



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DE GLIOMAS CEREBRAIS NO CÃO, PADRÕES IMAGIOLÓGICOS, ESTUDO
DAS MUTAÇÕES DE P53, EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DO FACTOR DE
CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR), E MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS**

Sandra de Oliveira Tavares de Sousa Jesus

PRESIDENTE

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

VOGAIS

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutor Augusto José Ferreira de Matos

Doutor Artur Severo Proença Varejão

ORIENTADOR

Doutor António José Almeida Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutor António José de Freitas Duarte

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DE GLIOMAS CEREBRAIS NO CÃO, PADRÕES IMAGIOLÓGICOS, ESTUDO
DAS MUTAÇÕES DE P53, EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DO FACTOR DE
CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR), E MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS**

Sandra de Oliveira Tavares de Sousa Jesus

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ESPECIALIDADE DE CLÍNICA

PRESIDENTE

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

ORIENTADOR

Doutor António José Almeida Ferreira

VOGAIS

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro
Doutor António José de Almeida Ferreira
Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís
Doutor António José de Freitas Duarte
Doutor Augusto José Ferreira de Matos
Doutor Artur Severo Proença Varejão

CO-ORIENTADOR

Doutor António José de Freitas Duarte

2011
LISBOA

“The greatness of a nation and its moral progress can be
judged by the way its animals are treated. “

Mahatma Gandhi, 1869-1948

Dedicado aos meus pais e irmã, que desde cedo me ensinaram a
apreciar e a respeitar os animais e a natureza. Obrigada por
sugerirem que me dedicásse a esta maravilhosa profissão de
Veterinária.

Aos meus Cães, passados e presentes, por enriquecerem a minha
vida e a tornarem tão divertida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor António Ferreira pela amizade, confiança e ajuda desde que estou na FMV e durante este trabalho. Ao seu cão “Scott” pelos momentos divertidos matinais.

Ao meu co-orientador Professor Doutor António Duarte pela co-orientação deste trabalho e sugestões de trabalhos futuros.

À Dra. Ana Serpa do IPO de Lisboa pela disponibilidade demonstrada e generosa paciência no ensinamento das técnicas de biologia molecular utilizadas. Sem esta ajuda parte deste trabalho não teria sido possível.

À Dra. Elisabete Silva, da secção de Reprodução, pela ajuda preciosa e fundamental nas técnicas de biologia molecular (nomeadamente no PCR em tempo-real), e ainda pela companhia e boa disposição, que tornaram as penosas horas no laboratório mais toleráveis.

Ao Dr. Hugo Pissarra, da secção de Anatomia Patológica, pela ajuda na realização das técnicas de imunohistoquímica e pelo tempo pessoal dispensado. Apesar de sempre bastante ocupado nunca se negou a dar a sua valiosa opinião e sugestões, nomeadamente na legendagem das figuras deste trabalho.

Ao Dr. Telmo Nunes e Professora Doutora Isabel Neto pela fundamental orientação no tratamento estatístico dos resultados deste trabalho.

À secção de Anatomia Patológica e à sua responsável Professora Doutora Conceição Peleteiro pela realização da classificação histopatológica deste trabalho e pela cedência das instalações para a realização das técnicas de imunohistoquímica e valiosa ajuda.

À D. Sandra Carvalho, D. Maria do Rosário e D. Maria Augusta da secção de Anatomia Patológica pela ajuda na preparação de material essencial à realização da imunohistoquímica

Ao Professor Doutor José Paulo Sales Luís - o melhor veterinário do Mundo e meu herói - pela inspiração no dia-a-dia, conselhos, ensinamentos técnicos e entusiasmo e disponibilidade como colabora nas cirurgias dos Animais Exóticos nestes últimos 14 anos.

Aos meus amigos Luísa Mateus, Teresa Abrantes, Mila e Nélia pela amizade e ajuda demonstrada ao longo dos anos.

Aos meus colegas da secção de Radiologia – Óscar Gambôa, Cristina Almeida e António Almeida - pela amizade, convívio diário e ajuda na realização das TACs durante o meu doutoramento.

A todo o pessoal do Hospital Escolar, veterinários, auxiliares, recepcionistas e funcionários da Farmácia que comigo contactam diariamente e que tornam os dias mais divertidos (às vezes!).

Aos meus amigos Professor Doutor José Henrique e Dra. Salomé Gonçalves pela amizade, ensinamentos e conselhos profissionais e de vida.

Ao CIISA pelo financiamento necessário para a realização deste trabalho.

Estudo de gliomas cerebrais no Cão, padrões imagiológicos, estudo das mutações de p53, expressão do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR), e marcadores imunohistoquímicos.

Abstract

O objectivo deste trabalho foi estudar os padrões imagiológicos em TAC dos tumores cerebrais do cão, com particular interesse nos gliomas, assim como tentar determinar o estatuto dos genes p53 e EGFR nestes tumores, realizando estudos moleculares e de imunohistoquímica. Foram realizadas TACs crânio-encefálicas em 105 cães, tendo-se confirmado em todos a presença de lesão intracraniana. O Boxer foi a raça mais representada com 51,4%, a média de idades foi de 9,44 anos e o sintoma mais frequente foi epilepsia (62,7%). 43,8% dos gliomas eram hipodensos, 62,5% captaram contraste, destes 60% captaram contraste em anel, e 80% revelaram desvio da foice do cérebro.

Dos 26 tumores classificados por histopatologia, 61,5% foram gliomas e 26,9% meningiomas.

O estudo das mutações do gene p53 foi realizado em 19 casos, incluindo 12 gliomas e 6 meningiomas, não tendo sido detectada qualquer mutação.

A expressão relativa do gene EGFR, avaliada por PCR em tempo-real, revelou ser significativa em meningiomas, oligodendrogliomas e astrocitomas ($p < 0,05$) e em gliomas ($p < 0,01$).

O estudo imunohistoquímico foi realizado em 24 casos, incluindo 16 gliomas e 8 meningiomas, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre as marcações de gliomas e meningiomas para Ki-67 e EGFR.

Palavras-chave: cão, glioma, tomografia axial computadorizada, p53, egfr, imunohistoquímica.

Study of canine cerebral gliomas, CT imaging patterns, p53 mutations, epidermal growth factor receptor (EGFR) expression, and immunohistochemistry markers.

Abstract

The purpose of this project was to assess CT imaging patterns associated with brain tumours in dogs, with particular interest in gliomas, and also to establish the status of p53 and EGFR genes in these tumours, by means of molecular and immunohistochemistry studies. Brain CT scans were performed on 105 dogs and all were confirmed to have an intracranial lesion. The Boxer was the most represented breed (51,4%), the mean age was 9,44 years and epilepsy was the most common symptom (62,7%). 43,8% of gliomas proved to be hypodense and 62,5% did uptake contrast. The most common contrast uptake pattern in gliomas was the ring pattern (60%) and in 80% of cases gliomas did show deviation of the falx cerebri.

All 26 brain lesions were classified as tumours on histopathology, including 61,5% gliomas and 26,9% meningiomas.

P53 gene mutation studies produced no mutation on all 19 cases comprising 12 gliomas and 6 meningiomas.

EGFR gene relative expression was assessed by real-time PCR and showed statistically significant differences in meningiomas, oligodendrogliomas and astrocytomas ($p < 0,05$), and in gliomas ($p < 0,01$).

Immunohistochemistry was performed in 24 cases, including 16 gliomas and 8 meningiomas, but no statistically significant differences were found between gliomas and meningiomas staining for Ki-67 and EGFR.

Key words: dog, glioma, computerised tomography, p53, egfr, immunohistochemistry.

ÍNDICE

1. Revisão bibliográfica	1
1.1. Tumores intracranianos	2
1.1.1. Prevalência de tumores cerebrais no cão	2
1.1.1.1. Meningiomas	3
1.1.1.2. Gliomas	4
1.1.2. Fisiopatologia dos tumores cerebrais	4
1.1.3. Sinais e sintomas	6
1.1.4. Diagnóstico	8
1.2. Tomografia axial computadorizada	9
1.2.1. Aplicações e limitações da TAC	9
1.2.2. Diagnóstico e padrões imagiológicos	11
1.3. Histopatologia	14
1.4. O gene p53 e o seu papel no desenvolvimento de uma neoplasia	17
1.4.1. Definição de neoplasia e cancro	17
1.4.2. Genes supressores tumorais e oncogenes	17
1.4.3. O gene p53 nos tumores cerebrais e suas mutações	18
1.5. Expressão do gene EGFR	22
1.6. Imunohistoquímica	23
1.6.1. Imunohistoquímica de Ki-67	24
1.6.2. Imunohistoquímica de p53	25
1.6.3. Imunohistoquímica de EGFR	27
2. Materiais e métodos	28
2.1. Critérios de selecção dos casos e avaliação preliminar	29
2.2. Tomografia axial computadorizada	29
2.3. Colheita e armazenamento das amostras	30
2.3.1. Colheita de sangue e urina	31
2.3.2. Colheita de tecido cerebral para estudo de genética molecular	31
2.3.3. Colheita de tecido cerebral para histopatologia e imunohistoquímica	31
2.4. Detecção de mutações do gene p53	31
2.4.1. Extracção de RNA total do tecido cerebral	31
2.4.2. Síntese de cDNA	32
2.4.3. Reacções em cadeia da polimerase (PCR) do gene p53	32
2.5. PCR em tempo-real do gene EGFR	34
2.6. Classificação histopatológica	35
2.7. Imunohistoquímica	36
2.7.1. Imunohistoquímica de Ki-67, p53 e EGFR	36
2.8. Análise estatística	39
3. Resultados	40
3.1. Raça, idade e sexo	41
3.2. Imagiologia	43
3.2.1. Estatística de imagiologia	50
3.3. Sintomatologia	50
3.4. Histopatologia	52
3.5. Mutações do gene p53	56
3.6. PCR em tempo-real do gene EGFR	57
3.7. Imunohistoquímica	59
3.7.1. Imunohistoquímica de Ki-67	59
3.7.2. Imunohistoquímica de p53	61
3.7.3. Imunohistoquímica de EGFR	62
4. Discussão	65
4.1. Imagiologia	66

4.1.1. Raça, idade e sexo	66
4.1.2. Sinais e sintomas	68
4.1.3. Número e localização das lesões intracranianas	69
4.1.4. Densidade e padrões de captação de contraste	70
4.1.5. Sistema ventricular cerebral e foice do cérebro	72
4.2. Classificação histopatológica	74
4.3. Mutações do gene p53	75
4.4. Expressão do gene EGFR	77
4.5. Histopatologia	78
4.6. Imunohistoquímica	78
4.6.1. Imunohistoquímica de Ki-67	78
4.6.2. Imunohistoquímica de p53	81
4.6.3. Imunohistoquímica de EGFR	83
4.7. Considerações finais	85
5. Bibliografia	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Corrida de RNA total em gel de agarose a 2% para avaliação da integridade	32
Figura 2 –	Astrocitoma de elevado grau	46
Figura 3 –	Oligodendroglioma	47
Figura 4 –	Meningioma fibroso	48
Figura 5 –	Meningioma maligno	49
Figura 6 –	Meningioma fibroso (HE)	53
Figura 7 –	Meningioma meningoteliomatoso (HE)	53
Figura 8 –	Oligodendroglioma (HE)	54
Figura 9 –	Astrocitoma de elevado grau (HE)	55
Figura 10 –	Astrocitoma fibrilhar (HE)	56
Figura 11 –	Meningioma fibroso (IHC)	60
Figura 12 –	Neuroblastoma cerebral (IHC)	61
Figura 13 –	Meningioma fibroso (IHC)	62
Figura 14 –	Adenoma acidofílico da hipófise (IHC)	64
Figura 15 –	Meningioma anaplásico (IHC)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Pares de oligonucleótidos iniciadores utilizados para a amplificação dos exões 5 a 10 do gene p53	33
Tabela 2 –	Condições das reacções de PCR para o gene p53	33
Tabela 3 –	Programas de amplificação do gene p53 usados por par de oligonucleótido iniciador	34
Tabela 4 –	Oligonucleótidos iniciadores e sondas de EGFR e GAPDH e suas concentrações	35
Tabela 5 –	Especificações dos anticorpos testados em imunohistoquímica	36
Tabela 6 –	Diluições e tempos de incubação utilizados para os diferentes anticorpos testados	39
Tabela 7 –	Número de cães por raça e sua percentagem relativa	41
Tabela 8 –	Número de cães por grupo etário	43
Tabela 9 –	Características imagiológicas das TAC que revelaram a presença de lesão intracraniana, e suas percentagens relativas	44
Tabela 10 –	Características imagiológicas por categoria histopatológica e suas percentagens relativas	45
Tabela 11 –	Sinais e sintomas apresentados por 75 cães com lesão intracraniana e suas percentagens relativas	50
Tabela 12 –	Localização anatómica da lesão intracraniana dos animais que apresentavam epilepsia e suas percentagens relativas	51
Tabela 13 –	Classificação histopatológica de 26 lesões intracranianas	52
Tabela 14 –	Mutações de p53 (de exão 5 a exão 10), por tipo histopatológico	56
Tabela 15 –	Quantificação relativa da expressão de EGFR em N-fold	57
Tabela 16 –	Índices de proliferação (em percentagem) da imunohistoquímica para Ki-67	59
Tabela 17 –	Imunomarcação para EGFR	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Percentagens relativas de fêmeas e machos incluídos no estudo	42
Gráfico 2 –	Percentagens relativas das idades dos cães incluídos no estudo	42
Gráfico 3 –	Média e desvio padrão em N-fold da expressão relativa de EGFR de meningiomas e gliomas	58
Gráfico 4 –	Média e desvio padrão em N-fold da expressão relativa de EGFR dos gliomas	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAER – Potenciais auditivos cerebrais evocados

DNA – Ácido desoxirribonucleico

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

EBP – Estreptavidina-biotina-peroxidase

EEG – Electroencefalograma

EGFR – Receptor do factor de crescimento epidérmico

IHC – Imunohistoquímica

IP – Índice de proliferação

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

MEG – Meningoencefalite granulomatosa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PaCO₂ – Pressão parcial arterial de CO₂

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

PDGF – Factor de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR – Receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas

PDGFRA – Receptor do factor A de crescimento derivado de plaquetas

PIC – Pressão intracraniana

RM – Ressonância magnética

RNA – Ácido ribonucleico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

SNC – Sistema nervoso central

TAC – Tomografia axial computadorizada

VEGFR – Receptor do factor de crescimento endotelial vascular

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. TUMORES INTRACRANIANOS

1.1.1. Prevalência de tumores cerebrais no cão

As doenças cerebrais focais são caracterizadas por sinais clínicos que restringem a localização das respectivas lesões a pequenas áreas do sistema nervoso, e que produzem alterações compatíveis com uma área anatômica e funcional (Bagley, 2005b).

Quando estas doenças produzem alterações estruturais no tecido cerebral normal, comprimindo-o, são chamadas de lesões intra-cranianas que ocupam espaço (Koestner & Higgins, 2002). As principais lesões intra-cranianas que ocupam espaço incluem: neoplasias primárias e metastáticas; granulomas associados a meningoencefalite granulomatosa (MEG) ou criptococose; doenças inflamatórias / infecciosas como a meningoencefalite necrosante, toxoplasmose ou neosporose; alterações vasculares como hemorragias devidas a traumatismos ou acidentes vasculares cerebrais; abscessos; e anomalias como hidrocefalia, quistos intra-aracnóideus ou hamartomas (Plummer, Wheeler, Thrall & Kornegay, 1992; Wolf *et al.*, 1995; Braund, 2003; Bagley, 2005b; e Vite, 2006).

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são relativamente raros nos animais domésticos, com a exceção do cão e, em menor grau, o gato (Koestner & Higgins, 2002).

Segundo Bagley *et al.* (1999), os tumores cerebrais ocorrem com uma prevalência de 14,5 por 100.000 em cães, embora a incidência real seja provavelmente desconhecida por falta de um sistema abrangente de rastreio (O'Brien & Axlund, 2005). Em gatos a prevalência de ocorrência dos tumores cerebrais é de 3,5 por 100.000 (O'Brien & Axlund, 2005). Já Long (2006) afirma que as neoplasias do SNC são relatadas frequentemente em cães e ocorrem com uma prevalência e variedade semelhante à verificada em humanos; estando esta estimada em 11,8 por 100.000 (O'Brien & Axlund, 2005).

No cão, ainda não foram identificados factores de risco claros associados ao desenvolvimento de tumores cerebrais (O'Brien & Axlund, 2005). No Homem, a exposição a radiações ionizantes já foi identificada como um factor de risco inequívoco no desenvolvimento de tumores cerebrais, quer de meningiomas como de gliomas (O'Brien & Axlund, 2005). A exposição do crânio, mesmo que a doses baixas de radiação, pode aumentar a incidência de tumores da glia por um factor de 3 a 7, com um período de latência que pode ultrapassar os 10 anos após a exposição, não sendo conhecido ainda se nos pequenos animais existe uma resposta semelhante à exposição a radiação ionizante (O'Brien & Axlund, 2005).

Os tumores intracranianos podem ter origem em vários tipos de tecidos intracranianos e não apenas a partir do tecido cerebral propriamente dito (O'Brien & Axlund, 2005). Assim, os tumores primários do sistema nervoso têm origem nas células da neuroectoderme, ectoderme e/ou mesoderme normalmente presentes em, ou associadas ao cérebro, medula espinhal ou nervos periféricos, enquanto, os tumores secundários do sistema nervoso podem ter origem nas estruturas circundantes como o osso ou músculo, ou podem resultar da metastização hematogénea de um tumor primário de outro órgão (Long, 2006).

Os tumores cerebrais primários mais comuns no cão são os meningiomas e os gliomas, incluindo os últimos os astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas, ependimomas e papilomas / carcinomas do plexo coróide (March, 2000). Segundo Stoica, Kim, Hall & Coates (2004) o astrocitoma é o tumor do SNC mais comum nos animais; sendo o cão a espécie mais afectada dentro dos animais domésticos. No gato os meningiomas e o linfoma multicêntrico estão documentados como sendo os tumores do SNC mais frequentes (Dickinson *et al.*, 2000 e Long, 2006).

Os tumores cerebrais em cães tendem a ocorrer em animais adultos com mais de cinco anos (Greene & Braund, 1989; Koestner & Higgins, 2002; LeCouteur, 2002; Stoica *et al.*, 2004; O'Brien & Axlund, 2005; e Long, 2006), sendo raramente relatados em animais com idade inferior a um ano (Long, 2006). No entanto, as raças braquicefálicas com mais de dois anos são as que apresentam a maior prevalência de tumores cerebrais (Greene & Braund, 1989 e Long, 2006). Não parece haver, no entanto, nenhuma predisposição de género (LeCouteur, 2002; Stoica *et al.*, 2004; O'Brien & Axlund, 2005; e Long, 2006). Os meningiomas aparecem mais frequentemente em raças dolicocefálicas, enquanto os gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas e gliomas mistos) ocorrem mais frequentemente em raças braquicefálicas (March, 2000; LeCouteur, 2002; Stacy, Stevenson, Lipsitz & Higgins, 2003; O'Brien & Axlund, 2005; e Long, 2006), particularmente no Boxer (Stoica *et al.*, 2004 e Long, 2006), e Boston Terrier (Koestner & Higgins, 2002).

1.1.1.1. Meningiomas

Segundo O'Brien & Axlund (2005), os meningiomas são os tumores intracranianos mais comuns em cães e gatos. São tumores mesenquimatosos que podem ter origem em células das 3 camadas que compõem as meninges: dura-máter, aracnóide (mais comummente) e pia-máter (O'Brien & Axlund, 2005). Noventa e cinco por cento dos meningiomas ocorrem em animais com mais de 7 anos de idade (O'Brien & Axlund, 2005), e segundo Koestner & Higgins (2002) e Long (2006), citados por Stacey *et al.* (2003), estes são os tumores primários do SNC mais comuns no cão, com uma prevalência de aproximadamente 40% entre todos os tumores primários do SNC. Estes tumores são geralmente benignos, únicos,

com crescimento lento, e frequentemente aderentes à dura-máter e leptomeninges (O'Brien & Axlund, 2005 e Long, 2006). Os meningiomas surgem preferencialmente (80%) na superfície dorsal do córtex cerebral e na proximidade da foice do cérebro, embora possam ter outras localizações como no tentório do cerebelo, outras superfícies externas cerebrais, região interventricular próximo do plexo coróide dos ventrículos laterais e 3º ventrículo (Barnhart, Wojcieszyn & Storts, 2002 e O'Brien & Axlund, 2005). Além destas localizações, também podem surgir na medula espinhal e a nível intra-orbitário (O'Brien & Axlund, 2005). Os sinais e sintomas associados aos meningiomas serão abordados no ponto 1.1.3.

1.1.1.2. Gliomas

Os gliomas são também denominados por tumores da glia ou tumores neuroepiteliais e incluem os seguintes tipos: oligodendrogliomas, astrocitomas, tumores das células ependimárias, e tumores do plexo coróide (O'Brien & Axlund, 2005). A verdadeira prevalência dos gliomas, no cão, não é conhecida, mas é definitivamente o tipo de tumor mais frequente a seguir aos meningiomas (O'Brien & Axlund, 2005). Já Koestner & Higgins (2002), citados por Stacey *et al.* (2003) afirmam que a prevalência de oligodendrogliomas no cão é de aproximadamente 10% de todos os tumores primários do SNC. Lipsitz *et al.* (2003) afirmam que os astrocitomas representam 10% dos tumores do SNC no cão, enquanto que os glioblastomas representam 5% de todos os astrocitomas. No Homem, os gliomas são os tumores cerebrais primários mais frequentes no adulto (Sarkar, Jain & Suri, 2009). Os astrocitomas surgem mais frequentemente localizados nos lobos piriformes, hemisférios cerebrais, tálamo, hipotálamo e tronco cerebral (Stoica *et al.*, 2004). No Homem, este é o tipo mais frequente de tumor cerebral, podendo os astrocitomas de elevado grau (maligno) surgirem *de novo* ou a partir de um astrocitoma pré-existente de grau baixo (O'Brien & Axlund, 2005). Os astrocitomas são, no entanto, invariavelmente fatais tanto no cão como no homem (O'Brien & Axlund, 2005). Os sinais e sintomas associados aos gliomas serão abordados no ponto 1.1.3.

1.1.2. Fisiopatologia dos tumores cerebrais

As diferentes doenças podem afectar o sistema nervoso de várias maneiras (Bagley, 2005a). No que respeita às lesões cerebrais estas podem ocorrer por causas endógenas ou exógenas (Bagley & West, 2010). No caso particular das massas intracranianas estas alteram directamente a integridade da estrutura encefálica, afectando o seu equilíbrio fisiológico (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). As massas intracranianas aumentam o volume relativo dentro da cavidade craniana com repercussões na pressão intracraniana

(PIC) (Bagley, 2005a). Uma das consequências mais importantes das lesões estruturais cerebrais é o efeito sobre o fluxo sanguíneo local (Bagley, 2005a). Os vasos sanguíneos cerebrais possuem a capacidade de alterar o seu diâmetro em resposta aos níveis de pressão parcial arterial de CO_2 (PaCO_2); assim à medida que o nível de PaCO_2 aumenta, os vasos cerebrais dilatam para aumentar o fluxo de sangue ao cérebro, e o efeito contrário acontece em resposta à diminuição dos níveis de PaCO_2 (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). Esta forma de regulação do aporte sanguíneo cerebral é conhecida como auto-regulação química (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). O outro mecanismo de regulação do fluxo sanguíneo cerebral é conhecido como auto-regulação de pressão, e varia em função da pressão sanguínea, evitando a hipoperfusão e isquemia em alturas de hipotensão e evitando a hemorragia e o edema em alturas de hipertensão (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). Quando estes mecanismos de auto-regulação estão alterados por lesões estruturais do tecido cerebral, a hiperventilação e consequente diminuição de PaCO_2 , não vai alterar o diâmetro vascular na área afectada podendo resultar em hemorragia e edema cerebral; enquanto a hipoventilação e consequente aumento de PaCO_2 conduzirá a isquemia e hipóxia (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010).

Outro dos efeitos do desenvolvimento de uma massa cerebral para além dos limites de compensação é o aumento da PIC (Bagley & West, 2010). O aumento súbito da PIC pode resultar em deslocamentos do parênquima cerebral ou hérnia cerebral, sendo mais comuns as hérnias transtentorial caudal, subfalcial e através do forâmen magno.

