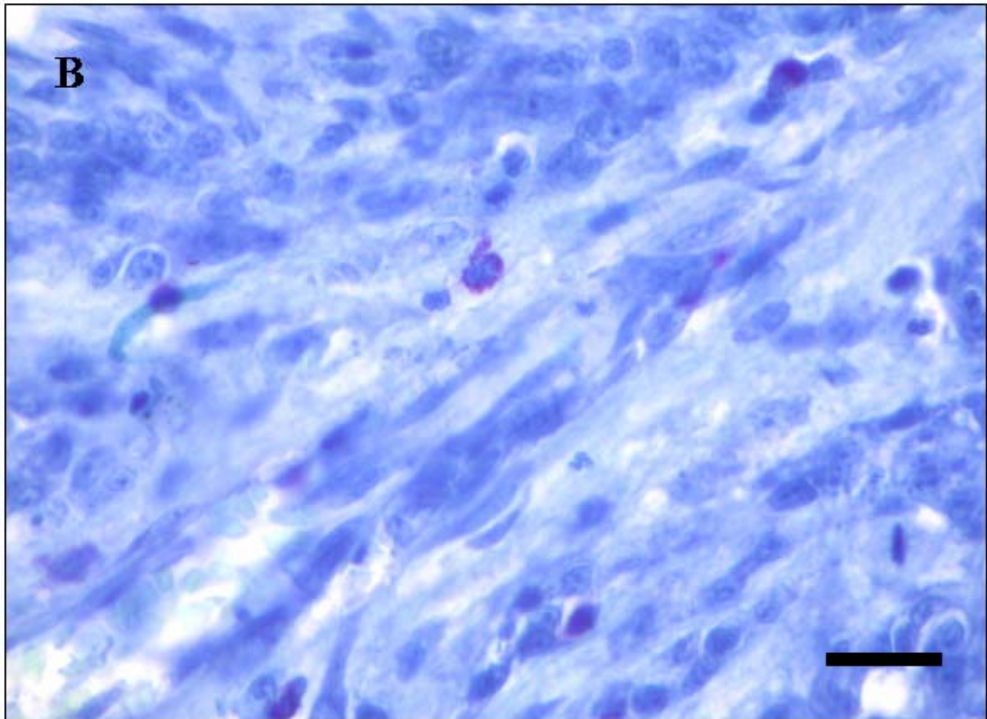
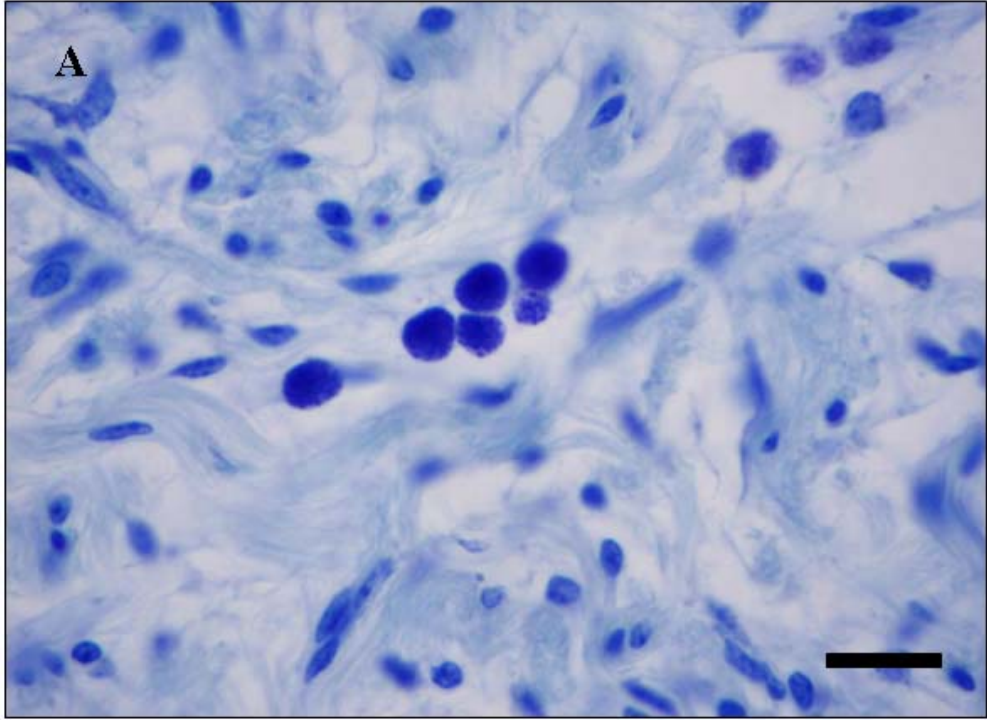


Figura 21 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Controle negativo, anticorpo anti-vimentina, não há marcação nas células neoplásicas. Imunoistoquímica. Barra 50 μm . B e C. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observa-se forte marcação do citoplasma das células e seus prolongamentos pelo anticorpo anti-vimentina. Imunoistoquímica. Barra 30 μm .

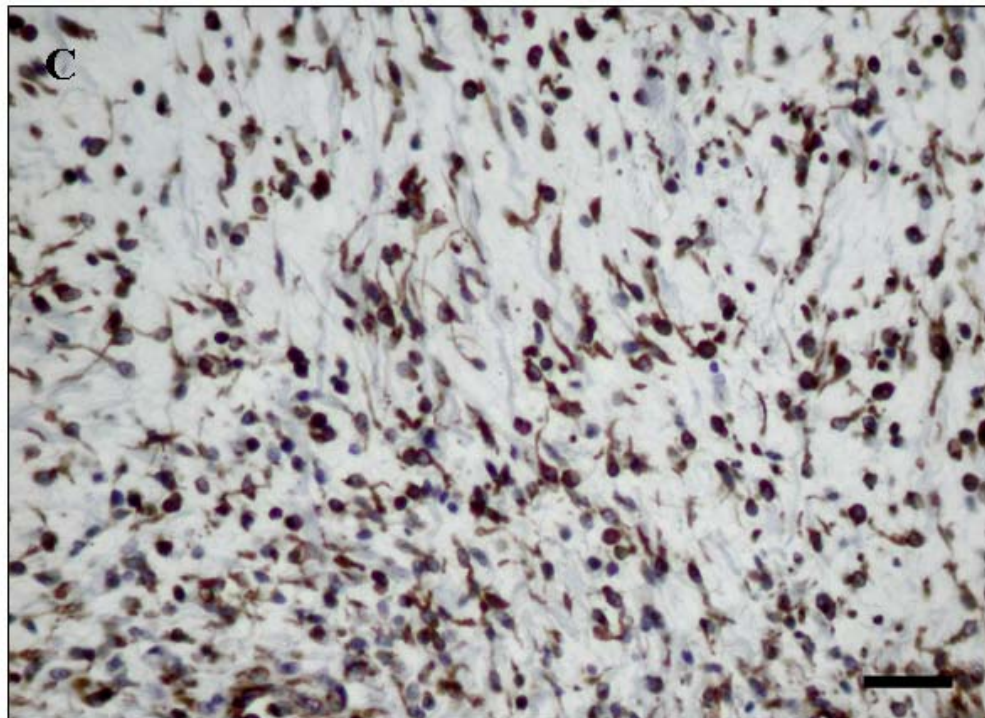
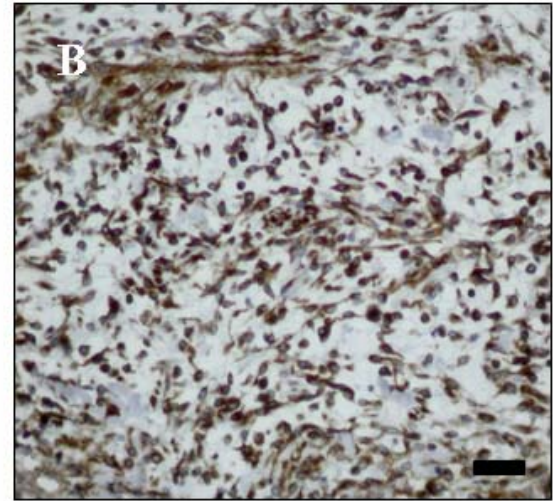
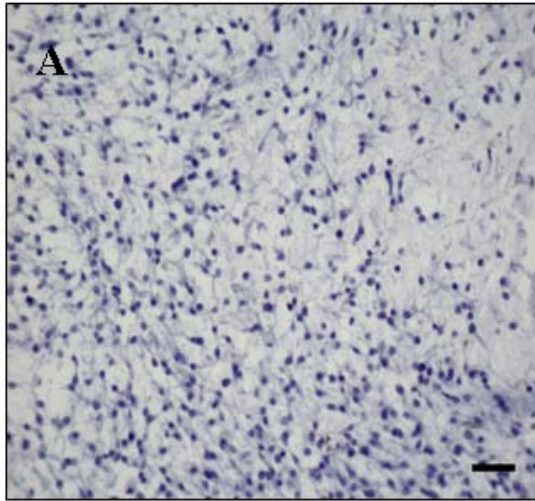


Figura 22 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Neurofibroma, língua de um bovino. As células neoplásicas fusiformes do neurofibroma estão imunomarcadas pelo anticorpo anti-vimentina. Observe a ausência de marcação nos linfócitos presentes entre as células neoplásicas. Imunoistoquímica. Barra 30 μm .