Outra consequência da presença de uma lesão que ocupa espaço intracraniana é o edema cerebral. Este pode ser vasogénico, citotóxico ou intersticial e podem co-existir no mesmo paciente (Bagley, 2005a). O edema citotóxico resulta da incapacidade de extrair o sódio (Na^+) do interior da célula; assim, as células ficam túrgidas e aumentam de tamanho (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). Este tipo de edema ocorre em intoxicações, e em situações de hipóxia e isquemia (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). O edema intersticial resulta da passagem de LCR, através da parede do sistema ventricular, para as zonas periventriculares da substância branca cerebral (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). O edema vasogénico é o que ocorre mais frequentemente associado aos tumores intracranianos, e resulta de lesões vasculares secundárias à alterações da integridade do endotélio vascular das suas junções intercelulares (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). A diferença do gradiente de pressão transmural conduz a uma extravasão de fluido dos vasos para o fluido do espaço extra-celular cerebral (Bagley, 2005a e Bagley & West, 2010). As massas intracranianas que ocupam espaço podem também comprimir o sistema ventricular conduzindo a uma obstrução de fluxo de líquido céfalo-raquidiano (LCR), sendo os locais mais frequentes de obstrução o forâmen interventricular e o aqueduto

mesencefálico, o que conduz ao aumento da PIC e edema intersticial (Bagley 2005a e Bagley & West, 2010).

Uma das consequências mais importantes associada ao desenvolvimento de uma massa intracraniana é o aumento da PIC. Esta é definida como a pressão exercida entre o crânio e os tecidos intracranianos e é mantida estável mesmo perante grandes flutuações da pressão arterial média sistémica (50 a 150mmHg) (Bagley 2005a; Syring, 2005 e Bagley & West, 2010). Sendo o crânio uma estrutura muito pouco elástica comparada com os tecidos intracranianos, a PIC é determinada, fundamentalmente, pela alteração do volume dos tecidos intracranianos e a sua capacidade de compensação face a estas alterações (Bagley 2005a e Bagley & West, 2010). Os três componentes principais que contribuem para o volume intracraniano são: o tecido cerebral (elementos celulares intracranianos), o LCR, e o volume sanguíneo (Syring, 2005 e Bagley & West, 2010). As doenças intracranianas geralmente aumentam o volume de um destes componentes e, conseqüentemente, para que a PIC se mantenha estável é necessário que haja uma diminuição de um ou ambos os restantes componentes (Bagley & West, 2010). Esta capacidade de compensação é, naturalmente, finita e se for ultrapassada, então a PIC aumenta (Bagley & West, 2010). À medida que a PIC aumenta esta dificulta e diminui o fluxo sanguíneo cerebral, diminuindo a pressão de perfusão cerebral, com a conseqüente hipoperfusão cerebral, isquémia dos neurónios, hipóxia, alterações metabólicas, e eventual morte (Bagley 2005a e Bagley & West, 2010). No curso do desenvolvimento das doenças intracranianas o aumento da PIC pode ser temporário ou permanente, dando origem a manifestações clínicas episódicas ou persistentes, respectivamente (Bagley & West, 2010).

1.1.3 Sinais clínicos

O aparecimento e evolução dos sinais clínicos dependem do tipo de tumor e da sua localização (Fenner, 2000; March, 2000; Koestner & Higgins, 2002; e O'Brien & Axlund, 2005). Os sinais podem surgir de forma súbita ou insidiosa e a sua progressão pode ser rápida ou lenta (Greene & Braund, 1989). Long (2006) afirma que, de uma forma geral, os tumores primários apresentam um padrão de crescimento lento, enquanto os tumores secundários e altamente malignos, as metástases e os tumores ósseos apresentam uma progressão mais aguda. As massas extra-axiais tendem a produzir sinais de aparecimento gradual e progressão lenta, enquanto as massas intra-axiais tendem a produzir sinais de aparecimento súbito e progressão rápida (March, 2000). As neoplasias intracranianas geralmente apresentam um aparecimento gradual dos sinais com muitos animais a manifestarem uma longa história de sinais vagos e inespecíficos (LeCouteur, 1999; LeCouteur, 2002 e Lorenz & Kornegay, 2004), por vezes com episódios de evolução aguda

(Lorenz & Kornegay, 2004). Os sinais inespecíficos incluem relutância a serem manipulados, esconderem-se durante o dia, e diminuição da actividade (LeCouteur, 2002). A agudização dos sintomas ocorre quando o tumor intracraniano comprime a massa encefálica causando edema e resultando em sinais declaradamente do foro neurológico (LeCouteur, 1999 e LeCouteur, 2002).

O sistema nervoso central está organizado de uma forma lógica de modo que os sinais clínicos apresentados pelos cães com tumores intracranianos traduzem lesões de áreas neuro-anatómicas bem definidas (Dickinson, 2005). Assim, consoante a área neuro-anatómica afectada, podemos resumir estes sinais da seguinte forma: i) cérebro e diencefalo – alterações do estado mental (depressão, estupor e coma), défices visuais, andamento em círculo, hemiparésia ou tetraparésia, epilepsia e reacções posturais retardadas (Fenner, 2000; March, 2000; O'Brien & Axlund, 2005); ii) cerebelo – ataxia, dismetria, tremores de intenção, reacções posturais atáxicas, inclinação da cabeça, nistagmus (Fenner, 2000; O'Brien & Axlund, 2005); iii) tronco cerebral – défices dos nervos cranianos, nistagmus, fraqueza, reacções posturais retardadas, ataxia, inclinação da cabeça, andamento em círculo, estado mental deprimido (depressão, estupor e coma), depressão respiratória, arritmias, sinais vestibulares (Fenner, 2000; March, 2000; O'Brien & Axlund, 2005); e iv) aparelho vestibular – nistagmus, reacções posturais atáxicas, ataxia, inclinação da cabeça, andamento em círculo, incapacidade de se manter em estação, estrabismo posicional, tónus muscular alterado (Fenner, 2000).

Snyder, Shofer, Van Winkle & Massicotte (2006) numa compilação de sinais e sintomas presentes em 173 casos de tumores intracranianos primários no cão, citam como os mais importantes epilepsia, síndrome vestibular, dor cervical, andamento em círculo, cegueira, alterações do estado mental, anisocoria e regurgitação. A epilepsia está documentada como presente em 46% de cães com tumores intracranianos, tornando-a num dos sintomas mais frequentes (Koestner & Higgins, 2002). Bagley *et al.* (1999) num estudo retrospectivo dos sinais clínicos associados com tumores cerebrais em 97 cães verificou que convulsões estavam presentes em 45% dos animais com tumores cerebrais, tendo encontrado outros sinais e sintomas como andamento em círculo (23%), ataxia (21%), inclinação de cabeça (13%), letargia (11%), andamento compulsivo e estereotipado (10%), alterações comportamentais (7%), cegueira (6%), agressividade (5%), e andar errante (5%). Depressão, anorexia, andamento em círculos, hiperestesia da face, e disfunções oculares estão descritos como associados à presença de um ganglioneuroblastoma cerebral (Kuwamura *et al.*, 2004). Porter, Lahunta & Summers (2003), num artigo acerca de 6 casos de gliomatose cerebral descrevem défices dos pares cranianos, anomalias posturais, ataxia, andamento em círculo, depressão, inclinação da cabeça, pressão da cabeça contra objectos e alterações da marcha como sintomas observados. No caso de tumores da hipófise,

nomeadamente carcinoma, estão documentados letargia, relutância em brincar e passear, urinar em casa, deficits proprioceptivos, depressão, anorexia, andamento compulsivo e estereotipado, andamento em círculos, pressão da cabeça contra objectos e vômito (Puente, 2003).

No Homem, Wilne *et al.* (2007) num artigo de revisão, realizado no sentido de tentar estabelecer um conjunto de sinais e sintomas que servissem de indicadores da presença de lesões do SNC em crianças, relata como sintomas mais frequentes os seguintes: dor de cabeça (33%), náusea e vômito (32%), alterações do andamento e coordenação (27%), e papiloedema (13%) no caso de tumores intracranianos; náusea e vômito (75%), cefaleias (67%), alterações do andamento e coordenação (60%), e papiloedema (34%) no caso de tumores infratentoriais; sintomas inespecíficos e sinais de aumento da pressão intracraniana (47%), convulsões (38%) e papiloedema (21%) no caso de tumores supratentoriais; e cefaleias (49%), movimentos oculares anómalos (21%), estrabismo (21%), e náusea e vômito (19%) no caso de tumores cerebrais.

É importante salientar que, no cão, estes sinais e sintomas podem estar associados a lesões cerebrais de natureza não tumoral como por exemplo enfartes hemorrágicos cerebrais (Tidwell, Mahony, Moore & Fitzmaurice, 1994). Assim, as neoplasias deverão constituir um diagnóstico primário na maioria das lesões cerebrais que ocupam espaço, desde que enquadradas num quadro clínico apropriado (Kraft & Gavin, 1999).

1.1.4 Diagnóstico

Surpreendentemente, existe um número limitado de meios de diagnóstico *ante-mortem* disponíveis e úteis para identificar doenças intracranianas nos animais (Oliver *et al.*, 1987; Chrisman, 1991; Braund, 1994; Oliver *et al.*, 1997; e Dewey, 2003, citados por Bagley, 2005a). Mesmo em Medicina Humana, e apesar dos avanços em neuroimagem, um diagnóstico atempado de tumores do SNC ainda é difícil (Wilne *et al.*, 2007).

A radiografia convencional só se revela útil quando existem alterações dos ossos do crânio (LeCouteur, 2002 e Bagley, 2005a), como fracturas, e lise / esclerose das bolhas timpânicas, não permitindo avaliar o parênquima cerebral (LeCouteur, 1999 e Bagley, 2005a). Outros exames complementares de diagnóstico compreendem a colheita e análise do LCR, a electroencefalografia (EEG) e testes electrofisiológicos como os potenciais auditivos cerebrais evocados (BAER) (LeCouteur, 1999; Bagley, 2005a; e O'Brien & Axlund, 2005). É importante frisar que o diagnóstico etiológico definitivo só é possível mediante exame histopatológico após excisão cirúrgica ou biópsia (LeCouteur, 2002).

A análise do LCR destina-se, sobretudo, a diagnosticar doenças do foro inflamatório que envolvem o espaço sub-aracnóideu (LeCouteur, 2002 e Bagley, 2005a). Bagley (2005a) e

O'Brien & Axlund (2005) acrescentam ainda que, mesmo que, após a realização de citologia do líquido céfalo-raquidiano se suspeite de uma neoplasia cerebral, aquela é geralmente não específica do tipo de tumor ou da sua localização. Classicamente, a análise do LCR em animais com tumores intracranianos apresenta um aumento das proteínas (LeCouteur, 2002; Stoica *et al.*, 2004; e Bagley, 2005a), sem pleocitose concomitante (dissociação albuminocitológica) (Bagley, 2005a). Ainda que a presença de células tumorais no LCR seja específica para algumas doenças neoplásicas (linfoma, carcinomatose e tumores do plexo coróide), raramente o é (< 2% dos casos) para animais com tumores primários cerebrais (Bagley, 2005a).

A EEG regista a actividade eléctrica cerebral e pode elucidar sobre disfunções cerebrais episódicas como a narcolepsia e a epilepsia (Bagley, 2005a). No entanto, a EEG nos animais de companhia não é tão eficaz na localização de lesões como no Homem, pois os cães e gatos possuem um cérebro relativamente pequeno que é protegido por uma abóbada craniana espessa, assim como por poderosos músculos mastigadores (O'Brien & Axlund, 2005).

Os testes BAER avaliam a integridade das vias da audição localizadas no tronco cerebral (Fisher & Obermaier, 1994 e Steiss *et al.* 1994, citados por Bagley, 2005a).

O exame histopatológico pode ser obtido por necrópsia (Bagley, 2005a e O'Brien & Axlund, 2005) ou, alternativamente, em vida mediante realização de biópsia estereotática guiada por tomografia axial computadorizada (TAC) (Moissonnier, Bordeau, Delisle & Devauchelle, 2000; LeCouteur, 2002; Moissonnier *et al.*, 2002; Bagley, 2005a; e O'Brien & Axlund, 2005) biópsia guiada por ecografia (LeCouteur, 2002 e O'Brien & Axlund, 2005), ou ainda por esfregaço obtido intra-operatoriamente (Vernau *et al.* 2001).

A TAC juntamente com a ressonância magnética (RM) constituem, actualmente, as técnicas mais específicas e sensíveis para a avaliação de lesões intracranianas (Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; Stoica *et al.*, 2004; Bagley, 2005a; e O'Brien & Axlund, 2005), e serão abordadas seguidamente.

1.2. TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTORIZADA

1.2.1. Aplicações e limitações da TAC

Como se disse anteriormente, existe um número limitado de meios complementares de diagnóstico para identificar doenças cerebrais nos animais. Felizmente, a TAC juntamente com a RM constituem, actualmente, as técnicas mais específicas e sensíveis para a avaliação de lesões intracranianas (Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; Bagley, 2005a;

O'Brien & Axlund, 2005 e Pollard, Reilley, Uerling, Wood & Feldman, 2010). As principais vantagens da TAC sobre a radiografia são a capacidade de detectar alterações mais subtis da densidade dos tecidos, a eliminação de sobreposições de estruturas anatómicas e a capacidade de ajustar a imagem de acordo com as necessidades no sentido de melhorar a visualização das diferentes estruturas (Jones, 2004), sem ser um método invasivo (LeCouteur, Fike, Cann & Pedroia, 1981). Tanto a TAC como a RM são capazes de produzir imagens de alta resolução do cérebro e, após a administração de contraste endovenoso, proporcionar uma maior precisão na detecção de massas intracranianas (Pollard et al, 2010).

As aplicações mais comuns em Medicina Veterinária, e no que diz respeito à cabeça, incluem a suspeita de neoplasias intracranianas, doenças cerebrais não neoplásicas ou patologia do ouvido médio / interno (Jones, 2004).

Em TAC uma alteração da densidade nas imagens obtidas depende da presença de anomalias físicas, graves o suficiente para alterarem as propriedades de atenuação da radiação X por parte desses tecidos (Kraft & Gavin, 1999). Os infiltrados celulares raramente alteram a densidade do cérebro dos cães e gatos a ponto de se conseguir distinguir do tecido cerebral normal (Kraft & Gavin, 1999). Assim, muitos tumores cerebrais são isodensos (apresentam a mesma densidade do tecido cerebral normal), antes da administração do meio de contraste, tornando a sua administração um procedimento essencial à detecção da maioria dos tumores cerebrais em TAC (Kraft & Gavin, 1999). Mesmo após administração de contraste, algumas massas cerebrais de crescimento lento (como os gliomas infiltrativos) poderão não conseguir ser detectados na TAC se houver uma captação discreta ou nula do meio de contraste, devido a uma barreira hemato-encefálica normal (impermeável) (Kraft & Gavin, 1999). Num estudo de TAC em 50 cães com tumores cerebrais, 3 não foram detectados por falta de captação de meio de contraste, e 1 por ter um tamanho muito reduzido (3mm) (Kraft & Gavin, 1999). Uma outra desvantagem da TAC é a dificuldade de avaliação do tronco cerebral (LeCouteur *et al.* 1981; Kraft & Gavin, 1999; LeCouteur, 2002 e O'Brien & Axlund, 2005) e cerebelo, devido aos artefactos criados pelo feixe ao atravessar a espessa porção petrosa do osso temporal da base do crânio (LeCouteur *et al.* 1981; Kraft *et al.*, 1997; Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; e O'Brien & Axlund, 2005); no entanto a TAC continua a ser superior à RM no que diz respeito à detecção de lesões ósseas como erosões e mineralizações localizadas (Pollard *et al.*, 2010). Pelo explicado anteriormente, a utilização de RM é considerada o método de diagnóstico de lesões intracranianas mais apropriado, pois esta tecnologia permite a obtenção de um detalhe dos tecidos moles, sem interferência das estruturas ósseas circundantes (O'Brien & Axlund, 2005). À semelhança do que acontece com a TAC, o exame de ressonância

magnética deve incluir um estudo pré e um estudo pós-contraste (gadólíno por via endovenosa) (O'Brien & Axlund, 2005).

Em TAC as doenças cerebrais apresentam as seguintes características gerais: uma massa visível; alteração do volume, forma ou posição do sistema ventricular; desvio da foice do cérebro; e alteração focal da opacidade do tecido cerebral (Jones, 2004).

1.2.2. Diagnóstico e padrões imagiológicos

Em Neurologia Veterinária, a aplicação recente das técnicas de TAC e RM melhoraram de forma significativa a capacidade de detectar e localizar uma variedade grande de lesões intracranianas (Kraft & Gavin, 1999; Vernau *et al.*, 2001; e Bagley, 2005a). Com o auxílio destas tecnologias consegue-se informação precisa sobre as margens e localização neuroanatômica dos tumores, muitas vezes necessária para uma biópsia, cirurgia ou radioterapia (March, 2000). A análise de alguns parâmetros imagiológicos de TAC e RM, como o número, origem e localização anômica, forma, margens, densidade em TAC e intensidade em RM, captação de contraste e patologia associada poderá ser importante para distinguir os tumores intracranianos (Kraft & Gavin, 1999). Contudo, a distinção entre lesões inflamatórias e neoplásicas e, por vezes, entre diferentes tipos de tumores é impossível ser feita com base apenas nas características imagiológicas de TAC ou RM e nos sinais clínicos (Platt, Alleman, Lanz & Chrisman, 2002). Desta forma, e como já foi mencionado anteriormente, o diagnóstico definitivo das lesões intracranianas carece da respectiva caracterização histopatológica (LeCouteur, 2002; Jones, 2004; Stoica *et al.*, 2004; Bagley, 2005a; O'Brien & Axlund, 2005; e Long, 2006).

No que diz respeito às características imagiológicas, os tumores cerebrais podem ser analisados segundo vários parâmetros:

1- Quanto ao número de lesões, a maioria dos tumores primários intracranianos apresentam uma única lesão (Kraft & Gavin, 1999 e Bagley, 2005a), constituindo as exceções o linfossarcoma primário cerebral, e os meningiomas felinos, que podem apresentar múltiplas lesões (Kraft & Gavin, 1999). As metástases cerebrais podem surgir como uma lesão única ou como massas múltiplas (Kraft & Gavin, 1999 e Jones, 2004).

2- Quanto à origem axial e região anômica, os tumores cerebrais podem-se classificar em intra ou extra-axiais. Os tumores extra-axiais como os meningiomas, tumores da pituitária e papilomas do plexo coróide têm origem em tecidos extraneuronais e geralmente são periféricos, comprimindo o tecido cerebral; enquanto os tumores intra-axiais como os oligodendrogliomas, astrocitomas e ependimomas crescem radialmente a partir de um ponto do eixo neuronal (Kraft & Gavin, 1999; March, 2000; e Jones, 2004).

O tentório ósseo do cerebelo é outra estrutura anatômica que pode ser usada como referência para a localização das lesões intracranianas (Long, 2006). Assim, os tumores do tronco cerebral e cerebelo podem ser chamados de infratentoriais ou da fossa posterior, enquanto os tumores dos hemisférios cerebrais e tálamo são chamados de supratentoriais ou da fossa anterior (Plummer *et al.*, 1992 e Long, 2006).

Ainda a respeito da localização preferencial dos tumores cerebrais, os astrocitomas e glioblastomas surgem mais frequentemente nos lobos piriformes, convexidade dos hemisférios cerebrais, tálamo e hipotálamo; os oligodendrogliomas nos hemisférios cerebrais; os espongiblastomas nas superfícies endimárias, cerebelo e tracto/nervo óptico; os meduloblastomas no cerebelo; outros gliomas não classificados nas áreas periventriculares dos hemisférios cerebrais; e os meningiomas na convexidade dos hemisférios cerebrais, pavimento da caixa craniana (Greene & Braund, 1989), ou adjacente ao tentório ósseo do cerebelo (Kraft *et al.*, 1997 e Kraft & Gavin, 1999). Os tumores da hipófise são encontrados na região selar e supra-selar e expandindo-se para o diencéfalo, sendo mais facilmente detectáveis por RM (Bagley, 2005a)

3- No que diz respeito à forma, margens e padrões de crescimento dos tumores intracranianos, estas características podem, por vezes, ser típicas de um particular tipo de tumor. Os meningiomas tendem a ser lenticulares, com uma base larga ou ter a forma de placas (Kraft *et al.*, 1997; Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; e Bagley, 2005a) podendo alguns conter zonas hemorrágicas ou estar mineralizados (Bagley, 2005a). Os tumores hipofisários apresentam geralmente uma forma ovóide ou esférica bem definida na região supra-selar (Kraft *et al.*, 1997; Kraft & Gavin, 1999; e Jones, 2004). Já os endimomas e tumores do plexo coróide tendem a ser circunscritos, lisos ou lobulados e associados ao sistema ventricular cerebral (Kraft & Gavin, 1999). Os astrocitomas, oligodendrogliomas e linfossarcomas são tipicamente amorfos e infiltrativos com margens mal definidas, ou podem manifestar-se como um processo infiltrativo difuso do parênquima ou das leptomeninges (Kraft *et al.*, 1997 e Kraft & Gavin, 1999). As massas de crescimento lento como os meningiomas e macroadenomas hipofisários comprimem e deslocam as estruturas cerebrais normais, comparativamente com os tumores agressivos como os gliomas que invadem e substituem as estruturas cerebrais adjacentes (Kraft & Gavin, 1999). Estas características dos padrões de crescimento são melhor apreciadas na RM do que na TAC (Kraft & Gavin, 1999).

4- Quanto à densidade em TAC, muitos tumores cerebrais são isodensos antes da administração do meio de contraste (Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; Polizopoulos *et al.* 2004; e Bagley, 2005a). Regra geral, os meningiomas tendem a ser isodensos e hiperdensos antes da administração de contraste (Kraft & Gavin, 1999); enquanto, geralmente, os gliomas são hipodensos ou isodensos em TAC, podendo ser difíceis de

detectar em alguns exames de TAC (Bagley, 2005a). Uma massa confinada dentro do parênquima cerebral é característica de um glioma tanto em TAC como em RM (Bagley, 2005a).

5- A respeito da patologia associada (edema, necrose, hemorragia) aos tumores intracranianos, esta é geralmente inespecífica (Kraft & Gavin, 1999). Patologia associada como edema, necrose e as hemorragias crônicas (> 72 horas) são hipodensos, enquanto a hemorragia aguda (< 72 horas) ou mineralização são hiperdensos (Tidwell *et al.* 1994; Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; e Bagley, 2005a). O efeito de massa pode ser detectado como zonas de edema, compressão, deslocação ou destruição dos limites anatômicos normais (Kraft & Gavin, 1999).

6- No que diz respeito à dimensão do sistema ventricular cerebral, a hidrocefalia pode ser generalizada ou localizada, sendo a localizada geralmente obstrutiva, enquanto a generalizada é geralmente não-obstrutiva (Jones, 2004). A hidrocefalia é causada por tumores localizados no, ou na proximidade, do sistema ventricular cerebral (Kraft & Gavin, 1999 e Jones, 2004), como é o caso dos tumores do plexo coróide (Bagley, 2005a e O'Brien & Axlund, 2005).

7- Quanto à intensidade de captação de contraste e seu padrão, os tumores de origem extra-axial tendem a captar contraste intensa e uniformemente, pois os tecidos onde têm origem carecem de uma barreira hemato-encefálica restritiva (Kraft & Gavin, 1999 e Jones, 2004). No entanto, captação de contraste não-uniforme, e captação em anel (mesmo na ausência de uma estrutura quística) também pode ocorrer em meningiomas (Kraft & Gavin, 1999). Os macroadenomas da hipófise são facilmente reconhecidos por uma captação forte e uniforme de contraste (Kraft & Gavin, 1999 e Jones, 2004). Já os microadenomas da hipófise colocam muitos problemas de diagnóstico, pois a hipófise normal capta contraste (Jones, 2004), ocultando por vezes as pequenas lesões neoplásicas da hipófise (Kraft & Gavin, 1999). Os tumores do plexo coróide frequentemente apresentam uma forte captação de contraste em virtude da riqueza e concentração de vasos sanguíneos desta estrutura anatômica cerebral (Bagley, 2005a e O'Brien & Axlund, 2005). Os tumores de origem intra-axial apresentam uma variação grande no padrão de captação de contraste, e que normalmente traduz o seu comportamento biológico. Assim, os tumores intra-axiais mais benignos podem variar desde a não captação de contraste até uma captação forte e uniforme (Kraft & Gavin, 1999). Os tumores intra-axiais mais agressivos podem captar contraste em intensidade variável num padrão não-uniforme, ou em anel, resultado da presença de necrose, hemorragia ou quistos associados (Kraft & Gavin, 1999). É de realçar que o padrão de captação de contraste em anel não é específico do tipo de tumor, nem sequer de uma lesão neoplásica, já que este tipo de padrão de captação de contraste tem sido encontrado em lesões cerebrais não-neoplásicas (Kraft & Gavin, 1999).