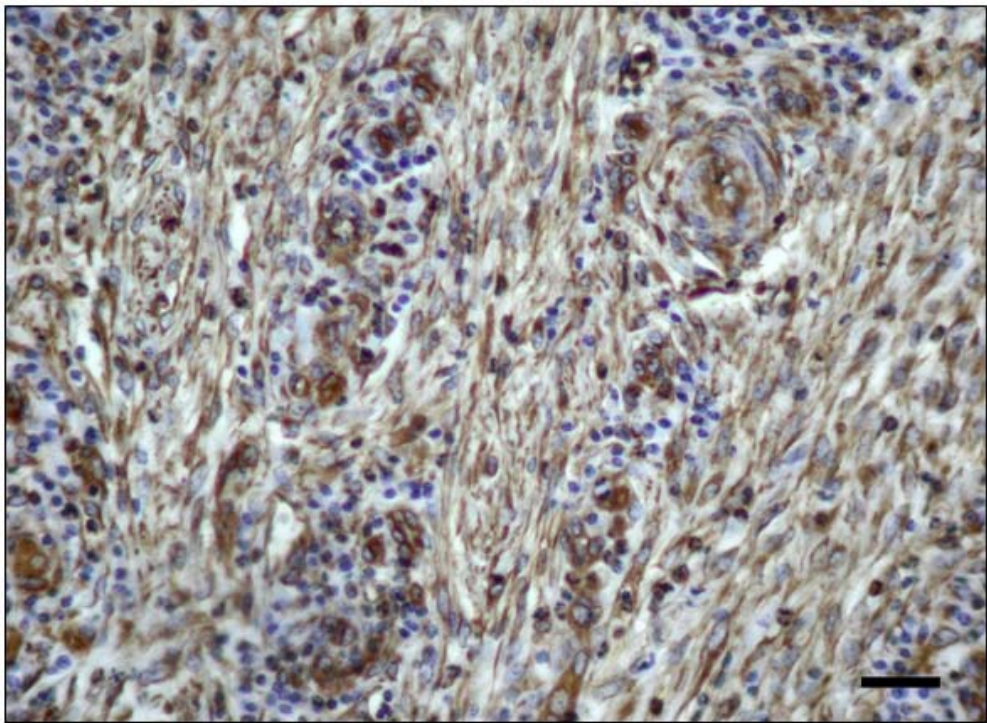


Figura 23 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Controle negativo, anticorpo anti-S100, não há marcação nas células neoplásicas e nos osteócitos. Imunoistoquímica. Barra 50 μm . B. Schwannoma, plexo braquial de um canino. Observe a forte marcação 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

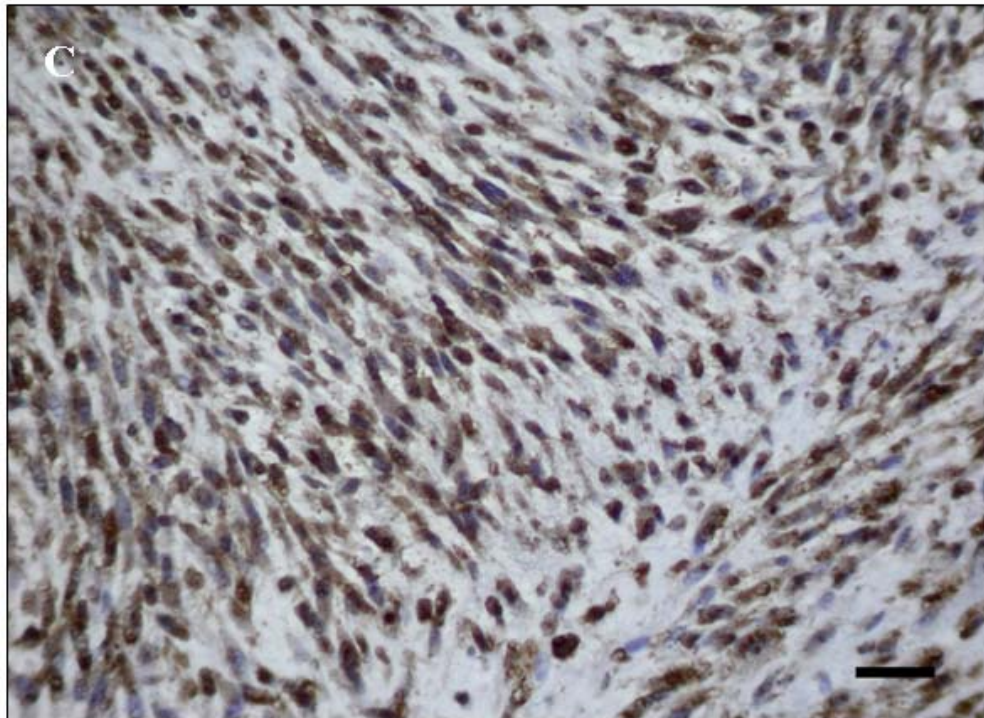
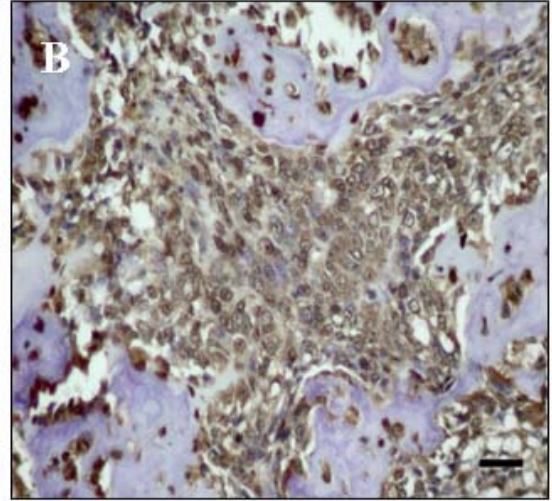
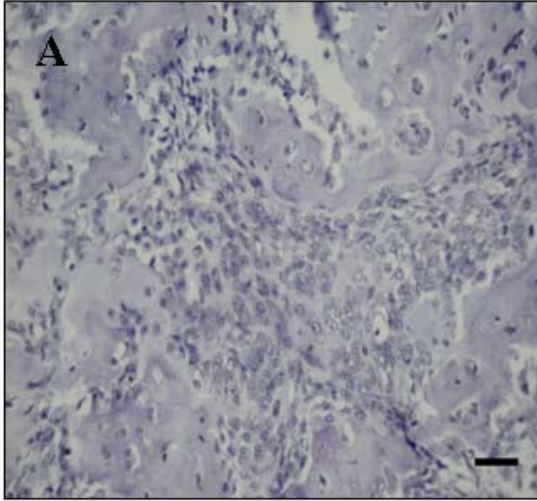


Figura 24 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. A. Neurofibroma, fígado de um bovino. As células neoplásicas estão marcadas pelo anticorpo anti-S100. Observe que as células de Schwann presentes no fascículo nervoso também apresentam imunomarcagem. Imunoistoquímica. Barra 50 μm . B. Neurofibroma, região cervical de um bovino. As células neoplásicas do neurofibroma estão intensamente marcadas pelo anticorpo anti S100. Imunoistoquímica. Barra 30 μm .