8- No que respeita à distinção imagiológica entre lesões neoplásicas e não-neoplásicas, nem sempre esta é possível pois as últimas apresentam características semelhantes às primeiras (Plummer *et al.*, 1992 e Kraft & Gavin, 1999). As doenças inflamatórias cerebrais podem surgir como lesões de captação de contraste únicas ou multifocais (Jones, 2004).

1.3. HISTOPATOLOGIA

A classificação das neoplasias do SNC nos animais domésticos é fundamental para a comunicação entre patologistas e clínicos, assim como entre especialistas do ramo da Medicina Veterinária e Medicina Humana (Koestner & Higgins, 2002). Assim, para tentar uniformizar os critérios de classificação destes tumores, a Organização Mundial de Saúde reuniu uma comissão de patologistas e elaboraram um Sistema Internacional de classificação dos tumores do SNC; tendo sido publicada a 1ª classificação para os animais domésticos em 1974 (Koestner & Higgins, 2002). Em 1993 foi publicada, para a Medicina Humana, a última versão deste Sistema Internacional de Classificação, tendo sido revista, actualizada e publicada para Medicina Veterinária em 1999. Actualmente, incluindo o nosso trabalho, a classificação dos tumores do SNC rege-se pelas indicações contidas na Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) – Classificação Histológica dos Tumores do Sistema Nervoso Central dos Animais Domésticos - de Koestner, Bilzer, Fatzer, Schulman, Summers & Van Winkle (1999).

Sumariamente este sistema de classificação agrupa os tumores do SNC da seguinte forma:

- A) Tumores dos tecidos neuroepiteliais
 - A.1.) Tumores astrocíticos
 - A.1.1.) Astrocitoma de grau baixo (bem diferenciados)
 - A.1.1.1.) Astrocitoma fibrilar
 - A.1.1.2.) Astrocitoma protoplasmático
 - A.1.1.3.) Astrocitoma gemistocítico
 - A.1.2.) Astrocitoma de grau médio (anaplásico)
 - A.1.3.) Astrocitoma de grau elevado (glioblastoma)
 - A.2.) Tumores oligodendrogliais
 - A.2.1.) Oligodendroglioma
 - A.2.2.) Oligodendroglioma anaplásico (maligno)
 - A.3.) Outros gliomas
 - A.3.1.) Glioma misto (oligoastrocitoma)
 - A.3.2.) Gliossarcoma
 - A.3.3.) Gliomatose cerebral

- A.3.4.) Espongioblastoma
- A.4.) Tumores ependimários
 - A.4.1.) Ependimoma
 - A.4.2.) Ependimoma anaplásico (maligno)
- A.5.) Tumores do plexo coróide
 - A.5.1.) Papiloma do plexo coróide
 - A.5.2.) Carcinoma do plexo coróide
- A.6.) Tumores neuronais e tumores mistos neurono-gliais
 - A.6.1.) Gangliocitoma
 - A.6.2.) Ganglioglioma
 - A.6.3.) Neuroblastoma olfatório (estesioneuroblastoma)
- A.7.) Tumores embrionários
 - A.7.1.) Tumores primitivos neuroectodérmicos (PNET)
 - A.7.1.1.) Meduloblastoma
 - A.7.1.2.) PNETs, excluindo os de origem cerebelar
 - A.7.2.) Neuroblastoma
 - A.7.3.) Ependimoblastoma
 - A.7.4.) Tumores da medula espinhal toraco-lombar de cães jovens
- A.8.) Tumores parenquimatosos pineais
 - A.8.1.) Pineocitoma
 - A.8.2.) Pineoblastoma
- B) Tumores das meninges
 - B.1.) Tumores das células menigoteliais
 - B.1.1.) Meningioma
 - B.1.1.1.) Meningioma menigoteliomatoso
 - B.1.1.2.) Meningioma fibroso (fibroblástico)
 - B.1.1.3.) Meningioma de transição (misto)
 - B.1.1.4.) Meningioma psamomatoso
 - B.1.1.5.) Meningioma angiomatoso (angioblástico)
 - B.1.1.6.) Meningioma papilar
 - B.1.1.7.) Meningioma de células granulares
 - B.1.1.8.) Meningioma mixóide
 - B.1.1.9.) Meningioma anaplásico (maligno)
 - B.2.) Tumores mesenquimatosos não menigoteliais
 - B.2.1.) Fibrosarcoma
 - B.2.2.) Sarcomatose meningeal difusa

- C) Linfomas e tumores hemato-poiéticos
 - C.1.) Linfoma (linfosarcoma)
 - C.2.) Neoplasias leucocíticas não-B e não-T (reticulose neoplásica)
 - C.3.) Microgliomatose
 - C.4.) Histiocitose maligna

- D) Tumores da região selar
 - D.1.) Tumores supra-selares das células germinais
 - D.2.) Adenoma da pituitária
 - D.3.) Carcinoma da pituitária
 - D.4.) Craniofaringioma

- E) Outros tumores primários e quistos
 - E.1.) Hamartoma vascular
 - E.2.) Quisto epidermóide
 - E.3.) Quisto pituitário
 - E.4.) Outros quistos

- F) Tumores metastáticos

- G) Extensões locais de tumores regionais
 - G.1.) Carcinoma nasal
 - G.2.) Tumores ósseos multilobulares
 - G.3.) Cordoma

- H) Tumores do sistema nervoso periférico
 - H.1.) Ganglioneuroma
 - H.2.) Neuroblastoma periférico
 - H.3.) Paraganglioma
 - H.4.) Tumores da bainha dos nervos periféricos
 - H.4.1.) Tumores benignos (Schwanoma, Neurofibroma)
 - H.4.2.) Tumores malignos (Schwanoma maligno, neurofibrosarcoma)

1.4. O GENE p53 E O SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE UMA NEOPLASIA

1.4.1. Definição de neoplasia e cancro

Uma neoplasia é entendida como um novo crescimento de células que: (i) proliferam autonomamente sem controlo; (ii) assemelham-se, em graus variáveis, morfológica e funcionalmente com as células normais a partir das quais são originárias; (iii) não apresentam um padrão ordenado de crescimento; (iv) não apresentam uma função útil para o seu hospedeiro e; (v) resultam de uma série de processos capazes de alterar os mecanismos moleculares envolvidos no controlo da normal proliferação e da diferenciação das células (Jones, Hunt, & King, 1997).

A designação de cancro é comumente utilizada para referir uma neoplasia maligna, sem referência a qualquer tipo celular (Jones, Hunt, & King, 1997).

Embora o cancro seja complexo, e factores ambientais e outros não genéticos tenham um papel claro em vários estadios do processo neoplásico, o grande progresso que se tem feito para compreender a tumorigénese deve-se à descoberta de genes que, quando mutados, conduzem ao desenvolvimento do cancro (Kinzler & Vogelstein, 2002). Por outro lado, muitas vezes, um defeito genético por si só não é suficiente para o desenvolvimento de uma neoplasia, manifestando-se este apenas quando há uma acumulação de mutações somáticas (Ziyaie, Hupp & Thompson, 2000 e Kinzler & Vogelstein, 2002). Estes eventos conduzem a uma proliferação celular descontrolada e não programada com consequente imortalização celular e capacidade de invasão de outros tecidos (Zuckerman, Wolynec, Sionov, Haupt & Haupt, 2009).

1.4.2. Genes supressores tumorais e oncogenes

Muitos cancros partilham uma patogénese molecular e todos resultam de defeitos em oncogenes e genes supressores tumorais (Kinzler & Vogelstein, 2002). Um exemplo de um destes genes supressores tumorais é o gene p53 que, quando mutado, está na origem de cancro cerebral, do cólon, mama, estômago, bexiga, pâncreas (Kinzler & Vogelstein, 2002), carcinoma pulmonar de células pequenas (Kmet, Cook & Magliocco, 2003), osteossarcoma, e cancro do pulmão (Setoguchi *et al.* 2001a) em Humanos. Lane (1992) citado por Royds & Iacopetta (2006) considera que o gene p53 é, provavelmente, o gene mais significativo na supressão cancerosa. Ziyaie *et al.* (2000), Setoguchi *et al.* (2001a) e Zuckerman *et al.* (2009) afirmam mesmo que o gene p53 apresenta mutações em cerca de 50% a 55% dos cancros em Medicina Humana. Segundo Ziyaie *et al.* (2000) o gene p53 apresenta mutações ou sobre-expressão em 52% dos cancros da mama primários.

Os genes supressores tumorais, como o gene p53, participam na regulação do ciclo celular, podendo inibir a proliferação através da paragem do ciclo celular em estádios específicos, chamados pontos de controlo (“checkpoints”) (Rudin & Thompson, 2002; Zuckerman *et al.* 2009). Na sua forma “wild-type” ou nativa (sem mutações) o gene p53 funciona como um regulador da transcrição, estabilizador do genoma, inibidor da progressão do ciclo celular e indutor da apoptose (Kumaraguruparan, Prathiba & Nagini, 2006 e Wang & Sun, 2010). Nas células de mamíferos, além de inibirem a progressão do ciclo celular de células anómalas, os pontos de controlo desempenham uma função muito mais importante ao despoletar a apoptose (morte celular programada), e a induzir a senescência (paragem irreversível do crescimento) removendo do organismo células potencialmente anómalas (Rudin & Thompson, 2002; Zuckerman *et al.* 2009 e Wang & Sun, 2010). A capacidade de iniciar um processo apoptótico é uma característica partilhada por todas as células do corpo, desde as linhagens celulares de multiplicação rápida como os leucócitos, até às células de longevidade prolongada como as células nervosas (Rudin & Thompson, 2002). Quando induzido, em resposta a uma lesão no ácido desoxirribonucleico (DNA), seja ela provocada por hipóxia, golpe de calor, radiação ionizante, radiação ultravioleta ou por agentes quimioterápicos (Kmet *et al.*, 2003 e Ziyaie *et al.*, 2000), o p53 provoca uma paragem do ciclo celular em G1 (Rudin & Thompson, 2002), permitindo a reparação do DNA lesado (Sarkar, Mukhopadhyay & Sharma, 2002 e Ziyaie *et al.*, 2000). Dados recentes mostram que o gene p53 também desempenha um importante papel na angiogénese e invasão tumoral, duas características fundamentais de malignidade (Fulci, Ishii & Van Meir, 1998, citados por Sarkar *et al.*, 2002; e Wang & Sun, 2010).

Quando ocorre a activação de um oncogene (formas alteradas de genes celulares normais, altamente conservados ao longo da evolução chamados proto-oncogenes, e que são importantes reguladores do crescimento celular) (Park, 2002), simultaneamente com a inactivação de um gene supressor tumoral e mutação em genes que regulam a apoptose, estão reunidas as condições para a tumorigénese e metastização (Rudin & Thompson, 2002).

1.4.3. O gene p53 nos tumores cerebrais e suas mutações

O gene p53 é o gene que mais vezes é alvo de alterações genéticas nos tumores humanos (Patt *et al.*, 1996; Wynford-Thomas, 1996; Ziyaie *et al.*, 2000; Nassir, Rutteman, Reid, Schulze & Argyle (2001); Sarkar *et al.*, 2002; Glazko, Koonin & Rogozin, 2004; Royds & Iacopetta, 2006; e Zuckerman *et al.* 2009). Isto deve-se talvez ao facto do gene p53 estar envolvido numa série de vias biológicas moleculares (Sarkar *et al.*, 2002). O gene p53

apresenta frequentemente mutações no cancro da mama, do cólon e também, embora menos frequentemente, nos glioblastomas (Royds & Iacopetta, 2006).

Em Humanos, já foram identificados diversos “hot-spots” de mutações no gene p53, todos eles ocorrendo em quatro regiões altamente conservadas (entre espécies) de sequências de amino-ácidos localizadas entre os exões 5 e 8 (Hollstein *et al.*, 1994; Kraegel, Pazzi & Madewell, 1995; Chu *et al.*, 1998; Hayes *et al.*, 1999; Patt *et al.*, 1999; Loukopoulos, Thornton & Robinson, 2003; Royds & Iacopetta, 2006; e Yonemaru *et al.*, 2007), sendo os codões mais afectados os seguintes: 175, 245, 248, 249 e 273 (Hollstein *et al.*, 1994 e Royds & Iacopetta, 2006). Estas mutações correspondem maioritariamente a substituições de um único aminoácido (mutações “missense”) (Patt *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2002; e Glazko *et al.* 2004).

Em Medicina Veterinária, foram encontradas mutações do gene p53 num pequeno número de tipos de tumores (Veldhoen & Milner, 1998 e Nassir *et al.*, 2001), nomeadamente: carcinoma da tiróide, papiloma oral, tumores mamários, osteossarcoma, adenoma das glândulas circunanaís e linfoma (Veldhoen & Milner, 1998 e Muto *et al.* 2000). Setoguchi *et al.* (2001a) num estudo de mutações do gene p53 (exão 4 a exão 8) em 15 tumores, encontrou 30 mutações (entre mutações pontuais – silenciosas e “missense” – deleções e inserções) em 7 casos (1 linfoma maligno, 1 leucemia monocítica, 1 rabiomiossarcoma, 1 cancro do cólon, e 3 osteossarcomas) de tumores espontâneos no cão, tendo todos eles apresentado mais do que uma mutação. Kirpensteijn, Kik, Teske & Rutteman (2008) relatam que a prevalência de mutações em p53 em tumores de cães varia entre 24% e 47%. Nassir *et al.* (2001) num estudo de 30 tumores primários (sarcomas de tecido mole) no cão, encontraram 6 casos de mutações (5 mutações “missense” e uma mutação pontual silenciosa) de p53 localizadas nos exões 6, 7 e 8. As mutações encontradas por Nassir *et al.* (2001) têm correspondência com os codões “hot-spot” 248 e 273 dos humanos. Mayr, Dressler, Reifinger & Feil (1998) num estudo dos exões 5, 6, 7 e 8 do gene p53, encontraram uma mutação “missense” de p53 num tumor mamário de cão localizada no codão 249 (exão 7) que é reconhecido como sendo um “hot-spot” para mutações de p53 em Medicina Humana. Muto *et al.* (2000) num estudo de 63 tumores mamários (benignos e malignos) do cão encontraram 10 mutações (4 mutações “missense” em tumores benignos, e 1 mutação “nonssense” e 5 “missense” em carcinomas mamários) em 9 tumores mamários. Lee *et al.* (2004) também detectou mutações em p53 tanto em carcinomas mamários como em tumores benignos mamários. Chu *et al.* (1998) verificaram que 6 em 40 carcinomas mamários apresentavam mutações de p53. Já em hemangiosarcomas de cães, Yonemaru *et al.* (2007) não encontraram nenhuma mutação em p53 (de exão 4 a exão 8). No único artigo (do meu conhecimento) de Medicina Veterinária que estudou as mutações de p53 em tumores cerebrais de cão, nomeadamente astrocitomas; dos 12 casos

estudados, Stoica *et al.* (2004), apenas encontrou uma mutação com substituição de um aminoácido (mutação “missense”) num glioblastoma multiforme. Apesar das neoplasias nos cães serem clinicamente semelhantes às das Humanas (Setoguchi *et al.* 2001a), o conhecimento das vias e bases moleculares, e da citogenética, conducentes à tumorigénese no cão ainda é escasso (Mayr *et al.*, 1998 e Setoguchi *et al.* 2001a), e o seu estudo considerado ainda uma novidade (Stoica *et al.*, 2004). Aliás, segundo Selvarajah *et al.* (2009) o uso de marcadores genéticos para o diagnóstico e/ou prognóstico de tumores no cão ainda não foi realizado.

Segundo Sarkar *et al.* (2002), as mutações de p53 podem ter as seguintes consequências: i) perda de função de p53 “wild-type”; ii) dominância da proteína mutante sobre a proteína “wild-type”; ou iii) aquisição de poder transformante de p53 mutante, independente do seu efeito sobre p53 “wild-type”.

No homem, onde as vias moleculares da tumorigénese estão mais bem estudadas, e no que concerne aos tumores cerebrais, dentro das alterações genéticas associadas aos oligodendrogliomas de grau II incluem-se as seguintes: perda de heterozigidade dos cromosomas 1p, 19q e 4q, e sobre-expressão do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR), receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), e factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); enquanto que os oligodendrogliomas anaplásicos (grau III) podem apresentar as seguintes alterações genéticas: mutação/delecção de *cdkn2A* e *cdkn2C*, amplificação de *cdk4*, *EGFR* e *myc*, perda de heterozigidade em 1p, 19q, 9q e 10q e expressão de receptor do factor de crescimento endotelial vascular (VEGFR) (Sarkar *et al.* 2009). Segundo Tong *et al.* (1999) as mutações de p53 são raras, e estas parecem surgir sobretudo naqueles oligodendrogliomas com uma significativa diferenciação astrocítica.

Segundo Collins (2002 e 2004) e Sarkar *et al.* (2009), mais de 60% dos astrocitomas (grau II) apresentam perda do alelo “wild-type”, que inclui o “locus” de p53, apresentando, na maioria dos casos, o restante alelo mutação; evento este que conduz a uma via p53 não funcional. Ainda segundo Collins (2002 e 2004), uma pequena percentagem daquele tipo de tumores apresenta mutação num dos alelos com manutenção do alelo “wild-type”. Uma vez que a proteína codificada pelo gene p53 funciona como um tetrâmero e estes não funcionam normalmente, mesmo que com apenas um dos componentes alterados, a existência de mutações em apenas um dos alelos pode ser significativa (Collins, 2002 e Collins, 2004). Os astrocitomas anaplásicos (grau III) apresentam sensivelmente as mesmas alterações genéticas que os astrocitomas de grau II, só que com uma frequência mais elevada (Collins, 2002). Outras alterações genéticas associadas aos astrocitomas incluem: sobre-expressão do receptor A do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), delecções nos

cromossomas 6, 9p (genes *cdkn2A*, *p14^{ARF}* e *cdkn2B*), 11p, 19p, 22p, amplificação do gene *cdk4*, mutações no gene *Rb1*, e amplificação do gene *EGFR* (Sarkar *et al.*, 2009).

No caso dos astrocitomas pilocíticos o papel de *p53* ainda é controverso, enquanto que no caso dos gliossarcomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas mistos apresentam mutações em *p53* (Sarkar *et al.*, 2002). Curiosamente os astrocitomas pilocíticos parecem não ter mutações de *p53* (Patt *et al.* 1996; Cheng *et al.*, 2000; e Sarkar *et al.*, 2009). Já os astrocitomas gemistocíticos apresentam uma prevalência de mutações de *p53* elevada (60%) (Kosel, Scheithauser & Graeber, 2001), podendo atingir mesmo os 80% (Sarkar *et al.*, 2009).

No Homem, actualmente são reconhecidos dois tipos distintos de glioblastomas (grau IV) baseado no tipo de alterações genéticas, e vias moleculares, que os caracterizam: i) os glioblastomas primários (também chamados glioblastomas *de novo*) poucos apresentam mutações de *p53* (28%), mas são caracterizados por perda de heterozigosidade envolvendo o cromossoma 10 (70%) (Cheng *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2002; e Ohgaki & Kleihues, 2007), amplificação de *EGFR* (36%), deleção *p16^{INK4a}* (31%), e mutações em *PTEN* (25%) (Ohgaki & Kleihues, 2007), sendo mais comuns em pacientes mais velhos (média de 62 anos) (Rushing, Watson, Schold, Land & Kokkinakis, 1998; Cheng *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; e Ohgaki & Kleihues, 2007), e apresentando uma evolução clínica agressiva e rápida (Sarkar *et al.*, 2009); e ii) os glioblastomas secundários que, evoluem a partir de astrocitomas de grau baixo (grau II) ou astrocitoma anaplásico (grau III) e, apresentam mutações de *p53* (65%) (Rushing *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2000; Ohgaki & Kleihues, 2007), perda de heterozigosidade envolvendo o cromossoma 10 (63%), amplificação de *EGFR* (8%), deleção *p16^{INK4a}* (19%), mutações em *PTEN* (4%) (Ohgaki & Kleihues, 2007), tendem a ocorrer em pacientes mais novos (média de 45 anos) (Schiebe *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; Sarkar *et al.*, 2002; e Ohgaki & Kleihues, 2007), e estão associados a uma evolução clínica mais prolongada (Sarkar *et al.*, 2009). É interessante salientar que a mutação de *p53* e a amplificação de *EGFR* são eventos geralmente mutuamente exclusivos, surgindo raramente em simultâneo (Sarkar *et al.*, 2009). Outras alterações genéticas dos glioblastomas primários incluem a deleção de *cdkn2A* e *p14^{ARF}*, amplificação de *cdk4*, amplificação de *mdm2* ou *mdm4*, deleção/mutação de *Rb1*, deleção de *PTEN*; e dos gliomas secundários, sobre-expressão de *PDGFRA* (Sarkar *et al.* 2009).

Contrastando com o caso dos astrocitomas, as mutações em *p53* não parecem desempenhar um papel na evolução de outros tipos de tumores cerebrais como os ependimomas, pineocitomas/pineoblastomas ou meduloblastomas (Sarkar *et al.*, 2002 e Eberhart *et al.*, 2005). Nozaki *et al.* (1998) referem igualmente que as mutações de *p53* são raras em tumores cerebrais do tipo não astrocíticos.

Patt *et al.* (1996) num estudo das mutações de p53 em 42 tumores astrocíticos, verificaram que a frequência de mutações de p53 era idêntica nos astrocitomas, astrocitomas anaplásicos e glioblastomas, sugerindo que a mutação de p53 será um evento precoce no desenvolvimento dos astrocitomas.

Resumindo, embora o papel de p53 nas recidivas e progressão dos astrocitomas nos humanos ainda seja debatido, existem cada vez mais provas de que: i) as alterações genéticas de p53 ocorrem com frequência idêntica nos astrocitomas de grau baixo assim como naqueles de elevado grau, sugerindo o seu papel precoce no desenvolvimento dos astrocitomas; ii) o gene p53 tem um papel na progressão de astrocitomas de baixo grau para glioblastomas secundários e; iii) p53 é considerado como um importante factor de prognóstico em tumores astrocíticos (Sarkar *et al.*, 2002). No que diz respeito a mutações de p53 como factor de prognóstico, parece que a presença de mutações deste gene nos astrocitomas de grau baixo está associada a uma mais rápida e mais frequente evolução para glioblastomas comparado com aqueles astrocitomas que não apresentam mutações em p53. Quanto à sobrevivência em humanos, alguns estudos dizem que a presença de mutações não influencia a sobrevivência, enquanto que outros estudos associam a presença de mutações em p53 a uma menor sobrevivência (Sarkar *et al.*, 2002).

1.5. EXPRESSÃO DO GENE EGFR

Os factores de crescimento são responsáveis por estimular as células no estágio G0 (estágio de repouso) e entrar no ciclo celular (Park, 2002). Os oncogenes derivados de receptores de factores de crescimento conferem às células a capacidade de dispensar os requisitos dos factores de crescimento, tornando a proliferação celular independente destes (Park, 2002). Os maiores números destes oncogenes são derivados dos receptores de factores de crescimento que têm uma actividade tirosina-quinase, sendo o EGFR uma destas quinases celulares (Park, 2002). A função de EGFR em tecidos normais de mamíferos inclui o desenvolvimento embrionário, desenvolvimento da placenta, cicatrização de feridas e desenvolvimento mamário (Wong & Guillard, 2004 e Looper, Malarkey, Ruslander, Proulx & Thrall, 2006), actuando também como factor mitogénico de células epiteliais, promovendo a angiogénese (Halper, 2010). O EGFR é uma quinase celular transmembranária, e que está frequentemente sobre-expressa nos carcinomas de células escamosas e nos gliomas no Homem (Park, 2002 e Looper *et al.*, 2006). Rae *et al.* (2004), Blehm *et al.* (2006), e Looper *et al.* (2006) referem que esta sobre-expressão de EGFR também está documentada em tumores da cabeça e pescoço, esófago, mama, pulmão, cólon, próstata, ovário, bexiga, pâncreas e cérebro. Enquanto alguns autores consideram

que esta sobre expressão está frequentemente associada a um mau prognóstico (Rae *et al.* 2004), existem muitos outros autores que discordam (Blehm *et al.*, 2007).

Nos tumores cerebrais, a amplificação do gene EGFR é encontrada em cerca de 36% dos glioblastomas primários (Collins, 2004 e Ohgaki & Kleihues, 2007), estando geralmente sobre-expresso (Ekstrand *et al.*, 1991; Collins, 2004; e Heimberger, Suki, Yang, Shi & Aldape, 2005). Todos os gliomas primários com amplificação de EGFR mostram sobre-expressão do mesmo, enquanto 70-90% daqueles com sobre-expressão apresentam amplificação (Ohgaki & Kleihues, 2007). A sobre-expressão de EGFR está presente em mais de 60% dos glioblastomas primários, mas raramente (em menos de 10%) nos glioblastomas secundários (Puputti *et al.*, 2006 e Ohgaki & Kleihues, 2007). Segundo Zhou, Tan, Hess & Yung (2003) embora tenham encontrado amplificação e sobre-expressão de EGFR em gliomas consideram que estes não podem ser usados como factor de prognóstico.

Em Medicina Veterinária as referências sobre a sobre-expressão (avaliada por métodos que não a imunohistoquímica) de EGFR, em tumores intracranianos de cães, são mínimas limitando-se, que seja do nosso conhecimento, a um estudo. Nesse estudo Dickinson *et al.* (2006) verificaram que a expressão de EGFR (avaliada por PCR em tempo-real) estava consistentemente aumentada em todos os tipos de tumores cerebrais, sendo maior nos gliomas de elevado grau, e menor nos meningiomas de grau I. Mesmo em outros tecidos de origem canina as referências à sobre-expressão de EGFR resumem-se à detecção por imunohistoquímica (IHC) e ao estudo de tumores cerebrais, mamários e de pulmão, e que se apresentam em pormenor no ponto 1.6.3.

1.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

A coloração IHC é uma técnica que utiliza anticorpos específicos para a visualização da quantidade, distribuição tecidual e localização celular de epitopos imunogénicos em cortes histológicos (Haines & West, 2005). Esta técnica é muitas vezes utilizada como complemento na classificação de tumores cerebrais (Long, 2006). A descoberta de métodos de recuperação antigénica e de amplificação dos métodos de detecção possibilitou o uso da técnica de IHC em cortes fixados por formaldeído e incluídos em parafina, tornando-a assim numa técnica laboratorial de diagnóstico de rotina (Haines & West, 2005).

Infelizmente, em Medicina Veterinária, existem muito poucos estudos publicados que abordem as imunomarcações de p53, EGFR e Ki-67 nos tumores cerebrais do cão, sendo o mais recente um estudo de Stoica *et al.* (2004).

1.6.1. Imunohistoquímica de Ki-67

O antigénio Ki-67 é uma proteína de grande dimensão (345Kd) que está presente em todas as fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2), apresentando o seu nível mais elevado durante a mitose (fase M) (Zachetti *et al.*, 2003 e Tan *et al.*, 2005), após o que decresce rapidamente não sendo detectável na fase G_0 e início de G_1 (Tan *et al.*, 2005). Assim, a marcação desta proteína possibilita uma medição das células que entraram no ciclo celular (Quinones-Hinojosa, Sanai, Smith & McDermott, 2005). Uma das maneiras mais frequentemente usadas para avaliar a actividade proliferativa dos tecidos é a imunomarcação deste antigénio nuclear Ki-67 (Pollack *et al.*, 2002).

Mais uma vez, a bibliografia é muito escassa no que diz respeito a estudos imunohistoquímicos de Ki-67 em tumores cerebrais do cão. Assim, Lipsitz *et al.* (2003) obtiveram um índice de proliferação (IP) médio de Ki-67 (MIB-1) de 16,2% (variando entre 6% e 26%) nos 5 glioblastomas multiforme (GBM) de cão estudados. Dickinson *et al.* (2000) obteve 4% e 15% de IP de Ki-67 (MIB-1) em dois oligodendrogliomas em gato. Existem, no entanto, algumas referências ao uso deste marcador de proliferação celular em outros tecidos tumorais de origem canina. Morris, Nixon, King, Morgan & Philbey (2009) estudaram 132 tumores mamários de cão (benignos e malignos), tendo concluído que a percentagem de imunomarcação positiva de ki-67 aumentava com o grau de malignidade do tumor. Peña, Nieto, Perez-Alenza, Cuesta & Castano (1998) obtiveram imunomarcação média de 7,33% numa amostra de 93 tumores mamários de cão. Costa *et al.* (2007) estudou 103 mastocitomas de cão com imunomarcações entre 3,3% e 46,6%. Labelle, Kyles, Farver & De Cock (2004) obtiveram um IP médio de 9,3% em tumores adrenocorticais. Sanchez *et al.* (2007) referem IPs médios de 36,9% em melanomas orais com diferenciação osteocartilagínea. Antuofermo *et al.* (2007) documenta percentagem de imunomarcação crescente consoante o aumento de malignidade de lesões intraepiteliais mamárias em cão. Rijn, Grinwis, Penning & Meji (2010) relatam imunomarcações em adenomas corticotrópicos da hipófise no cão.

De acordo com Morris *et al.* (2009) a classificação histopatológica juntamente com a avaliação de marcadores de proliferação celular como o Ki-67, antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) ou a classificação AgNOR, podem ser úteis como informação de prognóstico. Segundo Mandriolo *et al.* (2007), na maioria dos tumores humanos e animais, a actividade proliferativa das células neoplásicas está directamente relacionada com o seu comportamento biológico; tornando assim a avaliação do IP celular relevante como factor de prognóstico. De acordo com Peña, Perez-Alenza, Rodrigues-Bertos & Nieto (2003) o IP celular avaliado por imunomarcação de Ki-67 é considerado um bom factor de prognóstico nos tumores mamários malignos no cão.

No Homem, estudos de Engelhard, Stelea & Cochran (2002) e Kamiya & Nakazato (2002) referem que o índice de marcação de Ki-67 (MIB-1), reflecte o grau histopatológico e constitui um indicador significativo do prognóstico no caso dos oligodendrogliomas. Pollack *et al.* (2002) também concluiu num estudo de gliomas malignos em crianças, que índice de marcação de Ki-67 (MIB-1), reflecte o grau histopatológico e constitui um importante indicador do prognóstico neste tipo de tumores. Quinones-Hinojosa *et al.* (2005) num artigo de revisão sobre os métodos de avaliação do potencial proliferativo cerebral disponíveis afirma que, níveis elevados de imunoreactividade de Ki-67 estão associados a tumores de elevado grau e que o respectivo IP ainda parece ser um dos melhores métodos de avaliação do potencial proliferativo do que outros marcadores (PCNA e AgNOR).

1.6.2. Imunohistoquímica de p53

A proteína p53 nativa, ou seja, aquela que não apresenta mutações, é chamada de “wild-type” em oposição àquela que apresenta mutação e que poderá ser chamada de “mutante” (Sarkar *et al.*, 2002). Em condições fisiológicas a semi-vida da proteína p53 “wild-type” é curta (cerca de 15 a 30 minutos), provavelmente devida a proteólise mediada por ubiquitina (Wolf, Ginn, Homer, Fox & Kurzman, 1997; Nassir *et al.*, 2001; e Sarkar *et al.*, 2002). Assim, a proteína p53 “wild-type” está presente nas células normais em níveis muito baixos para serem detectáveis por imunohistoquímica (Ziyaie *et al.* 2000; Sarkar *et al.*, 2002; Badhe, Chauhan & Mehta, 2004; e Haines & West, 2005). As mutações do gene supressor tumoral p53, quase sempre resultam no aumento da semi-vida da proteína p53 (na gama das horas), com a consequente acumulação desta nos tecidos, permitindo a sua detecção por imunohistoquímica (Levine & Fleischli, 2000; Ziyaie *et al.* 2000; Albaric, Bret, Amardeihl, & Delverdier, 2001; Sarkar *et al.*, 2002; Bahde *et al.*, 2004; e Haines & West, 2005). No entanto, esta generalização não é absoluta. Assim, nem todas as mutações de p53 resultam em detecção imunohistoquímica, nem toda a marcação positiva de p53 é resultante de mutações em p53 (Sarkar *et al.*, 2002).

Em Medicina Veterinária, Stoica *et al.* (2004) num estudo de 31 astrocitomas de cães verificou que 11 (35%) tumores apresentavam sobre-expressão (> 10% núcleos marcados) de p53. Em 3 casos o mesmo autor verificou que existia simultaneamente sobre-expressão de p53 e de EGFR. Apesar dos estudos de imunohistoquímica de p53 em tecido cerebral de cão serem raros, já noutros tipos de tumores as referências são numerosas. Morris *et al.* (2009) num estudo de 132 tumores mamários de cão (46 benignos e 86 carcinomas) obteve imunomarcção nuclear considerada positiva em 23% dos casos, sendo esta marcação tanto maior quanto maior a malignidade do tumor. Rungsipat *et al.* (1999) num estudo de tumores benignos e malignos da mama do cão obteve 24,6% de imunomarcção nuclear

considerada positiva. Sagartz *et al.* (1996) e Wolf *et al.* (1997) obtiveram imunomarcações positivas para p53 em tumores coloreticais e ósseos em cães, respectivamente. Gamlin, Sagartz & Couto (1997) obtiveram, igualmente, imunomarcação positiva de p53 numa variedade grande de tumores de cães, sem no entanto fazerem referência a tumores cerebrais. Murakami, Tateyama, Rungsipat, Uchida & Yamaguchi (2000) referem imunomarcações positivas para p53 em tumores mamários, carcinomas de células escamosas e tumores de células basais em cão e gato. Lee *et al.* (2004) encontraram imunomarcação positiva de p53 em 25% dos tumores mamários de cão estudados. A imunomarcação positiva de p53 está documentada em osteossarcomas (Inoue & Shiramizu, 1999 e Loukopoulos *et al.*, 2003), adenocarcinomas mamários e mioepiteliomas malignos (Inoue & Shiramizu, 1999). Ozaki, Yamagami, Nomura & Narama (2002) num estudo de 39 mastocitomas com localização gastro-intestinal, encontraram marcação positiva para p53 em 13% dos casos. Ginn *et al.* (2000) obtiveram imunomarcação positiva para p53 em 44,6% de mastocitomas cutâneos em cães.

Ginn *et al.* (2000) e Ozaki *et al.* (2002) afirmam que marcação imunohistoquímica de p53 não constitui um indicador de prognóstico no caso de mastocitomas cutâneos e com localização gastro-intestinal no cão, respectivamente. Também Jaffe *et al.* (2000) consideram que a imunomarcação de p53 em mastocitomas cutâneos não apresentam vantagem sobre a classificação histopatológica como factor de prognóstico. Já Lee *et al.* (2004) verificaram que a imunomarcação de p53 constitui um bom indicador de prognóstico no caso de tumores mamários no cão.

Em Humanos existe uma correlação directa entre a expressão de p53 por imunohistoquímica e o grau histológico em vários tipos de tumores, incluindo tumores mamários (Wolf *et al.* 1997 e Rungsipat *et al.* 1999). Aproximadamente 50% dos astrocitomas cora positivamente para a proteína p53, independentemente do seu grau histológico (Nieder, Petersen, Petersen & Thames, 2000). Um estudo de Kamiya & Nakazato (2002) constatou que o índice de marcação de p53, era tanto maior quanto maior a malignidade dos oligodendrogliomas, mas não constituía um factor de prognóstico. Stark, Witzel, Strege, Hugo & Mehdorn (2003) verificaram, num estudo, que 24 entre 27 glioblastoma multiforme coravam positivamente para imunohistoquímica de p53, sem considerar que esta marcação possa ser usada como factor de prognóstico no que respeita a recidivas e tempo de sobrevivência.

1.6.3. Imunohistoquímica de EGFR

O EGFR é um membro da família dos receptores do factor de crescimento epidérmico humano (HER) (Shien *et al.*, 2005) incluindo 4 receptores tirosina-quinase (EGFR ou erbB1, HER2/neu ou erbB2, HER3 ou erbB3 e HER4 ou erbB4) (Hynes and Lane, 2005; Park *et al.*, 2007 e Sassen *et al.*, 2008, citados por Gama, Gartner, Alves & Schmitt, 2009). A via EGFR contribui para vários processos envolvidos no crescimento e sobrevivência dos tumores, incluindo a proliferação celular (Hogarty & Brodeur, 2002) e inibição da apoptose, angiogénese, e metastização, tornando-o num alvo atractivo para o tratamento e prevenção do cancro (Shien *et al.*, 2005). Segundo Hynes and Lane (2005) citados por Gama *et al.* (2009), o EGFR foi o primeiro receptor tirosina-quinase transmembranário a ser directamente associado ao cancro em humanos.

As referências Veterinárias ao estudo da sobre-expressão de EGFR em tumores, por imunohistoquímica, são escassas e, que seja do nosso conhecimento, existem quatro publicações referentes à imunomarcção em tecido cerebral de cão. Berens *et al.* (1993) obteve imunomarcção positiva para EGFR em 3 clones de células derivadas de um astrocitoma espontâneo no cão. Lipsitz *et al.* (2003) obtiveram imunomarcção positiva de EGFR em 3 (60%) dos 5 GBM estudados. Stoica *et al.* (2004) num estudo de 31 astrocitomas de cães verificou que 7 (23%) tumores apresentavam sobre-expressão (marcção da membrana citoplasmática) de EGFR; e em 3 casos verificou que existiam simultaneamente sobre-expressão de p53 e de EGFR. Finalmente, um artigo muito recente de Higgins *et al.* (2010) obteve 57% de imunomarcção em GBM, 40% em astrocitomas de grau III e 28% em astrocitomas de grau II. Noutros tipos de tecidos, Gillett, Stegelmeier, Kelly, Haley & Hahn (1992) obtiveram 47% de imunomarcções positivas em tumores de pulmão de cão induzidos por plutónio-239. Gama *et al.* (2009) realizou a imunomarcção de EGFR em 136 tecidos de glândula mamária (46 benignos e 90 malignos) tendo obtido imunomarcção positiva em 19,6% e 42,2% dos tumores benignos e malignos, respectivamente. No gato, Looper *et al.* (2006) num estudo de carcinomas de células escamosas obteve imunomarcção positiva em 69% dos casos.

Em humanos, Stark *et al.* (2003) verificaram, num estudo, que 24 entre 27 glioblastoma multiforme coravam positivamente para imunohistoquímica de EGFR. Umesh *et al.* (2009) obtiveram 35,2% de imunomarcção positiva em GBM. Smith, Lal, Harmon-Smith, Bollen & McDermott (2007) obtiveram imunomarcção positiva em 46% dos meningiomas. Shien *et al.* (2005) encontraram 70% de imunomarcções positivas em carcinomas mamários ductais de elevado grau com diferenciação mioepitelial.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CRITÉRIOS DE SELECÇÃO DOS CASOS E AVALIAÇÃO PRELIMINAR

Os casos incluídos neste estudo foram provenientes do Serviço de Radiologia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) de Lisboa, durante um período de 5 anos. A triagem inicial dos canídeos incluídos neste estudo foi feita mediante a realização de uma consulta de 1ª opinião ou de referência na Consulta Externa do Hospital Escolar da FMV, assim como em clínicas privadas que recorreram ao serviço de Radiologia da FMV por apresentarem um quadro neurológico compatível com a presença de uma lesão intracraniana.

Dos 105 animais incluídos, todos foram estudados sob o ponto de vista imagiológico, tendo sido realizada uma TAC crânio-encefálica que revelou a presença de uma massa intracraniana. Foram nesta altura recolhidos os dados relativos à raça, sexo e idade dos animais. Em 75 casos foram igualmente registados os sinais clínicos apresentados, mediante a realização de um exame neurológico. Nestes casos os sintomas e sinais clínicos associados foram registados após apreciação sistemática dos seguintes aspectos: alteração do estado mental, nervos cranianos, locomoção, andamento em círculo, inclinação da cabeça, pressão da cabeça contra objectos, epilepsia, deficits proprioceptivos, parésia, e outras observações consideradas relevantes.

Em virtude de muitos animais regressarem ao acompanhamento pelos médicos veterinários assistentes fora da FMV e de muitos proprietários, em que o seu animal foi submetido a eutanásia, não deixarem o cadáver na FMV, apenas 26 casos foram sujeitos ao estudo histopatológico. Destes 26 casos, e porque alguns cadáveres só nos chegaram no dia seguinte à morte, apenas 19 puderam ser utilizados para o estudo molecular das mutações de p53, e 16 para o estudo da expressão de EGFR, que obriga a que o tecido seja muito fresco, para garantir a integridade do ácido ribonucleico (RNA) que irá ser objecto de estudo. A imunohistoquímica foi realizada em 24 casos, tendo-se excluído um caso de meningioma, cujo resultado tinha sido obtido em Espanha, e ainda o único caso de metástase cerebral.

2.2. TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTORIZADA E ESTUDO IMAGIOLÓGICO

Os canídeos suspeitos de possuírem uma lesão intracraniana foram pesados, o seu peso registado, e seguidamente submetidos a uma anestesia geral. Foram usados os seguintes anestésicos, em combinações diversas, consoante a avaliação clínica de cada paciente: tiopental sódico (Tiopental 0,5g Braun, BBraun Medical Ida., Queluz de Baixo, Portugal) na

dose de 6-10mg/kg, IV; propofol (Propofol-lipuro1%[®], BBraun Melsungen AG, Melsungen, Alemanha) na dose de 2-6mg/kg, IV; e isoflurano (IsoFlo[®], Abbot laboratories Ltd., Queenborough Kent, Reino Unido).

Os animais anestesiados foram colocados em decúbito esternal, com o pescoço e cabeça sobre uma esponja radiotransparente de modo a que o palato duro ficasse paralelo à mesa e fixando a cabeça para evitar rotações. Seguidamente foi realizada uma TAC crânio-encefálica (Tomoscan[®] AV-SR 4000, Philips Medical Systems International BV, Eindhoven, Holanda), compreendendo um estudo pré e outro pós administração de contraste iodado (Télébrix 35[®], Laboratoire Guerbet, Aulnay sous Bois, França) sob a forma de um “bolus” por via endovenosa, na dose de 700mg/kg. A TAC cranio-encefálica seguiu sistematicamente um protocolo com 120 Kv e 140 mA, Filter 1, Matrix 512, com secções de 5 em 5 milímetros prependiculars ao eixo longitudinal do cérebro dos animais, desde a protuberância occipital externa até à lâmina cribiforme. Nos casos em que a presença de uma massa intracraniana foi confirmada, os padrões imagiológicos foram registados para processamento posterior. Este estudo imagiológico foi realizado utilizando software apropriado (EasyVision[®] R5, Philips Medical Systems, Eindhoven, Holanda). Os padrões imagiológicos foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros: hemisfério envolvido, lobo afectado, posição axial, densidade pré-contraste, captação de contraste, padrão de captação de contraste, dilatação e simetria do sistema ventricular cerebral, e desvio da foice do cérebro. A apreciação da dimensão e simetria do sistema ventricular foi feita de forma subjectiva, isto é, não recorrendo a qualquer medição do volume ventricular, mas usando a experiência do imagiologista, e tendo sempre em atenção a idade e a raça dos canídeos.

Àqueles canídeos em que foi confirmada a presença de uma massa intracraniana, não passível de remoção cirúrgica, e que pelo seu estado clínico, não apresentavam qualidade de vida, foi autorizada pelos proprietários a sua eutanásia, por meio de uma sobre-dosagem anestésica endovenosa com tiopental sódico (Tiopental[®] 0,5g Braun, BBraun Medical Ida., Queluz de Baixo, Portugal).

2.3. COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Na generalidade dos casos, foram colhidos 4 tipos de amostras de cada animal, a saber: tecido cerebral tumoral, tecido cerebral normal, sangue e urina. Em alguns casos, que só nos chegaram após a eutanásia, não foi possível a colheita de todas as amostras acima referidas. O sangue e a urina foram colhidos para eventuais estudos posteriores a este trabalho.

2.3.1. Colheita de sangue e urina

A colheita de sangue foi realizada, antes da eutanásia, por punção de uma veia periférica (cefálica ou safena) para um tubo com EDTA e outro com heparina. Cada tubo foi dividido, por centrifugação, numa porção celular e outra de plasma que foram armazenadas a -80°C . Na generalidade dos casos, a colheita de urina foi realizada antes da eutanásia, por meio de algáliação, dividida em aliquotas e armazenada a -80°C .

2.3.2. Colheita de tecido cerebral para estudo de genética molecular

Imediatamente após a eutanásia do animal, e sob condições de assépsia cirúrgica, foram colhidas várias amostras de tecido cerebral tumoral e de tecido cerebral normal. As últimas foram colhidas da correspondente zona anatómica contralateral para evitar contaminação por células tumorais passíveis de conter algum defeito genético. As amostras foram colhidas para criotubos Dnase e Rnase-free (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemanha) e mantidas temporariamente em gelo. Seguidamente as amostras foram imersas em azoto líquido e posteriormente armazenadas a -80°C .

2.3.3. Colheita de tecido cerebral para histopatologia e imunohistoquímica

Após a colheita das amostras de tecido cerebral, anteriormente descrita, o cérebro foi fixado em formol tamponado a 10% (Ref. HT50-1-640, Accustain[®] formalin Solution neutral buffered 10% formalin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e incluído em parafina para classificação histopatológica e estudo imunohistoquímico.

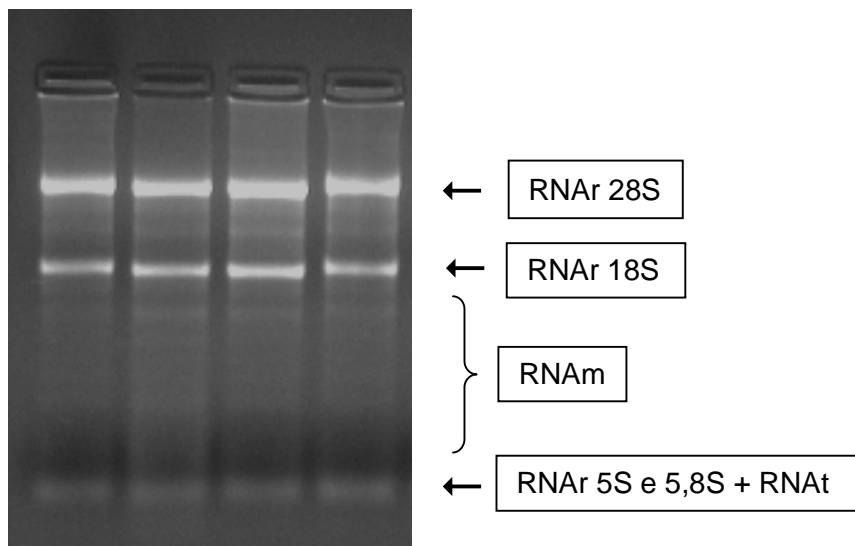
2.4. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE p53

2.4.1. Extracção de RNA total do tecido cerebral

As amostras de tecido cerebral foram processadas segundo o protocolo descrito na folha de instruções do reagente Trizol[®] Reagent (Ref.15596-026, Invitrogen S.A., Barcelona, Espanha), para a extracção de RNA total. A integridade do RNA foi testada mediante a realização de uma electroforese em gel de agarose a 2% (Ref. 50004, SeaKem LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, EUA) (figura 1), tendo sido quantificado e avaliada a pureza por espectrofotometria (Beckman Instruments Inc., DU-68 Spectrophotometer, Fullerton, CA,

EUA) mediante leituras a 260nm e 280nm e cálculo do seu ratio. O RNA extraído foi posteriormente dividido em aliquotas e armazenado a -80°C .

Figura 1: Separação de RNA total em gel de agarose a 2% para avaliação da integridade.



A banda 28S deverá ser duas vezes mais espessa e intensa do que a banda 18S. O RNAm está representado pelo “smear” de fundo.

2.4.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi efectuada através da transcrição reversa de $2\mu\text{g}$ de RNA total tendo sido usados oligodT (Cat. No. 18418-012, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e de acordo com o protocolo descrito na folha de instruções da enzima Superscript[®] II Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-014, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). O cDNA foi seguidamente dividido em aliquotas e armazenado a -20°C .

2.4.3. Reacções em cadeia da polimerase (PCR) do gene p53

Os oligonucleótidos iniciadores usados para a realização do PCR para o gene p53 foram desenhados utilizando o software Oligo v5, tendo sido utilizada a sequência nucleotídica depositada no GenBank ref^a NM_001003210.