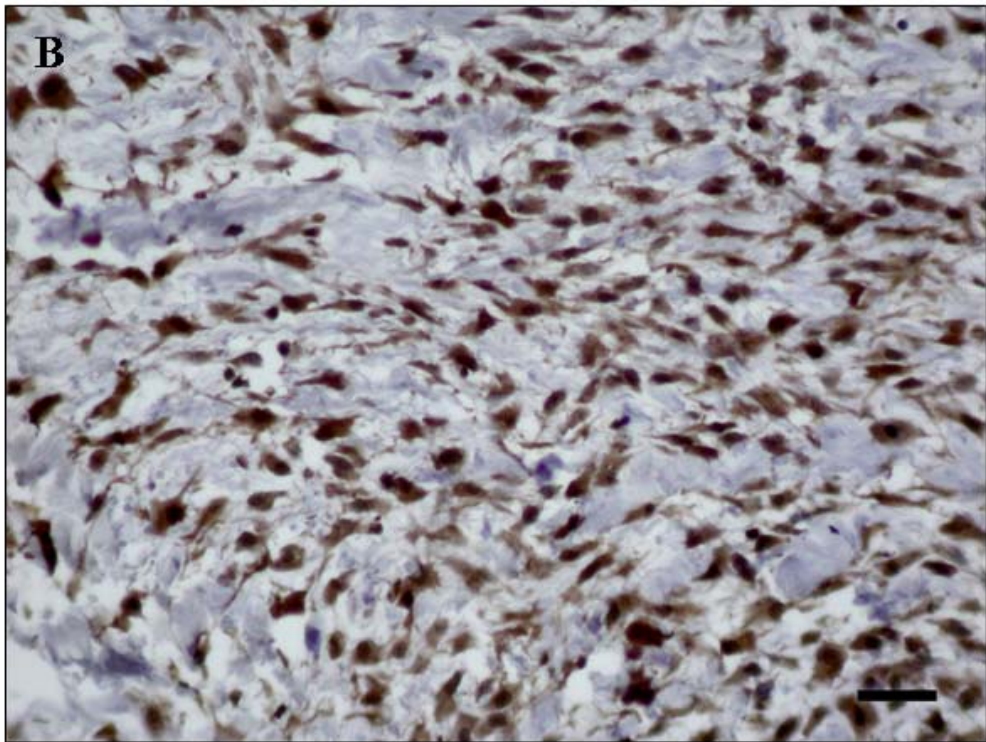
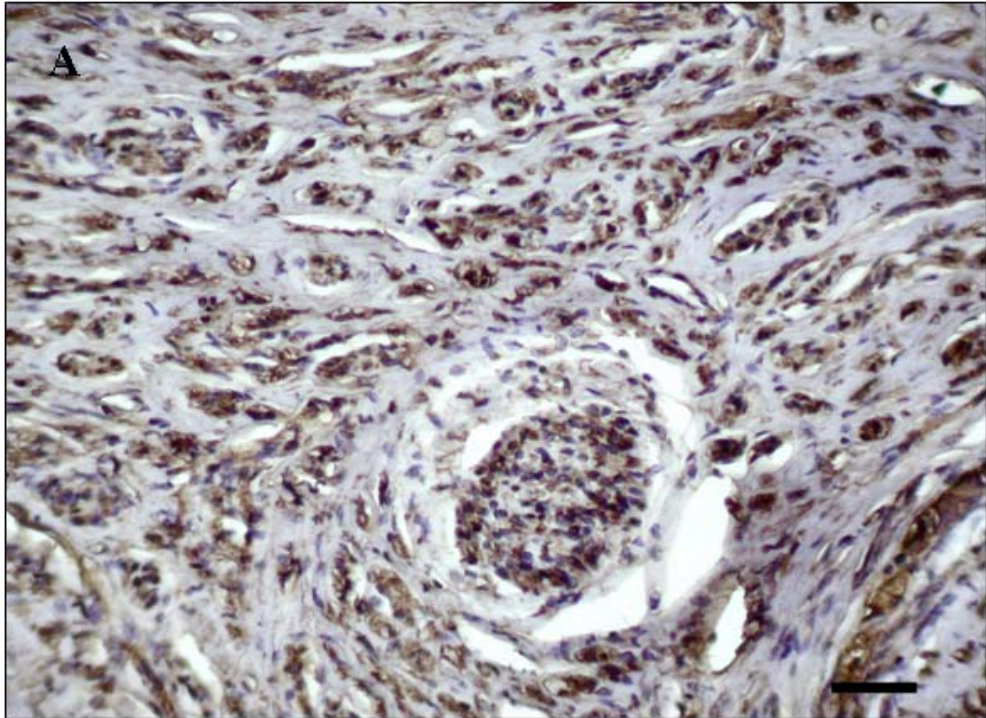
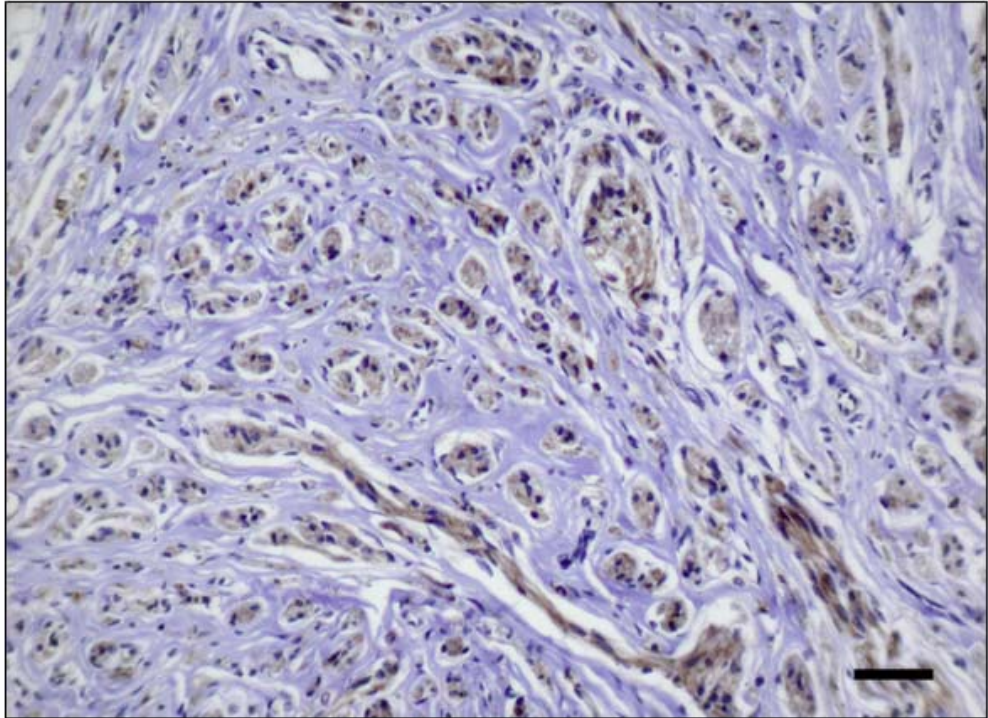
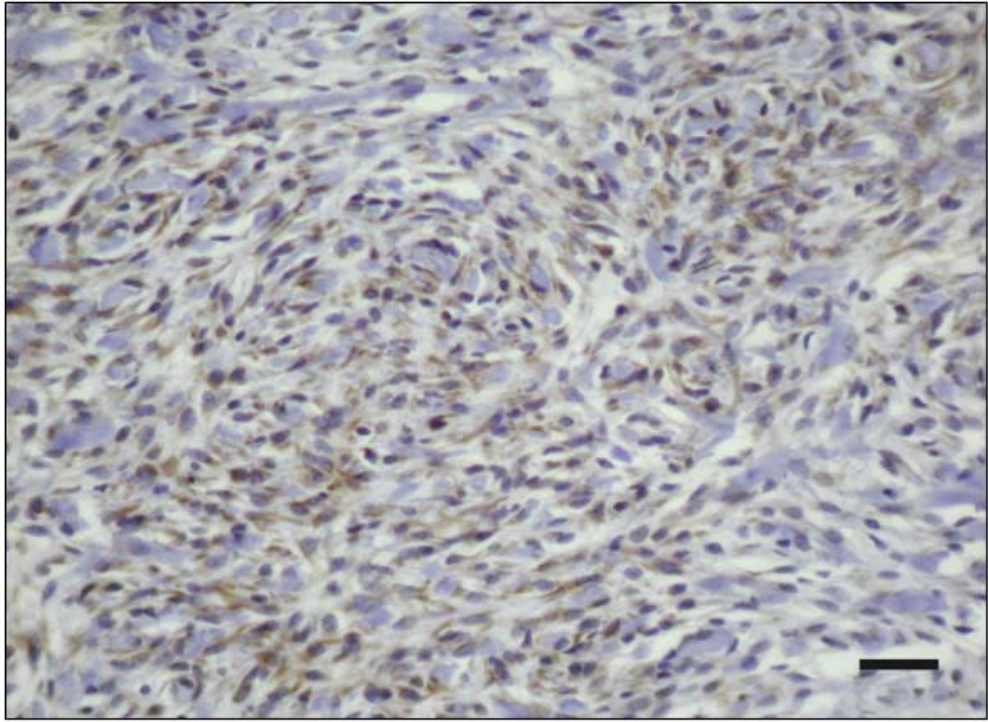


Figura 25 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Schwannoma, região cervical de um canino. Há uma marcação irregular do citoplasma das células neoplásicas pelo anticorpo anti-GFAP. Imunoistoquímica. Barra 30 μm .

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 .



5 DISCUSSÃO

A revisão realizada sobre os componentes do SNP permitiu observar que todos os componentes são igualmente importantes nas patologias do sistema. A origem das células a partir da crista neural (células de Schwann) e de tecidos mesenquimais (fibroblastos e mastócitos) tornam complexa a resposta tecidual às agressões degenerativas, inflamatórias e neoplásicas (CAVANAGH, 1990). O diagnóstico acurado dos processos deletérios ao SNP inclui o conhecimento profundo do tecido, epidemiologia, métodos histoquímicos e imunoistoquímicos, todos eles empregados no estudo das neoplasias descritas nesta investigação.

Apesar das desordens neurológicas nos animais serem conhecidas desde o século dezessete, os estudos em neuropatologia são recentes. A consolidação da neurologia e neuropatologia humana e veterinária somente foi estabelecida após a segunda guerra mundial com a descoberta de fatores de crescimento neurais (SUMMERS *et al.*, 1995).

As patologias que envolvem o SNP são conhecidas em diversas espécies (SUMMERS *et al.*, 1995). Dentre elas, as neoplasias destacam-se pela diversidade e características de malignidade nos animais domésticos. Neoplasias primárias dos nervos periféricos são raras nos animais domésticos e nos seres humanos (WOODRUFF *et al.*, 2000; LeCOUTER, 2001). De acordo com os dados obtidos no levantamento realizado nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, somente doze casos foram diagnosticados nos quarenta anos revisados (1964-2004).

As bainhas de tecido conjuntivo dos nervos periféricos são formadas por diversos tipos celulares. Devido à essa grande diversidade observa-se a formação de diferentes neoplasias: schwannomas, neurofibromas, perineuromas e tumores malignos de bainha de nervo periférico (WOODRUFF *et al.*, 2000), sendo que dentre essas as mais freqüentes são os schwannomas e os neurofibromas (KOESTNER & HIGGINS, 2002). Existem grandes divergências no que se refere à nomenclatura desses tumores, pois essas designações freqüentemente não são claras na medicina veterinária (BROWER *et al.*, 2005).

Dos casos levantados, sete foram schwannomas e cinco neurofibromas. A maior ocorrência dos schwannomas em caninos e de neurofibromas em bovinos e caninos concordou com as informações epidemiológicas sobre essas neoplasias (PUMAROLA *et al.*,

1996; KOESTNER & HIGGINS, 2002), sendo os neurofibromas menos freqüentes nos caninos (KOESTNER & JONES, 1997).

Os sinais clínicos dos schwannomas eram de deficiência neurológica e postural quando afetavam o plexo braquial, além de sensibilidade superficial e profunda diminuída ou ausente. A dispnéia foi característica no caso de metástase pulmonar, e a cegueira e incoordenação motora foram presentes quando havia envolvimento do nervo trigêmeo. Sinais descritos por Pumarola *et al.*, (1996) como depressão, desorientação, atrofia muscular não foram observados nos animais afetados. Os neurofibromas provocavam dor local intensa semelhantemente ao que foi observado por Koestner & Higgins (2001) que descrevem hiperestesia contínua e oscilante na região afetada pelo tumor.

De acordo com Cockerell & Cooper (2002), embora a idade não seja em si própria um fator direto no aparecimento de tumores, os pequenos animais que vivem mais tempo e são mais expostos aos efeitos acumulativos dos carcinógenos do ambiente, tendem a ter um índice mais elevado de neoplasias, o que corrobora a tendência determinada epidemiologicamente pelos dados mostrados nos resultados.

A idade média dos cães com schwannomas foi de 7,8 anos, sendo que essa neoplasia foi mais diagnosticada em cães entre 6 e 10 anos. Esses resultados foram similares aos apresentados por Lecouter (2001) que analisou 43 schwannomas em cães entre 5 e 12 anos com idade média de 8 anos. Esses dados sugerem que os schwannomas são mais freqüentes em caninos adultos e idosos.

Nos schwannomas, a proporção de machos (4/7) e fêmeas (3/7) foi semelhante. Esse resultado vai ao encontro de diversos autores que afirmam que tanto os schwannomas como os neurofibromas não têm predisposição sexual (WOODRUFF *et al.*, 2000; LeCOUTER, 2001; KOESTNER & HIGGINS, 2002).

Não foi possível estabelecer a média de idade e o sexo dos animais com neurofibroma devido à falta de informações obtidas nos protocolos, mas, ao contrário do que ocorre com os schwannomas, parece não haver predisposição etária para essas neoplasias (WOODRUFF *et al.*, 2000).

Segundo vários autores (SUMMERS *et al.*, 1995; LECOUTER, 2001; KOESTNER & HIGGINS 2002) não há predileção racial para as neoplasias de SNP. Devido ao reduzido número de neoplasias encontradas nos nossos arquivos não houve como estabelecer esse parâmetro.

Quanto à localização, os schwannomas foram mais freqüentes nos membros (42,8%), afetando nervos distais. Lecouter (2001) sugeriu que essas neoplasias são mais

comuns no canal vertebral, diferentemente de Koestner & Higgins (2002) que observaram uma maior frequência de schwannomas nos nervos que formam o plexo braquial, lombossacral e finalmente nos nervos periféricos distais. Foi observada metástase pulmonar de um schwannoma localizado no membro anterior esquerdo. As neoplasias do SNP tendem a se disseminar ao longo da trajetória de um nervo e quando se tornam muito agressivas produzem metástases em sítios distantes. É frequente a invasão medular e metástase pulmonar nos schwannomas pouco diferenciados, principalmente quando essas neoplasias se localizam no plexo braquial (KOESTNER & HIGGINS, 2002) ou nos nervos do sistema nervoso simpático (LeCOUTER, 2001).

Os neurofibromas tiveram uma distribuição ampla, sem predileção por um sítio definido. Koestner & Jones (1997) citam que o neurofibroma tem uma disposição semelhante à observada nos schwannomas, localizando-se ao longo do curso de nervos de pequeno e grande calibre. Em bovinos, essas neoplasias tendem a se localizar no miocárdio, às vezes com múltiplas massas num mesmo órgão. Em caso de neurofibromatose bovina, múltiplos neurofibromas de até 10 cm de diâmetro são vistos em nervos das cavidades abdominal e torácica comprimindo vasos e órgãos (GOODMAN *et al.*, 1955). A neurofibromatose é descrita em humanos onde há uma forte correlação com uma mutação no gene NF1 que induz a formação de múltiplos neurofibromas no organismo (ZHU *et al.*, 2002). A elucidação para o aparecimento de neurofibromas solitários ainda não foi estabelecida, mas acredita-se que a similaridade entre os neurofibromas esporádicos e a neurofibromatose indica um claro envolvimento do gene NF1 (WOODRUFF *et al.*, 2000).

Macroscopicamente os schwannomas se caracterizaram como massas ovais, firmes brancas de até 7 cm de diâmetro, bem circunscritas. Ao corte tinham aparência branca ou acinzentada, homogênea e brilhante com áreas multifocais de necrose. As neoplasias eram invasivas desarranjando a arquitetura do tecido de origem, condizendo com aspectos já citados anteriormente (PATNAIK *et al.*, 1984; GRAÇA *et al.*, 1998; SUMMERS *et al.*, 1995; WOODRUFF *et al.*, 2000; LeCOUTER, 2001; KOESTNER & HIGGINS, 2002; CHIJIWA *et al.*, 2004). Woodruff *et al.* (2002) citam diferentes padrões macroscópicos dos neurofibromas que variam com a localização anatômica do tumor, mas correlação semelhante não foi observada nos casos analisados.