Foram amplificadas as regiões compreendidas entre o exão 5 e 10, utilizando os pares de oligonucleótidos iniciadores constantes na tabela 1.

Tabela 1: Pares de oligonucleótidos iniciadores utilizados para a amplificação dos exões 5 a 10 do gene p53.

Oligonucleótido iniciador	Sequência (5' - 3')	Exão	Tamanho do amplificação
1U 1L	AGA CCG CCG GAC TGA GGA G ATT GCC CCT TCT TTG CCT TCA	9, 10	287 pb
2U 2L	GCG GCC CAT CCT CAC TAT CA TTC TTC TTT TGC GGG GGA GAG	8	219 pb
3U 3L	CCT CAG CAT CTC ATC CGA GTG G CAG GCA CAA ACG CGT ACC TCA A	6, 7	260 pb
4U 4L	AAG AAG TCG GAG TTC GTG ACC CTC ATA AGG CAC CAC CAC ACT	5, 6	177 pb
5U 5L	GCA TTC CGG GAC AGC CAA GTC GCA GCG CCG CAC AAC CTC	5	187 pb

As reacções de PCR para o gene p53 foram efectuadas num volume total de 20µl segundo o protocolo descrito na folha de instruções da enzima Taq DNA Polymerase (Cat. No. 18038-026, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), e de acordo com as condições descritas na tabela 2. As amplificações foram efectuadas num aparelho de PCR (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA), tendo sido utilizados os programas discriminados na tabela 3. Posteriormente foi feita a visualização das moléculas amplificadas por electroforese em gel de agarose a 2% (Ref. 50004, SeaKem LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, EUA) e feita a purificação dos produtos de PCR usando os kits QIAquick® PCR purification kit (Ref. 28104, Qiagen, Hilden, Alemanha) e QIAquick® gel extraction kit (Ref. 28704, Qiagen, Hilden, Alemanha).

Os produtos de PCR foram enviados para o laboratório Stabvida para sequenciação directa. Esta foi realizada sempre em dois sentidos para excluir artefactos relacionados com a própria sequenciação.

Tabela 2: Condições das reacções de PCR para o gene p53.

Oligonucleótido iniciador	Concentração de Mg ²⁺	Concentração de oligonucleótido iniciador	Volume cDNA
1U / 1L	1,2 mM	0,9 µM	2 µL
2U / 2L	1,5 mM	0,5 µM	2 µL
3U / 3L	1,5 mM	0,9 µM	2,5 µL
4U / 4L	1,5 mM	1,2 µM	2 µL
5U / 5L	1 mM	0,5 µM	2 µL

Tabela 3: Programas de amplificação do gene p53 usados por par de oligonucleótido iniciador.

Oligonucleótido iniciador	Desnaturação 1	Desnaturação 2	Hibridação	Extensão 1	Extensão 2	Fim
1U / 1L	94°C 3 min.	94°C 25 seg.	66°C 30 seg.	72°C 30 seg.	72°C 10 min.	4°C ∞
		35 ciclos				
2U / 2L	94°C 3 min.	94°C 35 seg.	66°C 30 seg.	72°C 40 seg.	72°C 10 min.	4°C ∞
		35 ciclos				
3U / 3L	94°C 3 min.	94°C 25 seg.	66°C 30 seg.	72°C 30 seg.	72°C 10 min.	4°C ∞
		35 ciclos				
4U / 4L	94°C 3 min.	94°C 35 seg.	65°C 35 seg.	72°C 30 seg.	72°C 10 min.	4°C ∞
		35 ciclos				
5U / 5L	94°C 3 min.	94°C 25 seg.	68°C 30 seg.	72°C 30 seg.	72°C 10 min.	4°C ∞
		35 ciclos				

2.5. PCR EM TEMPO-REAL DO GENE EGFR

A quantificação relativa da expressão do gene EGFR foi realizada recorrendo à técnica de PCR em tempo-real. A extração de RNA total foi realizada de acordo com o descrito no ponto 2.4.1. As amostras de RNA foram tratadas com DNase seguindo o protocolo constante na folha de instruções da enzima usada (Dnase I recombinant, Rnase-free ref^a 04 716 728 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) para remoção de DNA genómico.

A síntese de cDNA foi efectuada através da transcrição reversa de 1µg de RNA total tendo sido usados oligonucleótidos iniciadores aleatórios (Cat. No. 48190-011, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e de acordo com o protocolo descrito na folha de instruções da enzima Superscript[®] II Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-014, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA).

Para desenho dos oligonucleótidos iniciadores e sondas do gene alvo EGFR e gene controlo endógeno GAPDH, foram utilizadas as sequências nucleotídicas depositadas no GenBank ref^a XM_533073 e ref^a NM_001003142, respectivamente. O desenho dos oligonucleótidos iniciadores e sondas MGB foi feito recorrendo ao software “Primer Express” do aparelho de real-time da Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA), tendo havido o cuidado de colocar as sondas sobre uma junção de exões de modo a conseguir discriminar entre cDNA e DNA genómico. Na tabela 4 estão discriminadas as sondas e os oligonucleótidos iniciadores dos genes alvo (EGFR) e controlo endógeno (GAPDH) utilizadas, e respectivas concentrações.

Tabela 4: Oligonucleótidos iniciadores e sondas de EGFR e GAPDH e suas concentrações.

Oligonucleótido iniciador / sonda	Sequência (5' – 3')	Exão	Tamanho do amplificação	Concentração
EGFR (U)	TTAAAGGAGACGGAGTTCAAAAAGA	23	141pb	600nM
EGFR (L)	GGGAGACGTGGCTTCTCTCA	24		600nM
EGFR sonda MGB	AGTGTACAAGGGACTCTG	23-24		200nM
GAPDH (U)	TTCTACCCACGGCAAATTCC	1	61pb	600nM
GAPDH (L)	GTTGATGACAAGTTTCCCATTCT	2		600nM
GAPDH sonda MGB	CGGCACAGTCAAGG	1-2		200nM

Para a realização do PCR em tempo-real de EGFR foram utilizadas sondas TaqMan®, tendo sido seguido o protocolo constante na folha técnica do kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Ref. 4304437, Applied Biosystems, Foster City, EUA).

O ciclo de amplificação de sondas utilizado foi aquele pré-definido pelo aparelho de PCR em tempo-real da Applied Biosystems 7300:

50°C 2 min

95°C 10 min

95°C 15 sec }
60°C 1 min } 40 ciclos,

A validação do controlo endógeno GAPDH foi feita de acordo com os seguintes autores: Dheda, Huggett, Bustin, Johnson, Rook & Zumla (2004) e Pfaffl, Tichopad, Prgomet & Neuvians (2004), tendo ficado assegurado que a variação de expressão relativa entre o tecido normal e tumoral não excedia 2-fold. A análise da expressão relativa do gene alvo EGFR foi feita utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e segundo o descrito por Livak & Schmittgen (2001).

2.6. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O tecido cerebral fixado em formol tamponado a 10% seguiu as técnicas de rotina de inclusão em parafina (Thermo-module TM-1, Kunz Instruments A/S, Copenhagen, Dinamarca; Paraffin dispenser WD-4, Kunz Instruments A/S, Copenhagen, Dinamarca; Cooling plate CPL-4, Kunz Instruments A/S, Copenhagen, Dinamarca; Tissue processor TP1020, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha) e seccionamento (Microtome SM2000R, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha) de 3 µm, para a sua classificação histopatológica. Esta foi realizada segundo os critérios recomendados pela OMS para a classificação dos tumores intracranianos nos Animais Domésticos, tendo sido utilizada a seguinte referência: Koestner *et al.* (1999).

Para a classificação histopatológica foi utilizada a coloração de rotina hematoxilina-eosina.

2.7. IMUNOHISTOQUÍMICA

2.7.1. Imunohistoquímica de Ki-67, p53 e EGFR

Dos 26 casos em que foi possível obter o respectivo resultado histopatológico foram processadas 24 amostras (um dos resultados foi obtido em Espanha e outro dizia respeito a uma metástase cerebral) para cada um dos anticorpos – Ki-67, p53 e EGFR. Foram submetidos para estudo imunohistoquímico 16 gliomas (8 oligodendrogliomas e 8 astrocitomas que incluiu 2 gliomas mistos), 6 meningiomas, 1 neuroblastoma cerebral e, 1 adenoma da pars distalis da hipófise. Assim, analisaram-se casos em que o período de fixação não excedeu as 48 horas de forma a prevenir a sobrefixação do material.

As imunomarcações foram realizadas em cortes histológicos com 4 µm de espessura colocados em lâminas adesivadas SuperFrost Plus® (Ref. J1800AMNZ, Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemanha).

Os anticorpos disponíveis no mercado são, normalmente, os utilizados nos exames de rotina da espécie humana, podendo apresentar reactividade cruzada com a espécie canina. Para a imunohistoquímica foram testados inicialmente 5 anticorpos primários (um para Ki-67, dois para p53 e dois para EGFR), cujas especificações estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Especificações dos anticorpos testados em imunohistoquímica.

Anticorpo primário	Origem	Clone	Referência	Espécie produtora
Ki-67	Novocastra	Policlonal	NCL-Ki67p	Coelho anti-humano
p53 (CM-1)	Novocastra	Policlonal	NCL-p53-CM1	Coelho anti-humano
p53 (DO-7)	Dako	Monoclonal	IS616	Rato anti-humano
EGFR (2-18C9)	Dako	Monoclonal	K1492	Rato anti-humano
EGFR (E30)	Dako	Monoclonal	M7239	Rato anti-humano

A determinação da diluição óptima de trabalho para cada anticorpo primário fez-se mediante ensaio inicial da técnica, testando várias diluições (incluindo aquela recomendada pelo fabricante), seguindo-se a avaliação dos resultados e a selecção da diluição ideal.

Considera-se marcação positiva quando as zonas alvo das células (núcleo, citoplasma ou membrana citoplasmática) surgem bem coradas de castanho-escuro, devido à acção da peroxidase sobre o revelador, a diaminobenzidina, a qual forma polímeros na presença do substrato, o peróxido de hidrogénio. Os núcleos, membranas celulares e/ou citoplasma mostram-se bem evidentes pelo contraste marcado que ocorre com os restantes componentes celulares corados pela hematoxilina de Mayer.

Em cada técnica de imunohistoquímica realizada foi sempre incluído um corte extra usado como controlo negativo e no qual o anticorpo primário foi substituído por igual volume de PBS.

Seguidamente descreve-se de forma detalhada o protocolo da técnica de coloração imunohistoquímica utilizado para Ki-67 e p53, para material incluído em parafina, pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (EBP):

A – Executaram-se cortes de 4 μm de espessura que foram colhidos em lâminas adesivadas SuperFrost Plus[®] (Ref. J1800AMNZ, Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemanha)

B – Os cortes foram desparafinados em xilol durante 10 minutos.

C – Rehidratação: álcool etílico absoluto (duas vezes, durante 5 minutos).

álcool etílico 95^o (durante 5 minutos).

álcool etílico 70^o (durante 5 minutos).

D – Realizou-se a inibição da peroxidase endógena através de incubação na solução de bloqueio da peroxidase endógena (97ml de água bidestilada adicionados a 3 ml de H₂O₂ a 33% p/v), em agitação constante e durante 10 minutos.

E – Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

F – Recuperação antigénica foi realizada pela técnica de microondas (750 watts) com imersão em tampão citrato de sódio (pH=6,2), durante 3 ciclos de 5 minutos.

G – Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

H – Bloqueio das reacções inespecíficas recorrendo à *Blocking Solution* (solução A) do *kit* Histostain Plus[®] (DAB, Broad spectrum) (Cat. No. 85-9643, Zymed Laboratories Inc.[®], Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), durante 40 minutos.

I – Incubação com os anticorpos primários, em concentrações e tempos de incubação variáveis (de acordo com as especificações constantes na Tabela 6). A incubação foi feita à temperatura ambiente e em câmara húmida.

J - Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

K – Incubação com o anticorpo secundário biotilado recorrendo a *Broad Spectrum Second Antibody* (solução B) do *kit* Histostain Plus[®] (DAB, Broad spectrum) (Cat. No. 85-9643, Zymed Laboratories Inc.[®], Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), durante 30 minutos.

M – Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

N – Incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase recorrendo a *HRP Streptavidin* (solução C) do *kit* Histostain Plus[®] (DAB, Broad spectrum) (Cat. No. 85-9643, Zymed Laboratories Inc.[®], Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), durante 30 minutos.

O – Lavagem em PBS (três vezes durante 5 minutos).

P – Revelação com diaminobenzidina, durante 3 minutos, recorrendo ao *kit* Histostain Plus[®] (DAB, Broad spectrum) (Cat. No. 85-9643, Zymed Laboratories Inc.[®], Invitrogen, Carlsbad, California, EUA).

Q – Lavagem em PBS seguida de lavagem em água corrente durante 5 minutos.

R – Efectuou-se coloração de fundo pela Hematoxilina de Mayer, durante 10 segundos.

S – Lavagem em água corrente (azular).

T – Desidratação dos cortes por passagens em álcool etílico com graduação crescente (inversa do ponto C).

U – Passagem por xilol.

V – Montagem em resina sintética (Entellan[®]).

No caso da imunohistoquímica de EGFR foi seguido o protocolo recomendado pela folha técnica do kit Dako EGFR pharmDx[®] (K1492, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), com uma única alteração, que disse respeito ao tempo de incubação, e que foi “overnight”.

A contagem diferencial propriamente dita foi efectuada a partir de fotografias digitais obtidas com ampliação de 400 X e em resolução *standard*, através de câmara fotográfica OLYMPUS DP 11 incorporada no microscópio OLYMPUS BX 51. Para todas as amostras foram tiradas várias fotografias de campos diferentes abrangendo a região tumoral, tendo o cuidado de evitar a sobreposição de campos e conseqüente a contagem das mesmas células em fotos distintas.

A contagem de células foi realizada através do registo em fotografias digitais, recorrendo ao programa informático Image J - Image Processing and Analysis in Java[®] (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e de acordo com os seguintes critérios:

a) A contagem para cada uma das fotografias foi realizada em área pré-definida de 36159 μm^2 (212,7 μm x 170,0 μm).

b) As células cuja totalidade não se apresentava no interior do limite da fotografia foram rejeitadas.

c) As células cuja morfologia não se enquadrasse nas características descritas anteriormente não foram contabilizadas.

d) A autora foi o responsável por todas as contagens, de forma a uniformizar a técnica e os critérios de contagem, evitando assim diferenças entre operadores.

O registo das contagens foi efectuada em folha de cálculo com recurso ao programa *Excel 2003* do *Microsoft Office*[®].

Tabela 6: Diluições e tempos de incubação utilizados para os diferentes anticorpos testados.

Anticorpo primário	Incubação Diluição / Tempo
Ki-67	1:1000 / "overnight"
p53 (CM-1)	1:300 / "overnight"
p53 (DO-7)	1:300 / "overnight"
EGFR (E30)	1:25 / 2 horas
	1:50 / "overnight"
EGFR (2-18C9)	Pré-diluído/ "overnight"

A contagem de células da imunohistoquímica de Ki-67 seguiu o seguinte critério, adaptado de Lee *et al.* (2004). Selecionaram-se, aleatoriamente, três a cinco campos de grande ampliação (x 400), onde se contaram pelo menos 500 núcleos (marcados e não marcados). O índice de proliferação celular, em porcentagem, foi calculado como a razão entre o número de núcleos marcados e o número total de núcleos num determinado campo, multiplicado por 100.

A contagem de células da imunohistoquímica de p53 seguiu o critério usado por Murakami *et al.* (2000). O sistema de classificação usado foi o seguinte: 0, sem marcação nuclear; 1+, < 10% células tumorais com marcação nuclear; 2+, 10%-50% células tumorais com marcação nuclear; e 3+, >50% células tumorais com marcação nuclear. As classificações 0 e 1+ foram consideradas como negativas e as classificações 2+ e 3+ consideradas positivas.

Para a contagem da marcação da imunohistoquímica de EGFR foram seguidas as recomendações do manual de interpretação do próprio kit Dako EGFR pharmDx – EGFR PharmDx Interpretation Manual. Segundo o referido manual as amostras foram classificadas da seguinte maneira: 0, ausência de marcação da membrana citoplasmática (mesmo quando existe marcação citoplasmática); 1+, fraca marcação da membrana citoplasmática; 2+, moderada marcação da membrana citoplasmática; e 3+, forte marcação da membrana citoplasmática. A classificação 0 é considerada como negativa e as classificações 1+, 2+, e 3+ são consideradas como positivas.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram exportados para o programa de estatística SPSS v.17 e, em virtude do reduzido número de amostras, foram realizados testes não paramétricos: Fisher's Exact Test para análise dos resultados da Imagiologia, Mann-Whitney Test para a Imunohistoquímica, e Wilcoxon 2-Group Test para o PCR em tempo real de EGFR, admitindo um nível de significância de 95% ($p < 0,05$; 2-tailed).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. RAÇA, IDADE E SEXO

Na tabela 7 estão apresentadas as raças dos 105 canídeos incluídos neste estudo e que foram submetidos a uma TAC crânio-encefálica, cujo exame revelou a presença de uma lesão intracraniana que ocupa espaço.

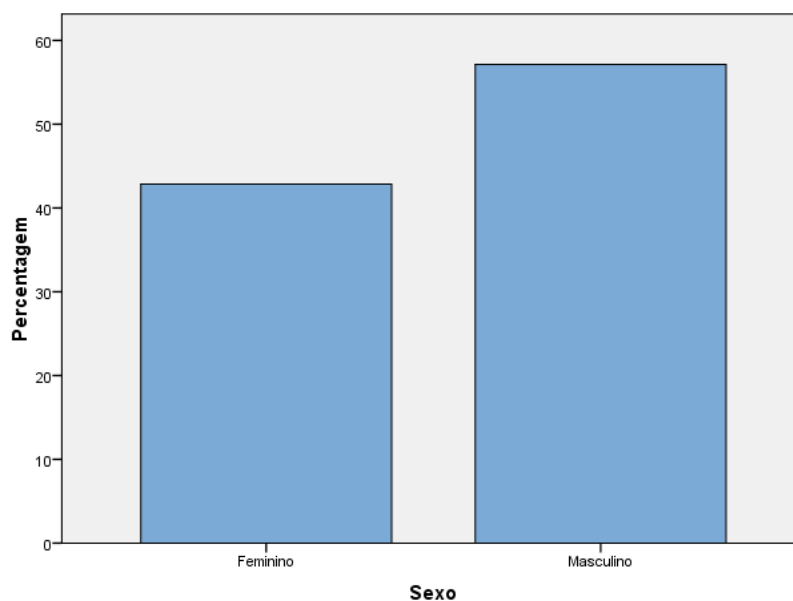
Tabela 7: Número de cães por raça e sua percentagem relativa.

Raça	Número N=105	%
Boxer	54	51,4
Indeterminada	17	16,2
Labrador	5	4,8
Pastor Alemão	4	3,8
Epagneul Breton	3	2,9
x Boxer	2	1,9
Cão d'Água	2	1,9
Cocker Spaniel	2	1,9
Shar-pei	2	1,9
Yorkshire Terrier	2	1,9
Bulldog Francês	1	0,9
Caniche	1	0,9
x Caniche	1	0,9
Collie	1	0,9
Fox Terrier	1	0,9
Husky Siberiano	1	0,9
x Pastor Alemão	1	0,9
Pinscher	1	0,9
Rottweiler	1	0,9
São Bernardo	1	0,9
Serra d'Aires	1	0,9
Viszla Húngaro	1	0,9

De entre os 105 animais, foram observados os seguintes exemplares: 54 Boxer (51,4%), 17 Raça indeterminada (16,2%), 5 Retriever do Labrador (4,8%), 4 Pastor Alemão (3,8%), 3 Epagneul Breton (2,9%), 2 exemplares cruzados com Boxer (1,9%), 2 Cão d'Água (1,9%), 2 Cocker Spaniel (1,9%), 2 Shar-pei (1,9%), 2 Yorkshire Terrier (1,9%), 1 Bulldog Francês (0,9%), 1 Caniche (0,9%), 1 exemplar cruzado com Caniche (0,9%), 1 Collie (0,9%), 1 Fox Terrier (0,9%), 1 Husky Siberiano (0,9%), 1 exemplar cruzado com Pastor Alemão (0,9%), 1 Pinscher (0,9%), 1 Rottweiler (0,9%), 1 São Bernardo (0,9%), 1 Serra d'Aires (0,9%), e 1 Vizsla Húngaro (1,1%).

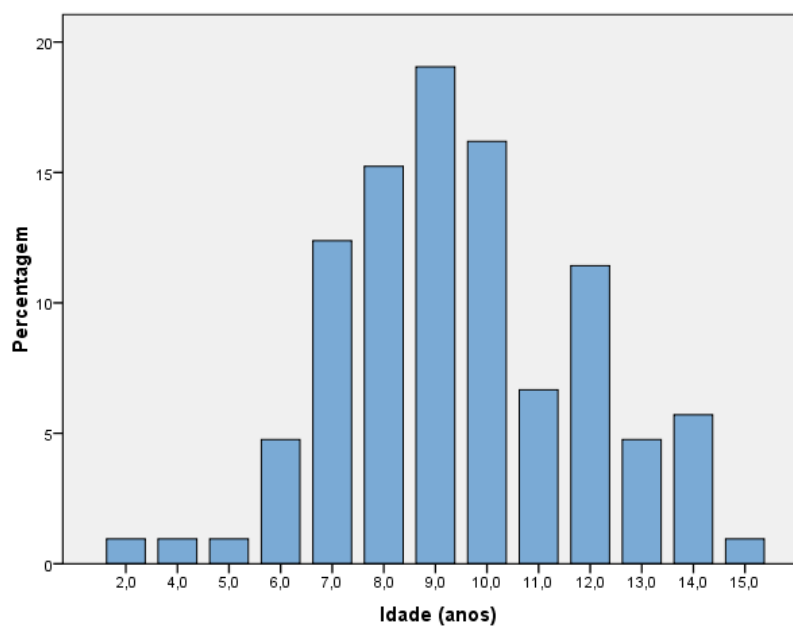
A percentagem relativa de animais do sexo masculino e feminino é de 57,1% (60/105) e 42,9% (45/105), respectivamente (gráfico 1).

Gráfico 1: Percentagens relativas de fêmeas e machos incluídos no estudo.



No gráfico 2 estão apresentadas as percentagens relativas das idades dos animais incluídos no nosso estudo. A média de idades é de 9,44 anos e a mediana 9 anos.

Gráfico 2: Percentagens relativas das idades dos cães incluídos no estudo.



Na tabela 8 está apresentado o número de cães por grupo etário considerado. O grupo até aos 5 anos é constituído por 3 animais, o grupo dos 6 aos 8 anos por 35 animais, o grupo dos 9 aos 12 anos por 55 animais e o grupo acima dos 13 anos por 12 animais.

Tabela 8: Número de cães por grupo etário.

Grupo etário	Número de cães
≤ 5 anos	3
6-8 anos	35
9-12 anos	55
≥ 13 anos	12

Os 7 casos de meningioma ocorreram em 4 raças diferentes (4 em Raça Indeterminada, 1 em Boxer, 1 em Pastor Alemão e 1 num animal cruzado com Caniche), enquanto que os 16 casos de gliomas ocorreram em 4 raças diferentes (12 em Boxer, 1 em Raça Indeterminada, 1 num animal cruzado com Boxer, 1 em São Bernardo e 1 em Labrador). O tumor hipofisário ocorreu num Boxer, o neuroblastoma num Boxer, e a metástase cerebral num animal de raça indeterminada.

3.2. IMAGIOLOGIA

Na tabela 9 estão apresentadas as características imagiológicas das TAC crânio-encefálicas que confirmaram a presença de uma lesão que ocupa espaço intracraniana.

No que respeita à localização anatómica mais frequente das lesões intra-cranianas, 44,8% (47/105) dos casos envolviam o lobo frontal, 25,7% (27/105) o lobo temporal, 13,3% (14/105) o lobo piriforme, 11,4% (12/105) o bulbo olfactivo, 8,6% (9/105) o cerebelo, 8,6% (9/105) a hipófise, 8,6% (9/105) o tronco cerebral, 5,7% (6/105) o tálamo, 3,8% (4/105) o lobo parietal, e 1% (1/105) o lobo occipital. É importante frisar que a soma das percentagens é maior que 100, pois em 28 casos mais do que um lobo estava afectado.