O grau histológico é um parâmetro importante para determinar o prognóstico e a escolha do tratamento pelo clínico (LeCOUTER, 2001). Os nossos achados histológicos foram característicos e similares aos de investigações anteriores (PATNAIK *et al.*, 1984; GRAÇA *et al.*, 1998; SUMMERS *et al.*, 1995; WOODRUFF *et al.*, 2000; LeCOUTER, 2001;

KOESTNER & HIGGINS, 2002; CHIJIWA *et al.*, 2004). Nos schwannomas era freqüente a observação de células fusiformes que se arranjavam em ninhos e feixes aleatórios que por vezes formavam paliçadas (Antoni tipo A) ao contrário do que citam Koestner & Higgins, (2002) que em cães os padrões de paliçada ou de espinha de peixe com orientação nuclear são muito incomuns.

Havia um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal moderado. Em alguns casos infiltrados semelhantes eram observados no tecido adjacente à neoplasia. Acredita-se que células tumorais podem ser reconhecidas pelo sistema imune devido à expressão de antígenos específicos. Esses antígenos são produzidos durante a mutação dos genes celulares, essas mutações produzem proteínas anormais que acabam sendo expressas na membrana plasmática induzindo uma resposta imune mononuclear (CULLEN *et al.*, 2002).

Uma das neoplasias apresentou diferenciação óssea. Além desse padrão os schwannomas também podem apresentar focos únicos ou múltiplos de diferenciação cartilaginosa, mucóide, glandular, melanótica e granular (PATNAIK *et al.*, 1984; KUWAMURA *et al.*, 1998; KOESTNER & HIGGINS, 2002; CHIJIWA *et al.*, 2004). As células migratórias da crista neural podem diferenciar-se não somente em melanócitos, células de Schwann e células glanglionares, mas também em células da leptomeninge e algumas células mesenquimais que contribuem para a formação de músculos, ossos e cartilagens da região da cabeça e do pescoço (SHAN *et al.*, 1994; CHIJIWA *et al.*, 2004). Essas diferenciações celulares divergentes explicam o porquê da diferenciação óssea observada em um dos casos diagnosticados. Em alguns casos, estabelecer o diagnóstico diferencial de schwannoma e de outras neoplasias que se originam das mesmas células migratórias depende somente de estudos imunoistoquímicos (CHERNIER & DORE, 1999).

Outras alterações de necrose, hemorragia e trombos foram abundantes em quase todos os schwannomas bem como alterações vasculares caracterizadas por engrossamento da parede do vaso, hialinização, dilatação de vasos sangüíneos e hemorragias, ao redor de pequenas veias ou artérias, que são comuns nos schwannomas (WOODRUFF *et al.*, 2000).

Os neurofibromas eram compostos por células fusiformes com núcleo ovóide ou fusiforme levemente curvado. As células neoplásicas se multiplicavam a partir do perineuro de axônios que sempre eram presentes. O pleomorfismo nuclear variava de leve a moderado. Os processos celulares eram finos e as células tumorais envoltas por abundantes fibras colágenas. O citoplasma era eosinofílico, escasso e indistinto. Os melanócitos, que são freqüentes nessas neoplasias, (WOODRUFF *et al.*, 2002; USHIGONE *et al.*, 1986) estavam ausentes.

O tecido conjuntivo que forma as bainhas dos nervos periféricos é composto por células de Schwann, células perineurais e fibroblastos além de outros componentes estruturais (ZAMECNIK & MICHAL, 2001). Dentre esses os fibroblastos estão presentes no perineuro, epineuro e endoneuro em quantidades variáveis assumindo várias funções como a formação de uma barreira sangue-nervo (CAVANAGH, 1990). Devido à sua grande distribuição sabe-se que os fibroblastos acabam constituindo os tumores do SNP como um componente neoplásico ou não (ZAMECNICK & MICHAL, 2001).

O tecido conjuntivo foi mais proeminente nos neurofibromas do que nos schwannomas. Essa diferença na quantidade de tecido conjuntivo expresso por cada tumor pode ser explicada pelos componentes celulares que formam os tumores. Sabe-se que os schwannomas são compostos unicamente por células de Schwann ao contrário dos neurofibromas que são formados por uma grande variedade de tipos celulares incluindo fibroblastos e células perineurais (HIROSE *et al.*, 1998). O schwannoma com diferenciação óssea apresentou uma leve coloração azul no tecido ósseo devido a presença de fibras colágenas tipo IV que são características deste tecido.

O colágeno constitui uma família de proteínas alongadas que formam fibras. A distribuição de cada tipo de colágeno está diretamente ligada ao tipo de tecido e a localização anatômica do mesmo. A técnica do Picrosirius (MONTES & JUNQUEIRA, 1991; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000) permitiu qualificar os tipos de colágeno presentes nas neoplasias analisadas.

Os schwannomas apresentaram moderada quantidade de fibras colágenas tipo I e poucas fibras de colágeno tipo III. A distribuição do colágeno tipo I nos neurofibromas era mais intensa e o colágeno tipo III estava presente em grande quantidade entre as células tumorais e entre as fibras de colágeno tipo I. Acredita-se que a presença de colágenos tipo I e III e a ausência dos demais tipos de colágeno devem-se ao fato de que os colágenos I e III são constituintes normais do epineuro e do endoneuro enquanto que as demais fibras colágenas são ausentes nesses tecidos (MONTES & JUNQUEIRA 1991)

AgNORs são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossomal. O número dessas regiões em cada núcleo está diretamente correlacionado com a atividade celular e, portanto podem servir como um indicador de potencial maligno de um tumor (KORNEVEY *et al.*, 2000; RECH *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em nosso estudo tanto os neurofibromas benignos e malignos quanto os schwannomas benignos e malignos possuíam uma frequência de AgNOR variável, devido à sua variável taxa de proliferação celular. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tumores benignos e malignos. Achado

semelhante foi obtido por Chijiwa *et al.*, (2004) utilizando o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Esses autores citam que devido à ineficácia dos marcadores de proliferação celular nas neoplasias do SNP, devemos levar em conta a taxa de mitose e outros achados histopatológicos como a celularidade, anisocitose, atipia celular e focos de necrose quando for necessário analisar o comportamento da neoplasia.

Cavanagh (1990) citou que os mastócitos são vistos fisiologicamente nos espaços endoneurais, e que seu número aumenta em qualquer forma de injúria ao SNP, mas a sua função ainda permanece desconhecida. Os neurofibromas foram caracterizados por uma concentração alta e difusa de mastócitos. Nos schwannomas essa população celular era restrita a poucas áreas, com algumas exceções. Essa marcada diferença entre as neoplasias deve-se ao fato de que os neurofibromas são constituídos de tecido endoneural reativo onde os mastócitos são encontrados normalmente (ISAACSON, 1976; SANGUINETTI *et al.*, 1992).

Embora a origem histológica diversa as neoplasias investigadas, schwannomas e neurofibromas, foram marcadas com o anticorpo anti-vimentina. O S100 também foi positivo em todos os casos de neurofibromas e schwannomas analisados. Imunoistoquimicamente, os TSNP são geralmente positivos para vimentina e S100, entretanto os tumores anaplásicos e heterogêneos tendem a ser negativos para o S100. Alguns autores têm especulado que a ausência da marcação para S100 indica caráter de malignidade (HIROSE *et al.*, 1998; KOESTNER & HIGGINS, 2002), mas achado semelhante não foi observado em nosso trabalho. Alguns relatos indicam que a proteína S100 não deve ser usada como um marcador específico para células de Schwann em schwannomas malignos. Em um estudo realizado por Mark *et al.* (1989), 60% dos schwannomas não foram marcados pela proteína S100, esse achado é muito semelhante ao de outros estudos imunoistoquímicos envolvendo o uso do S100 em schwannomas malignos. Isso nos leva a crer que a diferenciação dos schwannomas malignos de outras neoplasias malignas de células fusiformes não deve ser limitada somente ao uso do S100, mas com o uso conjunto de outros marcadores das células de Schwann como, por exemplo, o GFAP e o LEU 7.

GFAP é o principal componente dos filamentos intermediários encontrado nos astrócitos, mas a sua expressão não é restrita a essas células. No presente estudo nós demonstramos uma alta incidência da imunorreatividade à GFAP (75%) nos schwannomas e a ausência de marcação nas células neoplásicas dos neurofibromas, onde somente as células de Schwann presentes nos fascículos nervosos estavam marcadas. Achado semelhante foi obtido por Kawahara *et al.* (1988) e Mark *et al.* (1989) que observaram uma marcação irregular do GFAP nos TSNP analisados. O significado biológico dessa expressão variável do GFAP

ainda não é claro. Os autores acima observaram que os tumores mais próximos ao SNC apresentavam marcação mais acentuada ao contrário daqueles localizados nas extremidades. Outros achados indicam que a ausência de imunomarcação possa estar correlacionada com o alto grau de anaplasia celular do tumor.