Quanto aos hemisférios envolvidos, 46,7% (49/105) das lesões localizaram-se no hemisfério direito, 37,1% (39/105) no hemisfério esquerdo e 20% (21/105) em estruturas ímpares e medianas. Em 4 casos existia mais do que uma lesão intracraniana, daí resultando que a soma das percentagens relativa seja superior a 100.

Tabela 9: Características imagiológicas das TAC que revelaram a presença de lesão intracraniana, e suas percentagens relativas. A soma das percentagens relativas é superior a 100 pois em 28 casos mais do que um lobo estava afectado.

Imagiologia n=105	Nº	%
Lobo		
Frontal	47	44,8
Temporal	27	25,7
Piriforme	14	13,3
Bulbo olfactivo	12	11,4
Cerebelo	9	8,6
Hipófise	9	8,6
Tronco cerebral	9	8,6
Tálamo	6	5,7
Parietal	4	3,8
Occipital	1	1
Lado		
Direito	49	46,7
Esquerdo	39	37,1
Mediana	21	20
Posição		
Intra-axial	86	81,9
Extra-axial	19	18,1
Densidade		
Isodenso	62	59
Hipodenso	43	41
Hiperdenso	17	16,2
Captação contraste		
Sim	85	81
Não	20	19
Padrão retenção		
Uniforme	42	49,4
Anel	34	40
Não uniforme	19	22,4
Ventriculos		
Simétricos	57	54,3
Assimétricos	48	45,7
Não dilatados	80	76,2
Dilatados	25	23,8
Foice cérebro		
Sem desvio	53	50,5
Desvio	52	49,5

Relativamente à posição axial das lesões, 81,9% (86/105) apresentavam uma posição intra-axial e 18,1% (19/105) uma posição extra-axial.

Em 17/105 (16,2%) casos as lesões intra-cranianas apresentaram densidades mistas, sendo que, 59% (62/105) das lesões eram isodensas, 41% (43/105) eram hipodensas e 16,2% (17/105) eram hiperdensas.

No que diz respeito à captação de contraste das lesões, 81% (85/105) captavam contraste, enquanto que, 19% (20/105) não captavam contraste. Dos 85 casos que captavam contraste, 10 (9,5%) casos apresentavam mais do que um padrão, tendo-se verificado que

dos primeiros 49,4% (42/105) evidenciavam um padrão uniforme, 40% (34/105) um padrão em anel e 22,4% (19/105) um padrão não uniforme.

Quanto à dimensão e simetria do sistema ventricular cerebral, verificou-se que 23,8% (25/105) dos casos apresentavam dilatação ventricular, de grau variável, e 45,7% (48/105) apresentavam assimetria ventricular, igualmente de grau variável.

Finalmente, 49,5% (52/105) dos casos evidenciavam desvio, mais ou menos acentuado, da foice do cérebro.

Seguidamente, na tabela 10 apresentam-se as características imagiológicas segundo a classificação histopatológica em gliomas, meningiomas, tumores da hipófise, neuroblastoma e metástase.

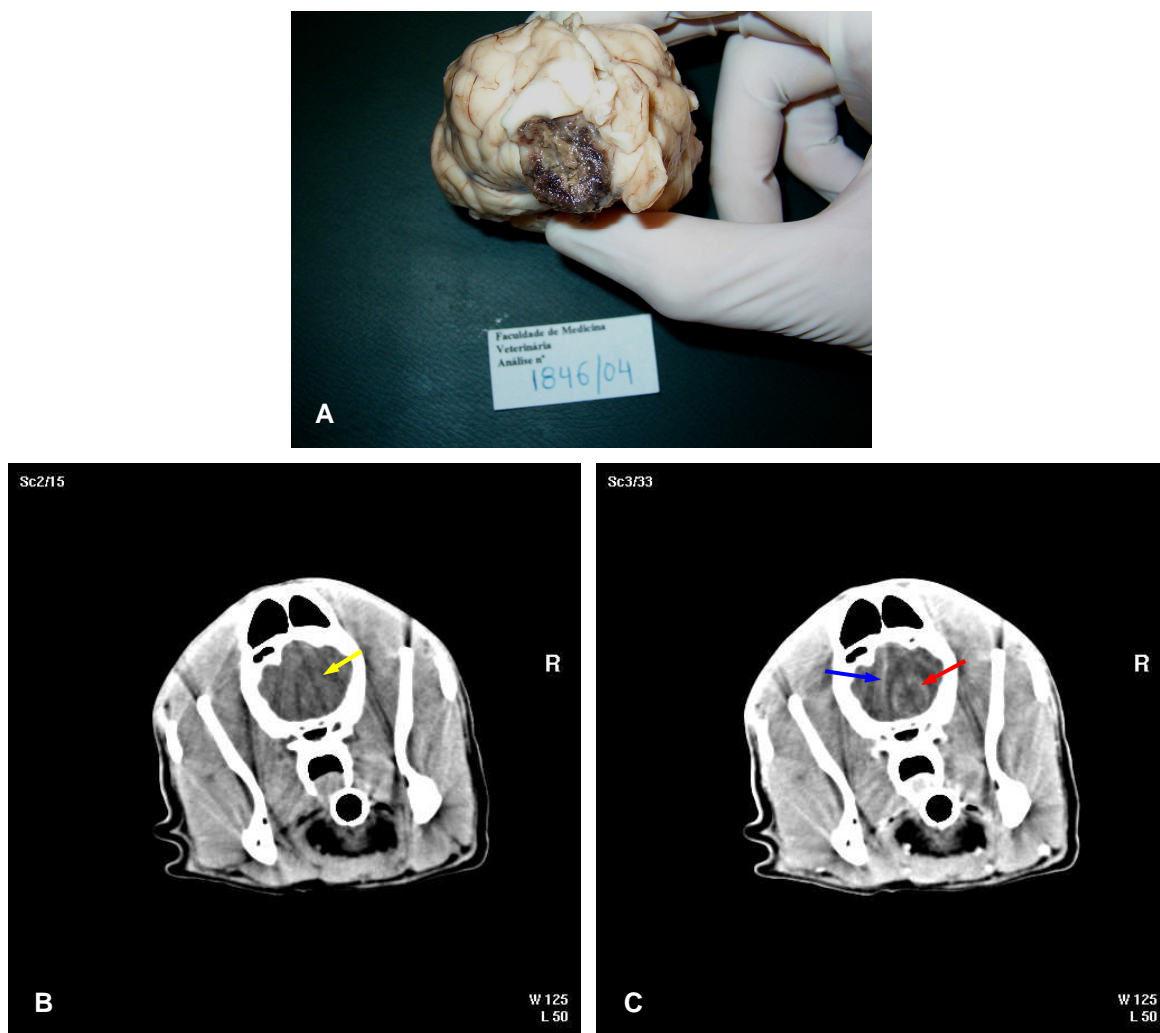
Tabela 10: Características imagiológicas por categoria histopatológica, e entre parêntesis as suas percentagens relativas.

	Gliomas n= 16	Meningiomas n=7	T. hipófise n=1	Neuroblastoma n=1	Metástase n=1
Densidade					
Hiperdenso					
Hipodenso	7 (43,8)	1 (14,3)			
Isodenso	8 (50)	6 (85,7)	1 (100)		
Hipo e hiperdenso					
Iso e hiperdenso				1 (100)	1 (100)
Iso e hipodenso	1 (6,3)				
Captção de contraste					
Com captção	10 (62,5)	7 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Sem captção	6 (37,5)				
Padrão de captção					
Uniforme		3 (42,9)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Não uniforme	1 (10)	1 (14,3)			
Anel	6 (60)	2 (28,6)			
Uniforme+anel	1 (10)	1 (14,3)			
Não uniforme+anel	2 (20)				
Ventriculos					
Dilatados	10 (62,5)	1 (14,3)		1 (100)	
Assimétricos	9 (56,3)	1 (14,3)	1 (100)		1 (100)
Foice do cérebro					
Desvio	13 (81,3)	2 (28,6)			1 (100)

Quanto à densidade, dos 16 gliomas, 7/16 (43,8%) eram hipodensos, 8/16 (50%) eram isodensos, e 1/16 (6,3%) apresentava uma densidade mista (isodenso e hipodenso) (Figura 2). No que diz respeito à captção de contraste e respectivo padrão de captção, 10/16 (62,5%) gliomas captaram contraste, enquanto que 6/16 (37,5%) casos não captaram contraste. Daqueles gliomas que captaram contraste, os padrões de captção foram os seguintes: 1/10 (10%) caso não-uniforme, 6/10 (60%) casos em anel (Figura 3), 1/10 (10%) caso uniforme e em anel, e 2/10 (20%) casos não-uniforme e em anel. Quanto à dimensão e

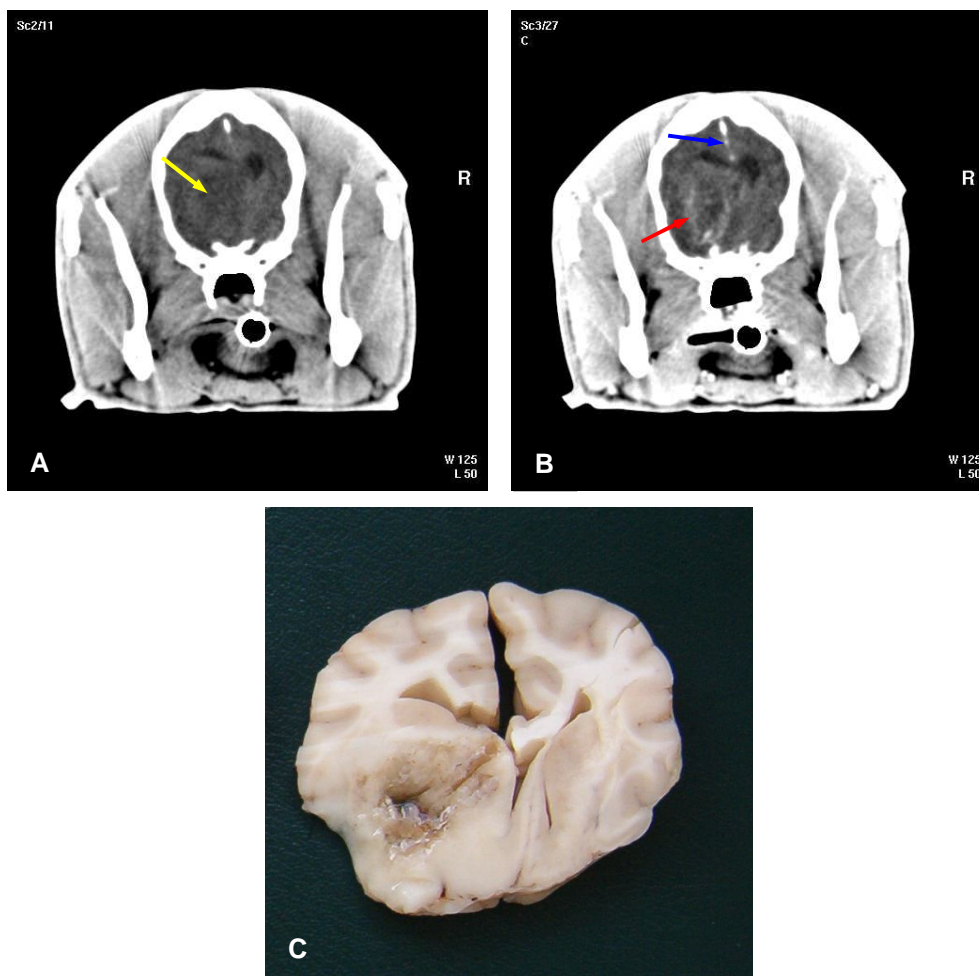
simetria do sistema ventricular cerebral dos gliomas, 10/16 (62,5%) casos apresentavam dilatação ventricular e 9/16 (56,3%) casos apresentavam assimetria. Treze de dezasseis (81,3%) gliomas apresentavam desvio da foice do cérebro.

Figura 2: Astrocitoma de elevado grau.



A) Cérebro após fixação em formol tamponado a 10% - lesão de consistência branda e aspecto marcadamente hemorrágico envolvendo os lobos frontal e bulbo olfativo direitos. B) TAC (estudo pré-contraste) - é visível uma lesão que ocupa espaço no lobo frontal direito iso e hipodensa (seta amarela). C) TAC (estudo pós-contraste) - é notório o efeito de massa com acentuado desvio da foice cerebral (seta azul) assim como captação de contraste em anel (seta vermelha).

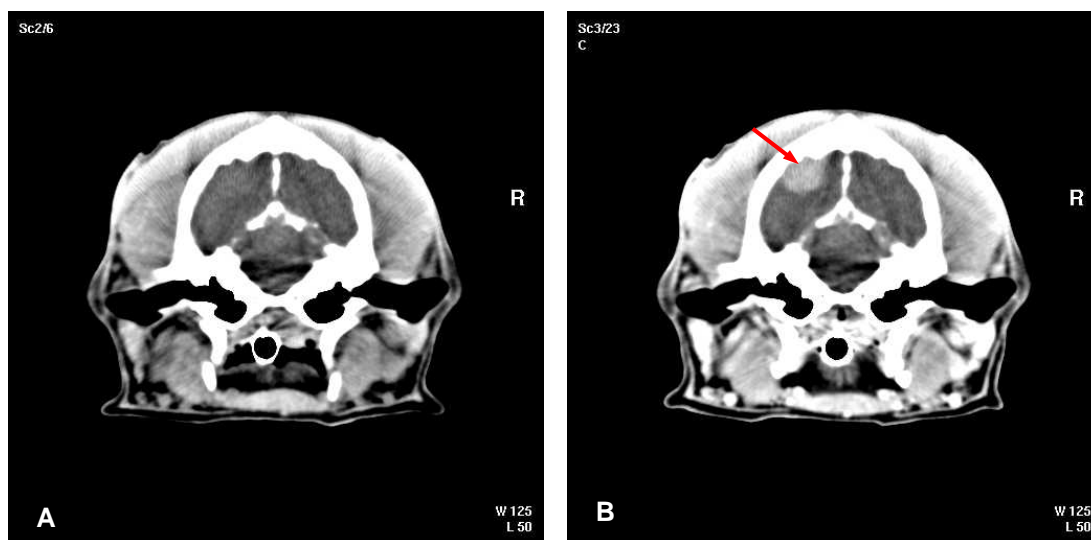
Figura 3: Oligodendroglioma.



A) TAC (estudo pré-contraste) - é visível uma lesão que ocupa espaço no lobo temporal esquerdo hipodensa (seta amarela). B) TAC (estudo pós-contraste) – é notório o efeito de massa com desvio da foixe cerebral (seta azul) e captação de contraste em anel (seta vermelha). C) Cérebro após fixação em formol tamponado a 10% - lesão de consistência gelatinosa e limites mal definidos envolvendo os lobos temporal e frontal esquerdos.

Quanto à densidade, dos 7 meningiomas, 1/7 (14,3%) era hipodenso, 6/7 (85,7%) eram isodensos. No que diz respeito à captação de contraste e respectivo padrão de captação todos os 7/7 (100%) meningiomas captaram contraste. Daqueles meningiomas que captaram contraste, os padrões de captação foram os seguintes: 3/7 (42,9%) casos uniforme (Figura 4), 1/7 (14,3%) caso não-uniforme, 2/7 (28,6%) casos em anel, e 1/7 (14,3%) caso uniforme e em anel (Figura 5). Quanto à dimensão e simetria do sistema ventricular cerebral dos meningiomas, 1/7 (14,3%) caso apresentavam dilatação ventricular e 1/7 (14,3%) caso apresentavam assimetria. Dois em sete (28,6%) meningiomas apresentavam desvio da foixe do cérebro.

Figura 4: Meningioma fibroso.



A) TAC (estudo pré-contraste) – a lesão isodensa localizada no lobo parietal esquerdo. B) TAC (estudo pós-contraste) – é visível a forte e uniforme captação de contraste (seta vermelha).

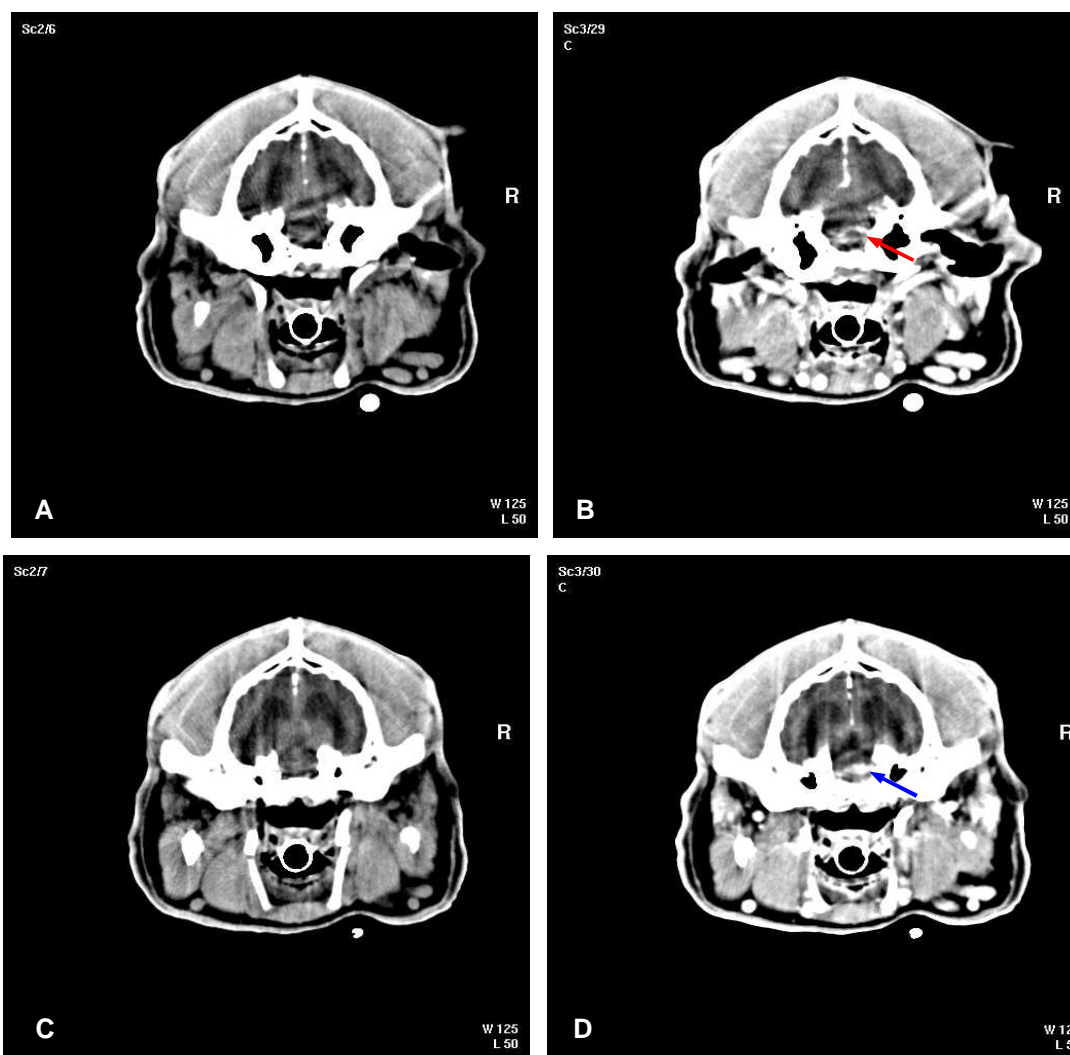
O único caso de tumor da hipófise apresentava as seguintes características imagiológicas: isodenso, captava contraste num padrão uniforme e assimetria ventricular.

O único caso de neuroblastoma cerebral apresentava as seguintes características imagiológicas: isodenso e hiperdenso, captava contraste num padrão uniforme e dilatação ventricular.

O único caso de metástase cerebral apresentava as seguintes características imagiológicas: isodenso e hiperdenso, captava contraste num padrão uniforme, assimetria ventricular e desvio da foice do cérebro.

Quanto à localização das lesões por tipo histopatológico os meningiomas evidenciaram uma distribuição cerebral diversa, tendo num caso afectado mais do que um lobo. Assim, foram encontradas lesões nos seguintes regiões anatómicas: frontal (3), parietal (2), tronco cerebral (2), bulbo olfactivo (1). Por outro lado, os gliomas envolveram mais do que um lobo em seis casos, tendo sido encontradas lesões nos lobos frontal (11), temporal (8), piriforme (2), bulbo olfactivo (1), e tálamo (1).

Figura 5: Meningioma maligno.



A e C) TAC (estudo pré-contraste em cortes consecutivos) – a lesão embora localizada na superfície ventral do tronco cerebral não é visível devido ao artefacto característico desta zona cerebral, provocado pela grande espessura dos ossos do crânio do cão a nível das bolhas timpânicas. B e D) TAC (estudo pós-contraste em cortes consecutivos) – é visível uma lesão no tronco cerebral com captação de contraste em anel (seta vermelha) (B) e uniforme (seta azul) (D). É apreciável também um aumento simétrico do volume do sistema ventricular atribuída à idade do animal.

3.2.1. Estatística de Imagiologia

Os dados referentes à imagiologia foram analisados comparando 2 tipos de tumores: gliomas e meningiomas, recorrendo ao teste estatístico Fisher's Exact Test e considerando como significativo $p < 0,05$. As diferenças entre gliomas e meningiomas foram significativas no que diz respeito às raças afectadas ($p=0,004$), e ao desvio da foice do cérebro ($p=0,026$); e mostraram ser não significativas relativamente ao sexo ($p=0,657$), ao lobo afectado ($p=0,099$), à densidade das lesões ($p=0,324$), à captação de contraste ($p=0,124$), ao padrão de captação de contraste ($p=0,139$), à dilatação do sistema ventricular cerebral ($p=0,069$), e à simetria do sistema ventricular cerebral ($p=0,089$).

3.3. SINTOMATOLOGIA

Na tabela 11 estão apresentados os resultados da sintomatologia de 75 canídeos com lesão intracraniana.

Tabela 11: Sinais e sintomas apresentados por 75 cães com lesão intracraniana, e suas percentagens relativas. A soma das percentagens relativas é superior a 100, pois muitos animais apresentavam mais do que um sinal/sintoma.

Sinais clínicos	Número N=75	%
Epilepsia	47	62,7
Alteração da locomoção (ataxia)	31	41,3
Alteração do estado mental (depressão, stupor, coma)	22	29,3
Alterações da visão (cegueira)	20	26,7
Andamento em círculo	19	25,3
Pressão da cabeça contra objectos	19	25,3
Alteração de outros nervos cranianos	16	21,3
Deficits proprioceptivos	16	21,3
Alteração comportamento (ex: vocalização, agressividade, andar errante, urinar, defecar em casa)	14	18,7
Inclinação da cabeça	8	10,7
Tetraparésia	7	9,3
Outras observações		
Poliúria/polidipsia	6	8
Atrofia muscular cabeça	4	5,3
Polifagia	2	2,7
Tremores em repouso	2	2,7
Dor manipulação cabeça	1	1,3
Hipertermia	1	1,3

Dos 75 animais em que foi possível registar os sinais clínicos apresentados, obtiveram-se os seguintes resultados: 47/105 (62,7%) epilepsia (incluí 4 casos de *status epilepticus*), 31/105 (41,3%) alterações da locomoção (ataxia), 22/105 (29,3%) alterações do estado mental, 20/105 (26,7%) alterações do par II dos nervos cranianos, 19 /105 (25,3%) andamento em círculos, 19 /105 (25,3%) pressão da cabeça contra objectos, 16/105 (21,3%) alteração de outros nervos cranianos, 16/105 (21,3%) deficits proprioceptivos, 14/105 (18,7%) alteração de comportamento, 8/105 (10,7%) inclinação da cabeça, 7/105 (9,3%) tetraparésia, 6/105 (8%) polidipsia/poliúria, 4/105 (5,3%) atrofia muscular na cabeça, 2/105 (2,7%) polifagia, 2/105 (2,7%) tremores em repouso, 1/105 (1,3%) dor à manipulação cabeça, e 1/105 (1,3%) hipertermia.

Quarenta e sete animais apresentavam epilepsia como único sintoma ou associado a outros sintomas. Na tabela 12 estão apresentadas as localizações, por lobo/região anatómica cerebral, das lesões intracranianas dos animais que apresentavam epilepsia. Mais uma vez, a soma das percentagens relativas é superior a cem, dado que algumas lesões abrangiam mais do que um lobo/região cerebral.

Tabela 12: Localização anatómica da lesão intracraniana dos animais que apresentavam epilepsia, e suas percentagens relativas. A soma das percentagens é superior a 100, pois em alguns casos as lesões abrangiam mais do que um lobo.

Epilepsia n=47	Número	%
Lobo afectado		
Frontal	26	55,3
Temporal	14	29,8
Piriforme	9	19,1
Bulbo olfactivo	6	12,8
Parietal	2	4,3
Tálamo	2	4,3
Hipófise	1	2,1

Nos casos em que os animais apresentavam epilepsia, a lesão estava localizada no lobo frontal em 26/47 (55,3%) casos, no lobo temporal 14/47 (29,8%) casos, no lobo piriforme 9/47 (19,1%) casos, no bulbo olfactivo 6/47 (12,8%) casos, no lobo parietal 2/47 (4,3%) casos, no tálamo 2/47 (4,3%) casos, e na hipófise 1/47 (2,1%) casos.

3.4. HISTOPATOLOGIA

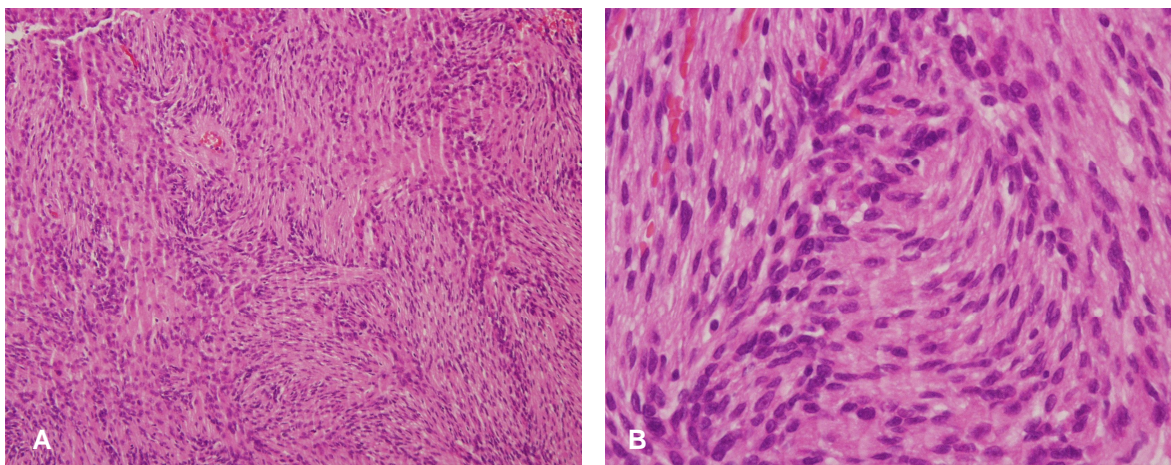
Na tabela 13 estão apresentados os resultados histopatológicos das neoplasias intracranianas.

Tabela 13: Classificação histopatológica de 26 lesões intracranianas.

Histopatologia (n=26)	Nº	%	% dentro do tipo
Meningiomas	7	26,9	
Meningioma fibroso	2	7,7	28,6
Meningioma meningoteliomatoso	2	7,7	28,6
Meningioma anaplásico (maligno)	2	7,7	28,6
Meningioma	1	3,8	14,3
Gliomas	16	61,5	
Oligodendroglioma	7	26,9	43,8
Oligodendroglioma anaplásico (maligno)	1	3,8	6,3
Astrocitoma de elevado grau	2	7,7	12,5
Astrocitoma fibrilhar	2	7,7	12,5
Astrocitoma de grau médio	1	3,8	6,3
Astrocitoma gemistocítico	1	3,8	6,3
A. fibrilhar e elevado grau (glioma misto)	1	3,8	6,3
A. fibrilhar e oligodendroglioma grau médio (glioma misto)	1	3,8	6,3
Adenoma acidofílico pars distalis (hipófise)	1	3,8	100
Neuroblastoma cerebral	1	3,8	100
Metástase de tumor não identificado	1	3,8	100

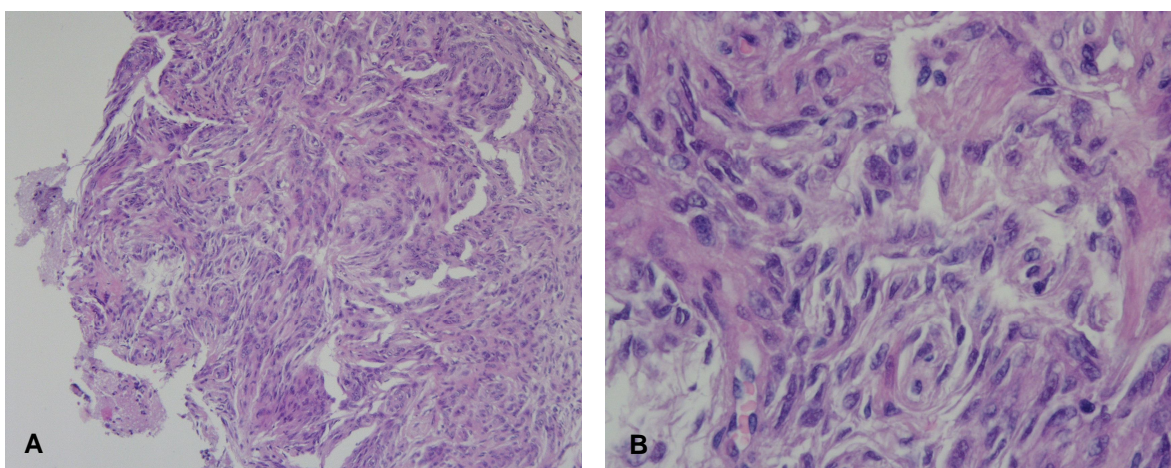
Dos 26 casos em que foi possível obter a classificação histopatológica das lesões intracranianas observadas na TAC crânio-encefálica, todos revelaram a existência de uma neoplasia intra-craniana: 7/26 (26,9%) meningiomas, 16/26 (61,5%) gliomas, 1/26 (3,8%) adenomas da hipófise, 1/26 (3,8%) neuroblastoma cerebral, e 1/26 (3,85%) metástase intracraniana de tumor não identificado. Dentro dos meningiomas obtivemos 2/7 (28,6%) meningiomas fibrosos (Figura 6), 2/7 (28,6%) meningiomas meningoteliomatosos (Figura 7), 2/7 (28,6%) meningiomas anaplásicos, e 1/7 (14,3%) meningioma.

Figura 6: Meningioma fibroso (HE).



A) Nesta microfotografia é visível o típico arranjo das células em feixes orientados em múltiplas direcções (HE; x100). B) Nesta microfotografia, maior ampliação da imagem anterior, pode-se observar as células de perfil fusiforme que compõem os feixes (HE; x400).

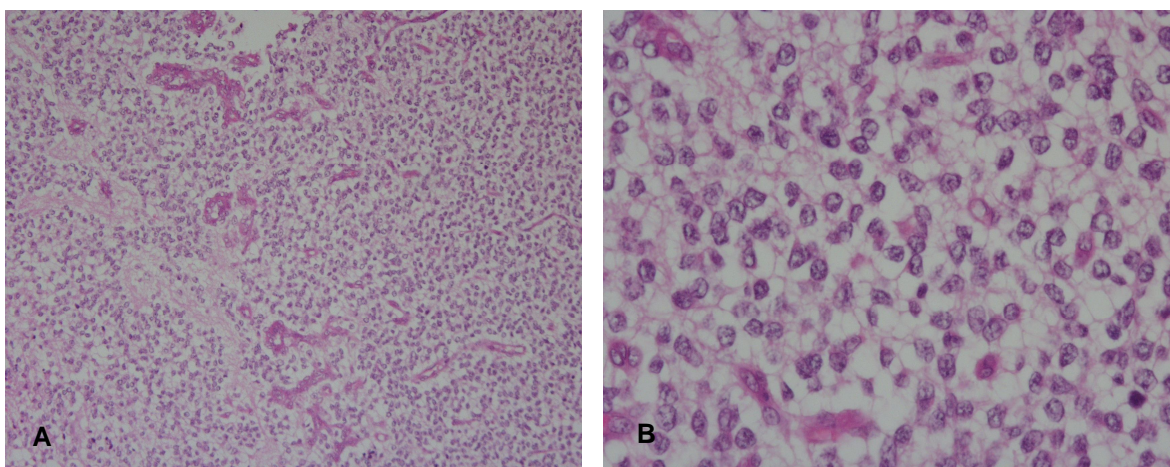
Figura 7: Meningioma meningoteliosomatoso (HE).



A) Nesta microfotografia é evidente o esboço de formação de estruturas lobulares (HE; x100). B) Nesta microfotografia, maior ampliação da imagem anterior, é visível em pormenor uma estrutura lobular (HE; x400).

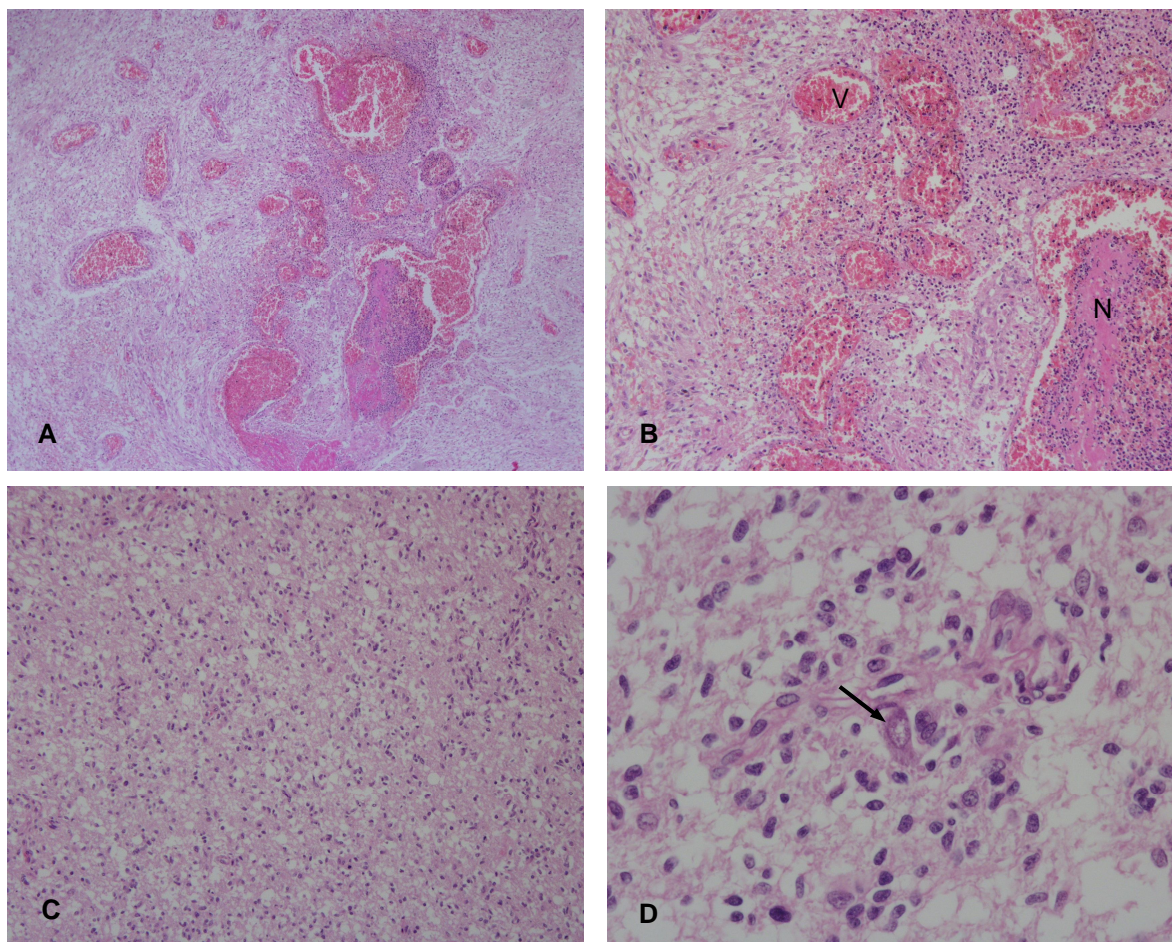
Dentro dos gliomas os resultados foram os seguintes: 7/16 (43,8%) oligodendrogliomas (Figura 8), 1/16 (6,3%) oligodendroglioma anaplásico, 2/16 (12,5%) astrocitomas de elevado grau (Figura 9), 2/16 (12,5%) astrocitomas fibrilares (Figura 10), 1/16 (6,3%) astrocitoma de grau médio, 1/16 (6,3%) astrocitoma gemistocítico, 1/16 (6,3%) astrocitoma fibrilar e de elevado grau (glioma misto), e 1/16 (6,3%) astrocitoma fibrilar e oligodendroglioma de grau médio (glioma misto).

Figura 8: Oligodendroglioma (HE).



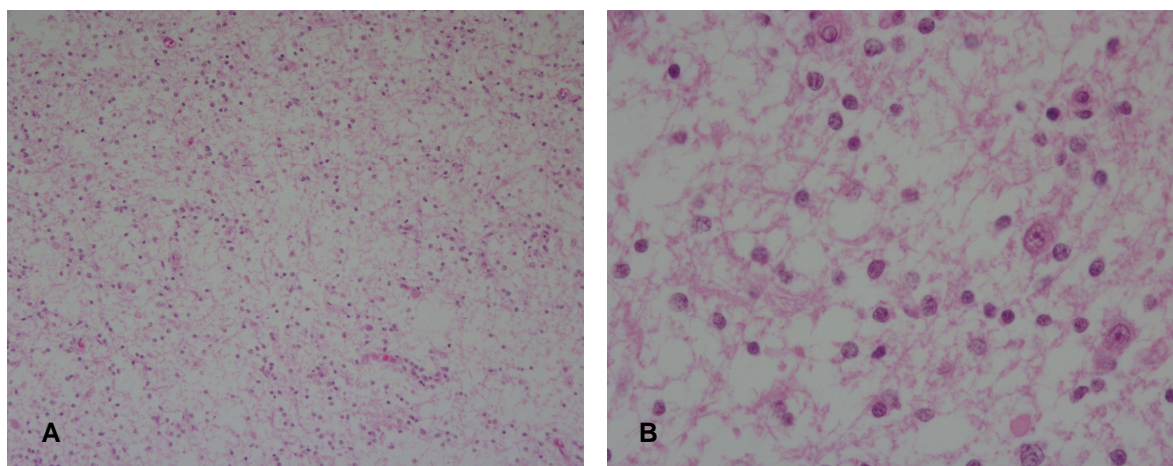
A) Nesta microfotografia é visível a celularidade elevada desta neoplasia (HE; x100). B) Nesta microfotografia, maior ampliação da imagem anterior, é evidente a uniformidade do tamanho e forma celular e nuclear dos oligodendrócitos, assim como a típica vacuolização peri-nuclear criando um halo (HE; x400)

Figura 9: Astrocitoma de elevado grau (HE).



A) Nesta microfotografia é visível a elevada celularidade, assim como áreas necrose (HE; x40). B) Nesta microfotografia, maior ampliação da imagem anterior, é visível em pormenor a abundância de vasos (V) e também necrose (N) (HE; x100). C) Nesta microfotografia de outro campo do mesmo tumor, é apreciável uma área caracterizada por elevada celularidade (HE; x100). D) Nesta microfotografia, maior ampliação da imagem anterior, é visível no centro uma célula com atipia nuclear (seta preta), consideravelmente maior que as células circundantes (HE; x400).

Figura 10: Astrocitoma fibrilhar (HE).



A) Nesta microfotografia, é observável a moderada celularidade deste tumor (HE; x100). B) Nesta microfotografia, maior ampliação da imagem anterior, é apreciável o espaçamento entre as células, bem como o aspecto fibrilhar inter-celular (HE; x400).

3.5. MUTAÇÕES DO GENE p53

Das 19 amostras [12 gliomas (6 oligodendrogliomas, 6 astrocitomas), 6 meningiomas e 1 metástase de tumor não identificado] onde foi feita a amplificação de p53 e sequenciação directa não foram encontradas quaisquer mutações (Tabela 14).

Tabela 14: Mutações de p53 (de exão 5 a exão 10), por tipo histopatológico.

Amostra nº	Histopatologia	Mutações p53
03/04T	Astrocitoma elevado grau	Não
04/04T	Oligodendroglioma	Não
07/04T	Meningioma anaplásico	Não
08/04T	Meningioma anaplásico	Não
12/04T	Astrocitoma fibrilhar	Não
13/04T	Oligodendroglioma	Não
14/04T	Oligodendroglioma	Não
15/04T	Astrocitoma alto grau	Não
16/04T	Oligodendroglioma	Não
17/04T	Astrocitoma fibrilhar	Não
18/04T	Astrocitoma gemistocítico	Não
22/05T	Meningioma menigiteliomatoso	Não
23/05T	Oligodendroglioma	Não
24/06T	Astrocitoma grau médio	Não
25/07T	Meningioma fibroso	Não
26/07T	Oligodendroglioma	Não
27/07T	Meningioma menigiteliomatoso	Não
Im 28T	Meningioma fibroso	Não
Im 53T	Metástase de tumor não identificado	Não

3.6. PCR EM TEMPO REAL DO GENE EGFR

O PCR em tempo-real para quantificação relativa da expressão de mRNA de EGFR foi realizada em 11 gliomas (5 astrocitomas e 6 oligodendrogliomas) e 5 meningiomas, estando os resultados apresentados na tabela 15 sob a forma de N-fold (ou seja, sob a forma de múltiplos de vezes em relação à expressão no tecido cerebral sem patologia), e em negrito as médias para o respectivo tipo histopatológico. Os meningiomas apresentaram uma expressão relativa do gene EGFR de 9,27-fold, enquanto os gliomas uma expressão relativa de 7,87-fold, comparada com a expressão em tecido cerebral normal. Dentro dos gliomas, os astrocitomas apresentaram uma expressão relativa de 10,46-fold, enquanto os oligodendrogliomas uma expressão relativa de 5,72-fold, também quando comparada com a expressão no tecido cerebral normal.

Tabela 15: Quantificação relativa da expressão de EGFR em N-fold. Em negrito estão apresentados os valores médios.

Caso	Tipo Tumor	EGFR N-Fold
Gliomas (n=11)		7,87
Oligodendrogliomas (n=6)		5,72
04/04T	Oligodendroglioma	10,67
13/04T	Oligodendroglioma	1,28
14/04T	Oligodendroglioma	4,44
16/04T	Oligodendroglioma	1,61
23/05T	Oligodendroglioma	10,48
26/07T	Oligodendroglioma	5,82
Astrocitomas (n=5)		10,46
12/04T	Astrocitoma fibrilhar	11,18
15/04T	Astrocitoma alto grau	5,24
17/04T	Astrocitoma fibrilhar	23,71
18/04T	Astrocitoma gemistocítico	10,51
24/06T	Astrocitoma grau médio	1,65
Meningiomas (n=5)		9,27
07/04T	Meningioma anaplásico	5,33
08/04T	Meningioma maligno	1,93
22/05T	Meningioma meningotelomatoso	9,00
25/07T	Meningioma fibroso	8,06
27/07T	Meningioma meningotelomatoso	22,01

No gráfico 3 estão apresentadas as médias e desvios padrão de expressão relativa de EGFR sob a forma de N-fold dos meningiomas e gliomas e no gráfico 4 os mesmos dados relativos aos astrocitomas e oligodendrogliomas.

Gráfico 3: Média e desvio padrão em N-fold da expressão relativa de EGFR de meningiomas e gliomas.

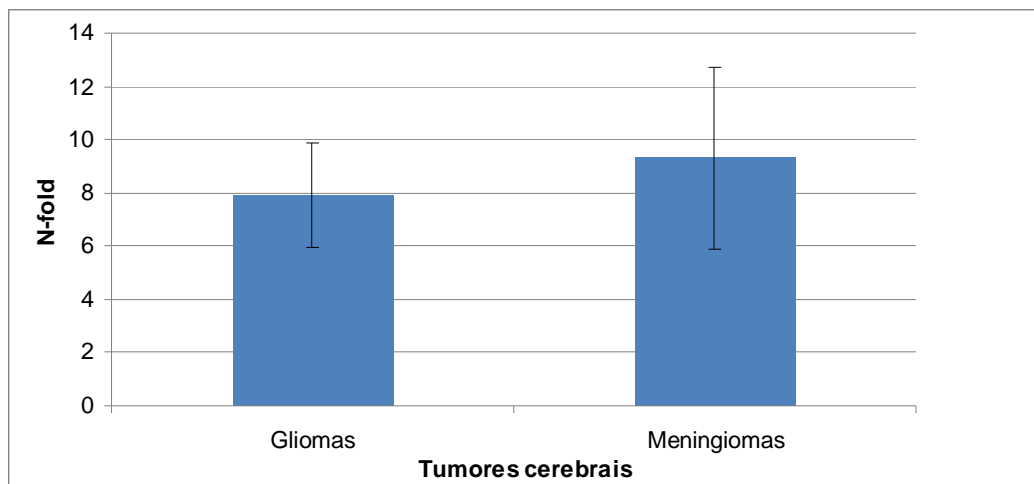
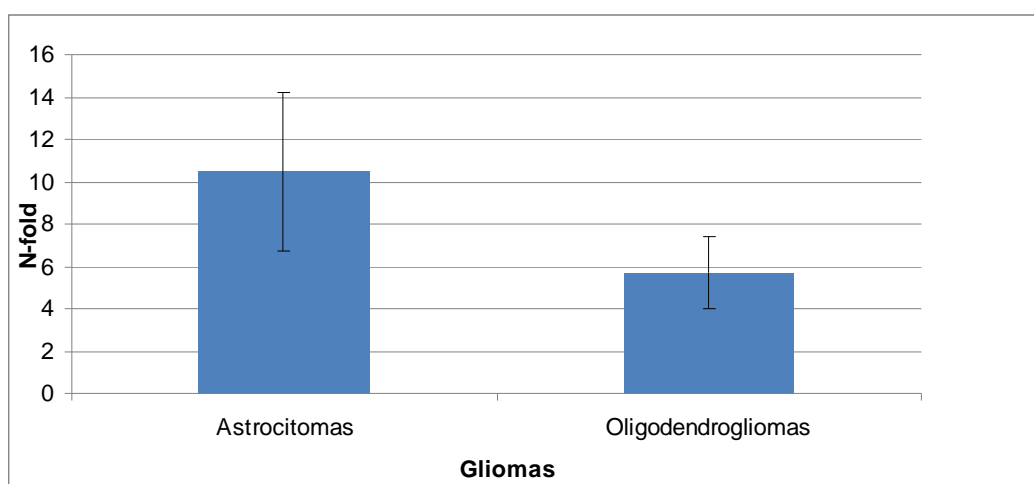


Gráfico 4: Média e desvio padrão em N-fold da expressão relativa de EGFR dos gliomas.



Os dados obtidos por PCR em tempo-real (Δct) foram analisados usando o teste estatístico não-paramétrico “Wilcoxon two-group test” e as diferenças de expressão entre tecido normal *versus* tecido tumoral foram significativas nos meningiomas ($p < 0,05$), gliomas ($p < 0,01$), oligodendrogliomas ($p < 0,05$), e astrocitomas ($p < 0,05$).

3.7. IMUNOHISTOQUÍMICA

Dos cinco anticorpos utilizados para a imunomarcação [Ki-67, p53(DO-7), p53(CM-1), EGFR (E30) e EGFR(2-18C9)], apenas foram obtidos resultados satisfatórios com Ki-67, e EGFR (2-18C9). No caso do anticorpo p53 (CM-1) só foi conseguida marcação num único caso de meningioma fibroso. Nos restantes casos a marcação inespecífica de fundo era muito intensa não permitindo uma diferenciação entre núcleos marcados e não marcados.

3.7.1. Imunohistoquímica de Ki-67

Na tabela 16 estão apresentados os índices de proliferação celular correspondentes à marcação imunohistoquímica de Ki-67, e em negrito os IP médios para os respectivos tipos histopatológicos.