Esses achados, combinados com informações levantadas por outros autores indicam que a caracterização imunoistoquímica dos tumores de bainha dos NP é dificultada, pela grande diversidade de expressões antigênicas das células neoplásicas. Portanto, o diagnóstico imunoistoquímico deve ser estabelecido levando-se em conta o uso de dois ou mais anticorpos que em conjunto devem ser avaliados para estabelecer a origem do tumor.

6 CONCLUSÕES

1. Os tumores do SNP são raros na rotina diagnóstica do Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM. Dados epidemiológicos conclusivos ficam prejudicados devido à baixa incidência e à carência de informações sobre os tumores analisados.
2. Através da técnica histoquímica do Tricrômico de Masson constatou-se que os neurofibromas apresentam maior quantidade de tecido conjuntivo do que os schwannomas.
3. O tecido conjuntivo que forma os schwannomas e os neurofibromas é constituído por fibras colágenas do tipo I e do tipo III.
4. A técnica de AgNOR não foi eficiente como indicador de prognóstico, já que não houve diferença estatística significativa entre as neoplasias benignas e malignas.
5. Os mastócitos eram mais prevalentes nos neurofibromas do que nos schwannomas.
6. A vimentina e a proteína S100 são marcadores adequados como auxiliares no diagnóstico das neoplasias do SNP. O GFAP deve ser sempre associado a outras técnicas de diagnóstico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. J. Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. **Technology integration group**, v. 13, n. 7, p. 276-280, 1997.

ANDERSON, D. J. Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification. **Development**, v. 3, p. 8-13, 1993.

ARIZA, A.; BILBAO, J. M.; ROSAI J. Immunohistochemical detection of epithelial membrane antigen in normal perineural cells and perineuroma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 12, n. 9, p. 678-683, 1988.

BLAKEMORE, W. F.; CRANG, A. J.; EVANS, R. J. The effect of chemical injury on oligodendrocytes. In: MIMS, C. A.; CUZNER, M. L.; KELLY, R. E. **Viruses and demyelinating diseases**. 1. ed. London: Academia Press, 1983. Cap 08, p. 167-190.

BUNGE, R. P.; BUNGE, M. B.; COCHRAN, M. Some factors influencing the proliferation and differentiation of myelin forming cells. **Neurology**, v. 28, p. 59-67, 1978.

BONDAN, E. F. et al. Schwann cells may impress an oligodendrocyte-like remyelinating pattern following ethidium bromide injection in the rat brain. **Acta Microscopica**, v. 8, p. 707-708, 1999.

BROWER, A. et al. Unilateral enlargement in a dog with a malignant peripheral nerve sheath tumor. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 3, p. 353-356, 2005.

BROWN, M. C. Response adaptation of medial olivocochlear neurons is minimal. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, n. 5, p. 2381-2392, 2001.

CAVANAGH, J. B. Peripheral Nervous system. In: WELLER, R. O. **Nervous System, Muscle and Eyes**. London: Churchill Livingstone, 3. ed., v.4, 1990. cap. 11, p. 533-543.

CHERNIE, S., DORE, M. Oral malignant Melanoma with Osteoid Formation in a Dog. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 74-76, 1999.

CHIJIWA, K.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 307-318, 2004.

CLARK, H. B. et al. Myelin Basic Protein and P₂ Protein are not Immunohistochemical Markers for Schwann Cell Neoplasms. **American Journal of Pathology**, v. 121, n.1, p. 96-101, 1985.

COCKERELL, G. L.; COOPER, B. J. Disorders of cell growth and cancer biology. In: SLAUSON, D. O.; COOPER, B. J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3. ed. St Louis: Mosby, 2002. cap. 6, p. 298-377.

CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An Overview of cancer Pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. Iowa: Iowa State Press, 2002. cap. 1, p. 3-44.

CULLING, C.F.A., ALLISON, R.T., BARR, W.T. **Cellular pathology technique**. 4 ed. London: BUTTERWORTHS, 1985. cap. 4, p. 111-152

FAWCETT, J. N.; ROSSER, A. E.; DURINET, S. B. **Brain damage and Brain repair**. Oxford: University Press, 2001. 466p.

FERNANDES, C. G.; GRAÇA, D. L.; PEREIRA, L. A. V. Desmielinização e remielinização após múltiplas injeções intramedulares de brometo de etídio em ratos Wistar. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 55, p. 452-459, 1997.

FRASER, S. E.; FRASER, M. B. Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are multipotent. **Development**, v. 112, p. 913-920, 1991.

GOODMA M. et al. Neurofibromatosis in Cattle: a report of two cases. **Cornew Veterinary**, v. 45, p. 229-238, 1955.

GRAÇA, D. L. et al. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, p. 358-361, 2001.

GRAÇA, D. L. et al. Schwannoma de V par craneano y ganglio em Pastor alemán. Relato de un caso. **Medicina Veterinaria**, v. 15, n. 12, p. 652-656, 1998.

GRAÇA, D. L.; GEVEHR, C.; PEREIRA, L. A. V. Morphological changes of myelinating oligodendrocytes in the ethidium bromide model of demyelination. **Revista Española de Patología**, v. 30, n. 4, p. 297-301, 1997.

GRAÇA, D. L. Desmielinização tóxica do sistema nervoso central. I. Efeitos de uma droga intercalante gliotóxica na medula espinhal de ratos Wistar. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, n. 3, p. 263-267, 1989a.

GRAÇA, D. L. Desmielinização tóxica do sistema nervoso central. II. Aspectos biológicos das células de Schwann observados durante o processo de reparação do tecido. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, n. 3, p.268-273, 1989b.

GRAÇA, D. L. Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 46, f. 3, p. 292-297, 1988.

GRAY, M. H. et al. Glial Fibrillary Acidic Protein and Keratin Expression by Benign and Malignant Nerve Sheath tumors. **Human Pathology**, v. 20, n. 11, p. 1089-1096, 1989.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. cap.IX, 437-554p.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. Nervous Tissue. In: _____. **Histology**. 8. ed. Philadelphia: Lippincott, 1979. cap. 17, p. 483-539.

HIATT, J. L.; GARTNER, L. P. **Color textbook of Histology**, Philadelphia: W. B. SAUNDERS COMPANY, 1997. cap. 9, p.155-185.

HIROSE, T. et al Perineural Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 11, p. 1368-1378, 1998.

HOKE, A. et al. Glial cell line-derivation neurotrophic factor alters axon Schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 561-567, 2003.

ISAACSON, P. Mast cell in benign nerve sheath tumours. **Journal Pathology**, v. 119, n. 4, p. 193-196, 1976.

JESSEN, K. R. et al. The Schwann cell precursor and its fate: A study of cell death and differentiation during glioneogenesis in rat embryonic nerves. **Neuron**, v. 12, p. 509-527, 1994.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Fate diverted. **Current Biology**, v. 4, n. 9, p. 824-827, 1994.

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

KAWAHARA, E. et al. Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Peripheral Nerve Sheath Tumors. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 12, n. 2, p. 115-120, 1988.

KIRKPATRICK, C. J.; CURRY, A. Interaction between mast cells and perineural fibroblasts in neurofibroma. New Insights into mast cell function. **Pathology Research and Practice**, v. 183, n. 4, p. 453-461, 1988.

KOESTNER, A.; HIGGINS, R. J. Tumors of the nervous system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors of Domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. cap. 14, p. 697-738.

KOESTNER, A.; JONES, T. C. Sistema Nervoso. In: JONES, T. C.; HUNT, R., D., KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 27, p. 1281-1320.

KORNEYEV, I. A. *et al.*, Interphase argyrophilic nucleolar organiser regions and nucleolar counts in transitional cell bladder tumours. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 3, p.129-32, 2000

KUWAMURA, M. et al. Canine peripheral nerve sheath tumor with eosinophilic cytoplasmic globules. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 223-226, 1998.

LeCOUTER, R. A. Tumors of the nervous system. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. **Small Clinical Oncology**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. cap. 26, p. 500-531.

LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. **The neuron. Cell and Molecular biology**. 3. ed. Oxford: New York, 2002. 603 p.

LI Y., FIELD, P. M.; RAISMAN, G. Death of oligodendrocytes and microglial phagocytosis of myelin precede immigration of Schwann cells into the spinal cord. **Journal of Neurocytology**, v. 28, p. 417-427, 1999.

MARK, H. et al. Glial Fibrillary Acidic Protein and Keratin Expression by Benign and Malignant Nerve Sheath Tumors. **Human Pathology**, v. 20, n. 11, p. 1089-1096, 1989.

MIRSKY, R. et al. Regulation of genes involved in Schwann cell development and differentiation. In: CASTELLANO, L. B.; NIETO S. M. **Glial cell function**. Amsterdam: Elsevier, 2001. cap. 1, p. 3-11.

MIRSKY, R.; JESSEN, K. R. Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. In: JESSEN, K. R.; RICHARDSON, W. D. **Glial cell development**. 2. ed. Oxford: New York, 2001. cap. 1, p. 1-20.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius Method for the Study of the Biopathology of Collagen. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 1-11, 1991.

OLIVEIRA, M. G. et al. Tongue Squamous Cell Carcinoma: Relationship Between Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) and Histopathologic Grading. **Applied Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 20-24, 2005.

ORTIZ-HIDALGO, C.; WELLER, R. O. Peripheral Nervous System. In: STERNBERG, S. S. **Histology for Pathologists**. Philadelphia: Lippincott, 1997. cap. 12, p. 285-311.

PATNAIK, A. K.; ERLANDSON, R. A., LIEBERMAN, P. H. Canine malignant melanotic schwannomas: A light and electron microscopic study of two cases. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 483-488, 1984.

PEREIRA, L. A. V. et al. Dynamics of remyelination in the brain of adult rats after exposure to Ethidium Bromide. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30, n. 3, p. 341-348, 1998.

PEIREIRA, L. A. V. et al. Biology of the repair of central nervous system demyelinated lesions. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 54, n. 2, p. 331-334, 1996.

PEREZ, J. et al. Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 392-397, 1996.

PUMAROLA, M. et al. Malignant epithelioid Schwannoma affecting the trigeminal nerve of a dog. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 434-436, 1996.

RECH, R. R. Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães. 2003. 84f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

RECH, R. R. et al. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 441-448, 2004.

RIET-CORREA, G. R. et al. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adults Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 99-104, 2002.

RIET-CORREA, G. R. Morfologia das lesões induzidas pelo Brometo de Etídio no nervo ciático de ratos Wistar. 2001. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

SALLIS, E. S. V. Resposta astrocitária e oligodendroglial no tronco encefálico de ratos Wistar imunossuprimidos e submetidos ao modelo desmielinizante do brometo de etídio. 2005. 77f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SANGUINETTI, C. et al. The ultrastructure of peripheral neurofibroma: the role of mast cells and their interaction with perineural cells. **Italian Journal of Orthopedic Traumatology**, v. 18, n. 2, p. 207-216, 1992.

SAS. **Análise estatística**. New York, 2002. Versão 6.0. 1 CD ROOM. Sistema Operacional MS-DOS e manual de codificação.

SCHEITHAUER, B. W. Perineuroma. In: KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K. **Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous system**. Lyon: IARCPress, 2000. cap. 10, p. 169-171.

SCHERER, S. S.; SALZER, J. L. Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. In: JESSEN, K. R.; RICHARDSON, W. D. **Glial cell development** 2. ed. Oxford: University Press, 2001. cap. 15, p. 299-330

SHAN, N. M. et al. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. **Cell**, v. 77, p. 349-360, 1994.

SHARMA, K.; KORADE, Z.; FRANK, E. Late-Migrating neuroepithelial cells from the spinal cord differentiate into sensory ganglion cells and melanocytes. **Neuron**, v. 14, p. 143-152, 1995.

STERNE, G. D. et al. Neurotrophin-3 enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains. **The Journal of cell Biology**, v. 139, p. 709-715, 1997.

SUMMERS, B.A. et al. **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995. 527p.

SYROID, D. E. et al. Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin. **Neurobiology**, v. 93, p. 9229-9234, 1996.

TOPILKO, P.; MEIJER, D. Transcription factors that control Schwann cell development and myelination. In: JESSEN, K. R.; RICHARDSON, W. D. **Glial cell development**. 2. ed. Oxford: University Press, 2001. cap. 11, p. 223-244.

TOYODA, T et al. Multiple Perineurinomas in Chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 176-183, 2005.

TRAPP, B. D. et al. Cell Biology of Myelin Assembly. In: LAZZARINI, R. A. et al. **Myelin Biology and Disorders**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. v. 1, cap. 1, p. 29-55.

USHIGONE, S. et al. Perineural cell tumor and the significance of the perineural cell in neurofibroma. **Acta Pathologica Japan**, v. 36, n. 7, p. 973-987, 1986.

ZAMECNIK, M.; MICHAL, M. Perineural Cell Differentiation in Neurofibromas. Report of eight cases including a case with composite perineuroma-neurofibroma features. **Pathology Research and Practice**, v. 197, p. 537-544, 2001.

ZHU, Y. et al. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. **Science**, v.3, n. 296, p. 920-922, 2002

WOODRUFF, J. M. et al. Tumors of Cranial and Peripheral Nerves. In: KLEIHUES, P.; CAVENEY, W. K. **Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous system**. Lyon: IARC Press, 2000. cap. 10, p. 164-174.

ANEXOS

ANEXO (A) 1 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Método do Tricrômico de Masson

TRICRÔMIO DE MASSON (com azul de anilina)

MASSON TRICHROME (with aniline blue)

Código EP-010802

- * Quantidade de testes : 60 testes*
- * Tempo total do procedimento : 35 minutos
- * Validade do produto : ver frasco
- * Temperatura de armazenamento : 15 a 25°C (temperatura ambiente)
- * Equipamentos complementares : Não necessita

Aplicação

Método recomendado para tecido conjuntivo. Demonstra gametas, núcleos, neurofibrilas, neuroglia, colágeno, ceratina, fibrilas intracelulares, imagem negativa do complexo de Golgi.

Princípio

São utilizados quatro diferentes corantes: hematoxilina férrica de Weigert para núcleos, ácido pícrico para eritrócitos, uma mistura de corantes ácidos (fucsina ácida-“vermelho de xilidina”) para citoplasma e azul de anilina para tecido conjuntivo.

Método

1. Leve as seções de tecidos à água destilada.
2. Coloque na seção de tecido 10 gotas do reagente **A** e 10 gotas do reagente **B**. Deixe agir por 10 minutos.
3. Seque as lâminas sem lavá-las e coloque na seção de tecido 10 gotas do reagente **C**. Deixe agir por 4 minutos.

4. Lave rapidamente as seções em água destilada (3 à 4 segundos) e coloque na seção de tecido 10 gotas do reagente **D**. Deixe agir por 4 minutos.
 5. Lave em água destilada e coloque na seção de tecido 10 gotas do reagente **E**. Deixe agir por 10 minutos.
 6. Seque as lâminas sem lavá-las e coloque na seção de tecido 10 gotas do reagente **F**. Deixe agir por 5 minutos.
 7. Lave em água destilada e desidrate rapidamente em série de álcool ascendente, pare por 1 minuto no último banho de etanol absoluto. Limpe com xilol e monte as lâminas com ERV-MOUNT.
- * Quantidade de teste estimada conforme o tamanho do tecido a ser corado, quanto maior o tecido maior será o volume necessário para realizar a coloração e menor será a quantidade de testes. Veja maiores detalhes no verso “INSTRUÇÕES GERAIS”.

Resultados

| | |
|---|----------|
| Núcleos e gametas..... | preto |
| Citoplasma, ceratina, fibras musculares, acidófilo..... | vermelho |
| Colágeno, muco, grânulos basófilos da hipófise..... | azul |
| Grânulos das células delta da hipófise | azul |
| Eritrócitos..... | amarelo |

Reagentes

- A** - Hematoxilina férrica de Weigert – solução A 30 ml
- B** - Hematoxilina férrica de Weigert – solução B 30 ml
- C** - Solução alcoólica de ácido pícrico 30 ml
- D** - Fucsina ponceau ácida segundo Mallory 30 ml
- E** - Solução ácida fosfomolibdica 30 ml
- F** - Azul de anilina de Masson 30 ml

Referências

- Masson PJ. *Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique*. 1929 J. Tech. Methods, 12: 75-90.
- Lillie RD. *Staining of connective tissue* . Arch Pat 1951; 54:220-223.

Lillie RD. *Studies on selective staining of collagen with acid anilin dyes*. J Tech Methods 1945; 25: 1-47.

Lillie RD. *Further experiments with the Masson trichrome modification of Mallory's connective tissue stain*. Stain Technol 1940; 15: 82.

Armed Forces Institute of Pathology: *Laboratory Methods in histotechnology*. Washington D.C., A.F.I.P., 1994.

INSTRUÇÕES GERAIS

Para a obtenção de um melhor resultado da metodologia e uma completa compreensão da terminologia utilizada, nós recomendamos as seguintes indicações:

Número de testes realizados

O número mínimo de testes foi calculado com 10 gotas de reagente de cada kit, que permite cobrir facilmente seções de tecidos médias ou grandes, aconselhamos seguir esta quantidade de reagentes. Em casos de seções pequenas, no entanto, pode-se utilizar menos de 10 gotas, neste caso é necessário reduzir a quantidade de todos os outros reagentes para evitar desequilíbrios.

Tempo de execução

O tempo de execução foi calculado somando-se a duração de todas as etapas do método. Ele não inclui o tempo de desparafinizar, hidratar e desidratar o corte.

Coloração final

A metodologia do kit foi padronizada a uma temperatura média de 20°C e em condições normais de trabalho, utilizando-se os produtos indicados nesta literatura. Pode ocorrer uma pequena variação na coloração final, devido principalmente a variação da temperatura, ocorrendo esta variação deve-se alterar o tempo utilizado em cada reagente, com o objetivo de intensificar ou diminuir a coloração.

Foto microscópica

Confira no verso da embalagem (caixa) do kit a foto microscópica do tecido, coloração sugerida do resultado. Confira também a relação e fotos dos kits comercializados.

Validade

Indica o tempo em que produto permanece inalterado a partir de sua fabricação, se armazenado adequadamente. Cada Kit possui uma etiqueta com identificação do lote e data de vencimento.

Equipamento básico

Todo Kit necessita do seguinte equipamento:

* Cuba de coloração horizontal ou uma bandeja de coloração horizontal, comercializada pela Erviegas, código ERV-BC24.

* Uma garrafa de lavagem (pulverizador) com água destilada para as lavagens requeridas na metodologia de cada kit, ou como alternativa, uma cuba vertical (jarra de Coplin) para as lavagens por imersão, comercializada pela Erviegas código ERV-JC.

Duas séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

*DESCEDENTE: para desparafinizar e levar os cortes das seções para água destilada, composta de: xilol (x2), etanol absoluto (x2), etanol a 95%, etanol a 70% e água destilada.

*ASCENDENTE: para desidratar e limpar, composta de: etanol a 95%, etanol absoluto (x2) e xilol (x2).

Aconselhamos o uso do meio de montagem ERV-MOUNT, comercializado pela Erviegas código ERV-MOUNT/500 frasco com 500ml e ERV-MOUNT/100 frasco com 100ml.

Equipamento complementar

Nas literaturas de cada kit constam os equipamentos complementares que podem ser necessários, e que não constam no Kit, mas que estão normalmente presentes em qualquer laboratório.

Fixação e meios de inclusão

Os tempos dos métodos dos kits foram determinados a partir de cortes histológicos de fragmentos fixados em formol tamponado com pH 7 com tampão fosfato e inclusos em parafina. A utilização de outros fixados nas práticas histológicas comuns (piocromoformol de Bouin, B5) pode ser vantajosa em alguns métodos (por exemplo para os tricrômeros), mas não são aconselhadas para outros métodos.

Garantia Erviegas

A Erviegas garante o funcionamento do produto conforme especificado nesta literatura. Para maiores informações sobre o produto ou detalhes sobre outras técnicas e produtos acesse nosso site www.erviegas.com.br.

ANEXO (B) 2 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas Técnica do Picosírius red (Sírius Red)

Solução de Sírius Red para uso:

Água Destilada.....100ml
Sírius Red.....0,1g
Ácido Pírico.....até saturar (1 a 2 g)

Procedimento:

1. Desparafinizar as lâminas até a água destilada
2. Submeter as lâminas a solução de Sírius Red por 40 min.
3. Lavar em água destilada
4. Contracorar com hematoxilina por 1 a 2 min.
5. Lavar em água corrente
6. Desidrate, clarifique e monte a lâmina usando resina sintética.

Resultado:

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 demonstrando uma fraca birrefringência de cores variadas. Microfibrilas finas amorfas fracamente birrefringentes nas lâminas basais são características do colágeno tipo IV.

ANEXO (C) 3 – Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. Técnica de AgNOR

Soluções:

Nitrato de Prata 50%

Nitrato de Prata..... 50g

Água Deionizada.....100ml

Solução de Gelatina

Gelatina.....2g

Ácido Fórmico.....1ml

Água Deionizada.....100ml

Solução de Trabalho

Nitrato de Prata.....8ml (2 partes)

Solução de Gelatina.....4ml (1 parte)

Misture a solução acima imediatamente antes do uso. O volume da solução de trabalho usada depende do número de lâminas a serem coradas. Este volume é adequado para corar aproximadamente 5 lâminas (em caixinha plástica para guardar lâminas). **Tempo: 1 hora.**

Procedimento:

1. Desparafine e hidrate as lâminas em água deionizada (somente para biópsias)
2. Neste ponto começa o procedimento para esfregaços
3. Coloque as lâminas na solução de trabalho em uma caixinha plástica por 45 min em temperatura ambiente.
4. Lave as lâminas em água deionizada por 1 min
5. Opcional: contracorar com amarelo de metila por 3 min
6. Desidrate, clarifique e monte a lâmina usando resina sintética

Para esfregaços:

1. Deixe as lâminas em temperatura ambiente
2. Secar ao ar
3. Fixar em acetona por 10 min
4. Secar novamente
5. Começar no passo 3 da técnica acima

Resultados: Locais AgNOR – Pontos pretos intranucleares

Fundo – Amarelo pálido

APÊNDICE

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

1) Preparação das lâminas

- Corte histológico de 3 µm em lâmina silanizada

2) Protocolo de IHQ

- Xilol por 30 min (na estufa 60 °C)
- Xilol (frio) por 5 min
- Álcool absoluto por 1 min
- Álcool absoluto por 30 seg
- Álcool 96° GL por 30 seg
- Álcool 70° GL por 1 min
- Água corrente por 3 min
- Água destilada por 1 min
- Peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) – 2 vezes de 10 min (pingar sobre os cortes individualmente)
- Lavar em água corrente por 10 min
- Água destilada por 1 min
- Lavar em água destilada em 2 vezes por 5 min
- Levar ao microondas no tampão TRIS-EDTA (pH 9,0) – 4 vezes por 2,5 minutos (preenchendo o recipiente quando necessário)
- Deixar esfriar em temperatura ambiente
- Água corrente por 5 min; água destilada por 1 min
- Clara de ovo (1 clara em 100 ml de água) em água destilada por 15 min
- Água corrente por 5 min; água destilada por 1 min
- Leite em pó desnatado a 5% em PBS por 20 min

- Água corrente por 3 min; água destilada por 1 min
- PBS por 5 min
- Anticorpo primário: - pingar o Ac diluído em diluente de anticorpo sobre os cortes

Diluição:

- * Anticorpo primário Anti-Vimentina 1:100
- * Anticorpo Primário Anti S100 1:400
- * Anticorpo Primário GFAP 1:100
- Incubar “overnight” em câmara úmida
- Lavar em PBS - 2 vezes de 5 min (cada)
- LSAB (Ac secundário e biotina): - pingar gotas amarelas na quantidade suficiente para cobrir o corte
- Incubar por 30-35 min a 25° C (temperatura ambiente)
- Lavar o excesso com PBS
- Mergulhar em PBS por 2 vezes de 5 min (trocando o PBS)
- LSAB (estreptavidina - peroxidase): pingar gotas vermelhas em quantidade suficiente para cobrir o corte
- Incubar por 30-35 min a 25° C (temperatura ambiente)
- Lavar o excesso em PBS
- Mergulhar em PBS – por 2 vezes de 5 min (trocando o PBS)
- DAB – diluído conforme as indicações do fabricante (pingar quantidade suficiente para cobrir os cortes) - tempo 2 minutos
- Parar a reação em água destilada
- Água corrente por 3 min
- Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 min
- Água corrente por 5 min
- Álcool absoluto rápido
- Álcool absoluto por 2 vezes de 1 min
- Xilol 1 (lavar bem)
- Xilol 2
- Montagem em lamínula com Entellan