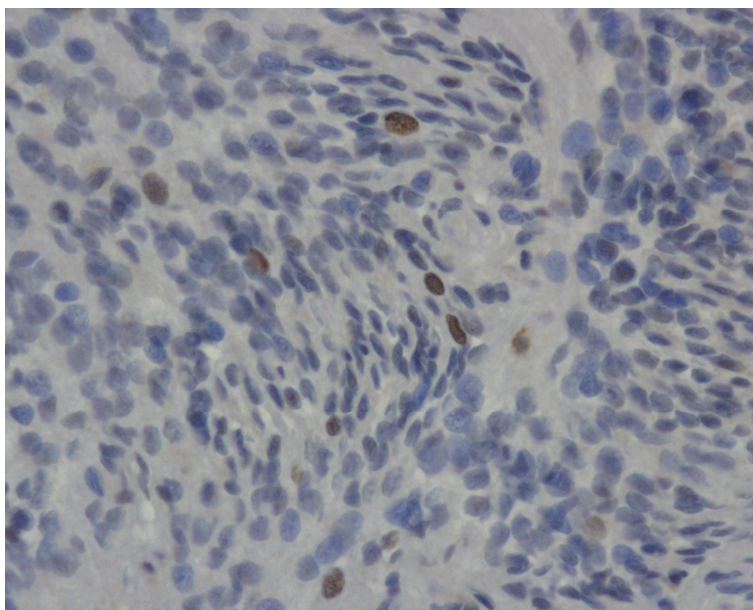
Tabela 16: Índices de proliferação celular (em percentagem) da imunohistoquímica para Ki-67. Em negrito estão apresentados os valores médios por tipo histopatológico.

Caso	Tipo Tumor	Índice proliferação Ki-67 (%)
Gliomas (n=16)		23,26
Oligodendrogliomas (n=8)		30,80
1/03T	Oligodendroglioma	1,40
4/04T	Oligodendroglioma	30,86
13/04T	Oligodendroglioma	23,03
14/04T	Oligodendroglioma	84,00
16/04T	Oligodendroglioma	31,22
23/05T	Oligodendroglioma	22,64
Im39T	Oligodendroglioma anaplásico	26,14
26/07T	Oligodendroglioma	27,09
Astrocitomas (n=8)		15,73
3/04T	Astrocitoma elevada celularidade	1,15
12/04T	Astrocitoma fibrilhar	7,37
15/04T	Astrocitoma alto grau	26,40
17/04T	Astrocitoma fibrilhar	17,02
18/04T	Astrocitoma gemistocítico	13,46
24/06T	Astrocitoma grau médio	10,44
28/07T	Astrocitoma fibrilhar e alto grau (glioma misto)	45,65
29/08T	Oligodendroglioma grau médio e astrocitoma fibrilhar (glioma misto)	4,31
Meningiomas (n=6)		27,57
7/04T	Meningioma anaplásico	44,03
8/04T	Meningioma maligno	30,19
Im28T	Meningioma fibroso	3,96
22/05T	Meningioma meningoteliomatoso	54,12
25/07T	Meningioma fibroso	5,39
27/07T	Meningioma meningoteliomatoso	27,75
Im40T	Neuroblastoma cerebral (n=1)	4,86
2/03T	Adenoma acidofílico da pars distalis (hipófise) (n=1)	0,00

Os índices de proliferação médios foram os seguintes: 27,57% nos meningiomas, 23,26% nos gliomas, 4,86% no neuroblastoma cerebral e 0% no adenoma da hipófise. Dentro dos gliomas obtivemos 30,80% nos oligodendrogliomas e 15,73% nos astrocitomas. Nas figuras 11 e 12 é possível observar a imunomarcção nuclear positiva de cor castanho dourada num meningioma fibroso e neuroblastoma cerebral, respectivamente.

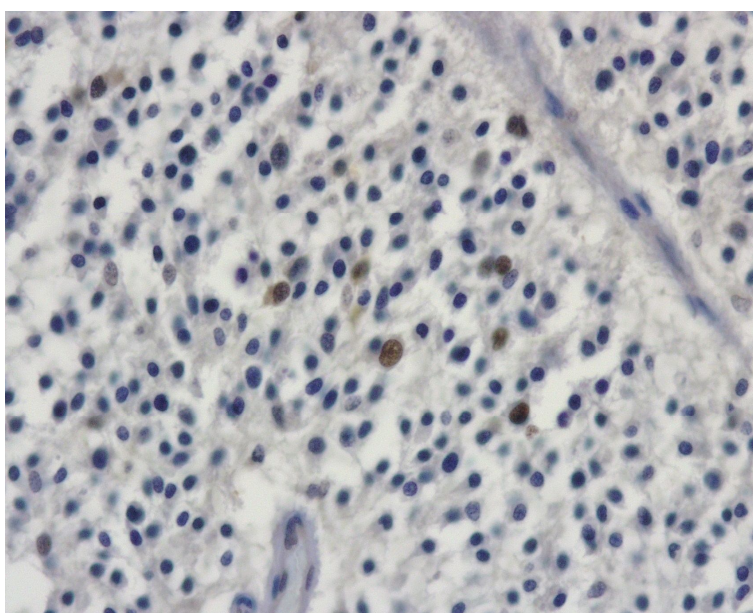
Os dados (índice de proliferação) relativos à imunohistoquímica de Ki-67 foram analisados comparando os 2 tipos de tumores mais frequentes no nosso estudo - gliomas e meningiomas - e também comparando os tipos de gliomas - astrocitomas e oligodendrogliomas - recorrendo em ambos os casos ao teste estatístico não paramétrico "Mann-Whitney test". As diferenças entre gliomas e meningiomas mostraram não ser significativas ($p=0,461$), assim como a aquelas entre astrocitomas e oligodendrogliomas ($p=0,093$).

Figura 11: Meningioma fibroso (IHC).



Imunomarcção positiva para Ki-67. É apreciável a marcação nuclear de cor castanho dourado. EBP, hematoxilina de Meyer, x400.

Figura 12: Neuroblastoma cerebral (IHC).

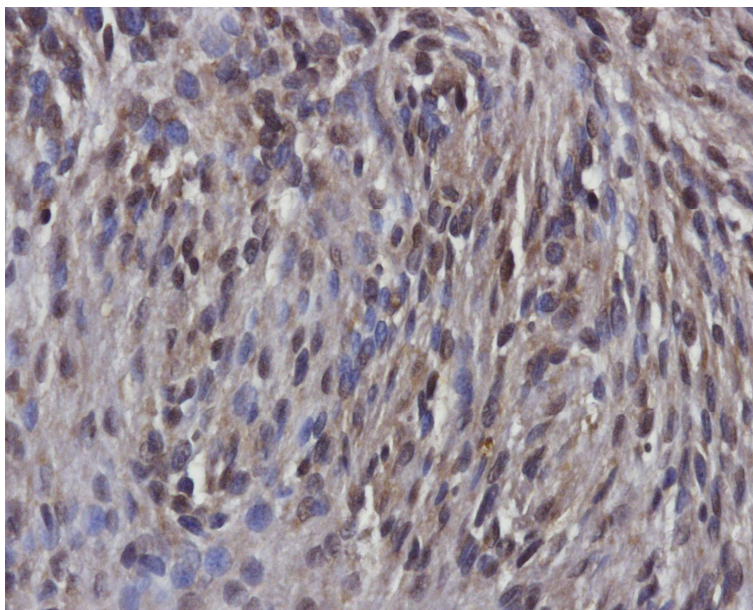


Imunomarcção positiva para Ki-67. É apreciável a marcação nuclear de cor castanho dourado. EBP, hematoxilina de Meyer, x400.

3.7.2. Imunohistoquímica de p53

Como se disse no ponto 3.7., na imunohistoquímica de p53 só foi obtido um caso positivo, apresentando os restantes casos uma forte marcação inespecífica de fundo que não permitia a contagem diferencial celular. Na figura 13 está apresentado o único caso que, embora de qualidade não aceitável, permitia a distinção de núcleos azuis e castanho dourado num meningioma fibroso.

Figura 13: Meningioma fibroso (IHC).



Imunomarcção nuclear para p53 de qualidade não aceitável, mas onde é possível distinguir núcleos azuis e castanho dourado. É apreciável a intensa marcação de fundo inespecífica. EBP, hematoxilina de Meyer, x400.

3.7.3. Imunohistoquímica de EGFR

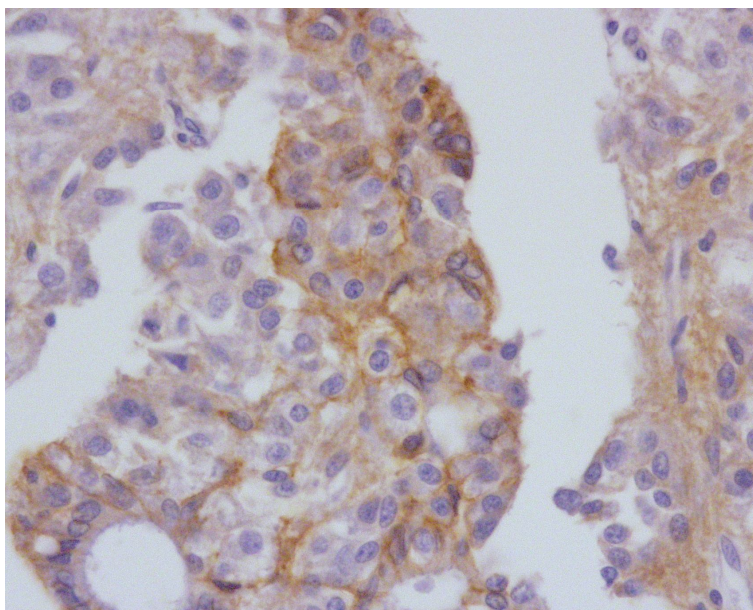
Na tabela 17 estão apresentados os resultados da marcação da imunohistoquímica de EGFR, e em **negrito** os IP médios para os respectivos tipos histopatológicos.

Tabela 17: Imunomarcção para EGFR. Em negrito estão apresentados os valores médios por tipo histopatológico, em percentagem.

Caso	Tipo Tumor	IHC EGFR
Gliomas (n=16)		8/16 (50%)
Oligodendrogliomas (n=8)		4/8 (50%)
1/03T	Oligodendroglioma	0
4/04T	Oligodendroglioma	1+
13/04T	Oligodendroglioma	0
14/04T	Oligodendroglioma	0
16/04T	Oligodendroglioma	0
23/05T	Oligodendroglioma	2+
Im39T	Oligodendroglioma anaplásico	3+
26/07T	Oligodendroglioma	2+
Astrocitomas (n=8)		4/8 (50%)
3/04T	Astrocitoma elevada celularidade	2+
12/04T	Astrocitoma fibrilhar	0
15/04T	Astrocitoma alto grau	1+
17/04T	Astrocitoma fibrilhar	1+
18/04T	Astrocitoma gemistocítico	0
24/06T	Astrocitoma grau médio	0
28/07T	Astrocitoma fibrilhar e alto grau (glioma misto)	0
29/08T	Oligodendroglioma grau médio e astrocitoma fibrilhar (glioma misto)	1+
Meningioma (n=6)		4/6 (66,7%)
7/04T	Meningioma anaplásico	3+
8/04T	Meningioma maligno	1+
Im28T	Meningioma fibroso	1+
22/05T	Meningioma meningoteliomatoso	0
25/07T	Meningioma fibroso	2+
27/07T	Meningioma meningoteliomatoso	0
Neuroblastoma cerebral (n=1)		0/1 (0%)
Im40T	Neuroblastoma cerebral	0
Adenoma acidofílico da pars distalis (hipófise) (n=1)		1/1 (100%)
2/03T	Adenoma acidofílico da pars distalis (hipófise)	3+

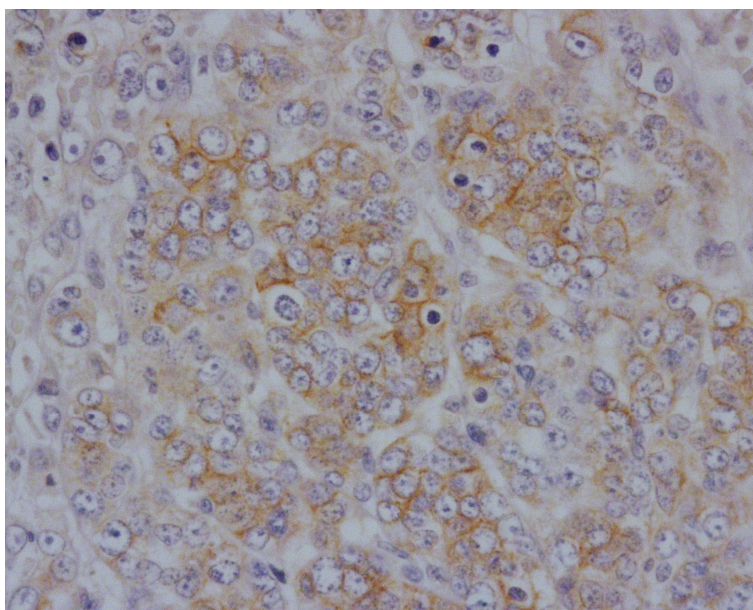
Das 24 amostras em que foram realizadas a imunohistoquímica de EGFR, obtivemos imunomarcções positivas em 4/6 (66,7%) meningiomas, 8/16 (50%) gliomas e, 1/1 (100%) adenoma da hipófise (pars distalis). Dentro dos gliomas obtivemos imunomarcções positivas em 4/8 (50%) oligodendrogliomas e 4/8 (50%) astrocitomas. Nas figuras 14 e 15 é possível observar imunomarcção positiva de EGFR num adenoma da hipófise e num meningioma anaplásico, respectivamente. Os dados relativos à imunohistoquímica de EGFR foram analisados comparando os 2 tipos de tumores mais frequentes no nosso estudo - gliomas e meningiomas - e também comparando os tipos de gliomas – astrocitomas e oligodendrogliomas, recorrendo em ambos os casos ao teste estatístico não paramétrico “Mann-Whitney test”. As diferenças entre gliomas e meningiomas mostraram não ser significativas ($p=0,480$), assim como a aquelas entre astrocitomas e oligodendrogliomas ($p=0,609$).

Figura 14: Adenoma acidofílico da hipófise (IHC).



É visível a forte imunomarcção da membrana citoplasmática e citoplasma para EGFR. EBP, hematoxilina de Meyer, x400.

Figura 15: Meningioma anaplásico (IHC).



É visível a forte imunomarcção da membrana citoplasmática e citoplasma para EGFR. EBP, hematoxilina de Meyer, x400.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. IMAGIOLOGIA

4.1.1. Raça, sexo, idade

Neste estudo, a raça de cães mais representada foi o Boxer (51,4%), uma raça braquicefálica, reforçando a sua, amplamente, descrita e conhecida predisposição para o desenvolvimento de neoplasias intra-cranianas (March, 2000 e Stoica *et al.*, 2004). No entanto, os nossos dados não concordam com um estudo de Bagley *et al.* (1999) em que, entre 97 cães com tumores cerebrais, a raça mais representada foi o Golden Retriever (16%); nem com um outro de Snyder *et al.* (2006) em que, entre 173 cães com tumores intracranianos primários, a raça mais representada foi a indeterminada (32,4%), seguida do Golden Retriever (12,1%) e em 3º o Boxer (10,4%). Contrariamente, LeCouteur (2002) afirma que as raças mais predispostas a desenvolver tumores intracranianos são o Boxer, Golden Retriever, Dobermann Pinscher, Scottish Terrier e Bobtail. Já um estudo de 114 meningiomas realizado por Sturges *et al.* (2008) verificou que a raça mais representada era o Golden Retriever (22,8%), seguida do Labrador Retriever e Boxer (12,3%). O facto do Boxer surgir em 3º lugar no estudo de Sturges *et al.* (2008) não será estranho pois os meningiomas aparecem mais frequentemente em raças dolicocefálicas, enquanto os gliomas ocorrem mais frequentemente em raças braquicefálicas (LeCouteur, 2002; March, 2000; O'Brien & Axlund, 2005 e Stacy *et al.*, 2003), particularmente no Boxer (Long, 2006 e Stoica *et al.*, 2004), e Boston Terrier (Koestner & Higgins, 2002). Assim, parece que a diferença entre o nosso estudo e o de Bagley *et al.* (1999) poderá ser devida apenas a uma diferença de popularidade das diferentes raças em regiões distintas como os Estados Unidos da América e, no nosso caso, Portugal; não podendo excluir-se a hipótese de existir nas linhagens europeias de cães da raça Boxer alguma alteração genética predisponente ao desenvolvimento de tumores cerebrais, ainda não completamente esclarecida. Thomas *et al.* (2009) refere acerca da população canina nos EUA que esta está sobre-representada por cães de morfologia cranio-facial alongada (da qual não faz parte o Boxer), o que reforça a hipótese por nós proposta.

Foram detectadas, por TAC, lesões intra-cranianas em 57,1% de cães do sexo masculino e em 42,9% do sexo feminino. Estes resultados diferiram ligeiramente dos resultados obtidos num estudo semelhante realizado por Stoica *et al.* (2004) em que este encontrou lesões intra-cranianas em 40% de cães machos e 60% de fêmeas. Curiosamente os nossos resultados foram iguais aos de Sturges *et al.* (2008) que nos 112 casos de meningiomas obteve as mesmas percentagens por nós observadas. Assim, a diferença encontrada no

nosso estudo, poderá ser explicada pelo facto de, na área da grande Lisboa (e muito provavelmente no nosso país), haver uma sobre-representação de cães machos, pois a maioria das pessoas ainda prefere um macho a uma fêmea pelos inconvenientes dos períodos de cio destas e, frequentemente, pela relutância demonstrada em realizar a esterilização electiva das mesmas. Apesar desta diferença, quando comparámos o sexo dos animais com meningiomas e gliomas as diferenças não foram significativas ($p=0,657$).

No nosso estudo, as lesões intra-cranianas foram mais prevalentes no grupo etário dos 9 aos 12 anos, notando-se nitidamente uma tendência acima dos 5 anos. Assim, estes resultados condizem com a literatura veterinária que relata que o risco de desenvolvimento de tumores cerebrais é maior acima dos 5 anos de idade (Greene *et al.*, 1989; LeCouteur, 2002; Bagley, 2005a; e Long, 2006). Os nossos resultados concordam, igualmente, com um estudo de Bagley *et al.* (1999) no qual 95% dos cães tinham mais de 5 anos à data em que lhes foi diagnosticado um tumor cerebral.

A média de idades no nosso estudo foi de 9,44 anos, enquanto a mediana foi de 9 anos, confirmando a tendência destas neoplasias de ocorrerem em animais de meia-idade (March, 2000) acima dos 6 anos (Kostner & Higgins, 2002). A média de idades de 9,44 anos foi ligeiramente superior à média de 8 anos de um estudo de Stoica *et al.* (2004), e à média de 8,1 anos encontrada por Platt *et al.* (2002), idêntica à de Snyder *et al.* (2006) que foi de 9,4 anos, e inferior àquela observada por Sturges *et al.* (2008) que foi de 10 anos; tendo a mediana sido igual àquela documentada por Bagley *et al.* (1999). Estas pequenas diferenças entre os vários autores são provavelmente devidas à variação natural entre amostras diferentes estando todas as médias acima dos 5-6 anos.

Os sete casos de meningioma foram encontrados em 4 raças diferentes (57,1% em raça indeterminada, 14,3% em Boxer, 14,3% em Pastor Alemão e 14,3% em cruzamento de Caniche); enquanto que os dezasseis casos de glioma foram encontrados em 5 raças diferentes (75% em Boxer, 6,3% em raça indeterminada, 6,3% em cruzamento de Boxer, 6,3% em São Bernardo, e 6,3% em Labrador). A análise estatística entre meningiomas e gliomas no que respeita às raças envolvidas revelou ser significativa ($p=0,004$). Estes achados confirmam que a maioria dos gliomas tendem a ocorrer em raças braquicefálicas, como o Boxer (March, 2000; Koestner & Higgins, 2002; e Stoica *et al.*, 2004). Stoica *et al.* (2004), num estudo de 31 astrocitomas no cão constatou que 21% de casos ocorriam na raça Boxer, sendo esta a raça mais representada, corroborando assim os nossos resultados. Também Snyder *et al.* (2006) verificou que dos 26 astrocitomas e 25 oligodendrogliomas, 21% e 36%, respectivamente ocorriam em Boxers, e Thomas *et al.* (2009) constataram que 64% dos gliomas ocorriam em raças braquicefálica, e que apenas 23% dos meningiomas ocorriam em Boxers, o que é muito semelhante aos resultados por nós obtidos.

4.1.2. Sinais e sintomas

Os sintomas mais frequentemente apresentados pelos animais submetidos a TAC e com lesões intra-cranianas foram epilepsia (62,7%), ataxia (41,3%), alterações do estado mental (29,3%), alterações do par craniano II (26,7%), andamento em círculos (25,3%) e pressão da cabeça contra objectos (25,3%). Estes resultados são concordantes com Bagley *et al.* (1999), March (2000), Porter *et al.* (2003), Stacy *et al.* (2003), Kuwamura *et al.*, (2004), Dickinson (2005) e Snyder *et al.* (2006) que afirmam ser a epilepsia o sintoma mais frequente em animais com neoplasia intracranianas e muitas vezes o único sintoma presente. Também Platt *et al.* (2002) em 10 biópsias de tumores cerebrais verificou que 40% dos cães apresentavam epilepsia, sendo este o sintoma mais frequente. De acordo com Wilne *et al.* (2007) num artigo de revisão dos sinais e sintomas indicadores da presença de lesões do SNC em crianças, relata como sintomas mais frequentes os seguintes: dor de cabeça (33%), náusea e vômito (32%), alterações do andamento e coordenação (27%), e edema do disco óptico (13%) no caso de tumores intracranianos; náusea e vômito (75%), cefaleias (67%), alterações do andamento e coordenação (60%), e edema do disco óptico (34%) no caso de tumores infratentoriais; sintomas inespecíficos e sinais de aumento da pressão intracraniana (47%), convulsões (38%) e papiloedema (21%) no caso de tumores supratentoriais; e cefaleias (49%), movimentos oculares anómalos (21%), estrabismo (21%), e náusea e vômito (19%) no caso de tumores cerebrais. É importante notar que alguns sintomas descritos na Medicina Humana, como associados à presença de uma lesão intracraniana, são comuns à Medicina Veterinária. Aqueles que não são comuns, como as cefaleias e náuseas estarão provavelmente presentes nos cães com neoplasias intracranianas, tratando-se apenas de uma questão relacionada com o facto de, em Medicina Veterinária, não serem facilmente apreciáveis e quantificáveis.

Oitenta e sete (82,9%) dos 105 casos, em que foi realizado o estudo imagiológico, as lesões afectavam a fossa anterior (supratentoriais), enquanto que apenas 18 (17,1%) envolviam a fossa posterior (infratentoriais). Estes achados mostram a mesma tendência de um estudo realizado por Bagley *et al.* (1999), no qual 76% dos tumores cerebrais apresentavam localização supratentorial, e 24% localização infratentorial.

Quarenta e sete (62,7%) dos 75 cães em que foi possível o registo exaustivo dos sintomas, apresentavam epilepsia, como sintoma único ou em associação a outros sinais e sintomas. Dentro destes casos, 55,3% das lesões envolviam o lobo frontal, 29,8% o lobo temporal, 19,1% o lobo piriforme, 12,8% o bulbo olfactivo, 4,3% o lobo parietal, 4,3% o tálamo, e 2,1% a região supra-selar (hipófise). Estes resultados são semelhantes àqueles de Bagley *et al.* (1999) no qual o lobo mais frequentemente afectado, em animais que apresentavam epilepsia, era o lobo frontal (44%). De acordo com um estudo realizado por McGrath (1960),

80% dos tumores relacionados com convulsões epileptiformes estavam localizados nos lobos frontal e temporal. Koestner & Higgins (2002), também afirmam que, em pacientes com tumores cerebrais localizados nas áreas temporal e piriforme, a epilepsia pode ser o único sintoma neurológico presente. Long (2006) acrescenta que muitas vezes os únicos sintomas de alterações dos lobos frontais e bulbo olfactivo limitam-se a convulsões e alterações comportamentais.

4.1.3. Número e localização das lesões intracranianas

Em cento e um (96,2%) casos as lesões intracranianas eram únicas, o que está de acordo com vários autores que testemunham que a maioria dos tumores cerebrais ocorre sob a forma de uma lesão isolada (Berry, 1998; Kraft & Gavin, 1999 e LeCouteur, 2002). Snyder *et al.* (2006) e Sturges *et al.* (2008) de entre 112 e 172 casos de neoplasia cerebral, respectivamente encontraram, cada um deles, apenas 2 casos em que existia mais do que uma lesão.

No nosso estudo, constatámos que os lobos mais frequentemente afectados eram o lobo frontal (44,8%) e temporal (25,7%), isto é, os hemisférios cerebrais, que são reconhecidos como o local preferencial para a ocorrência dos tumores cerebrais (Bagley *et al.*, 1999 e Stoica *et al.*, 2004). Sturges *et al.* (2008) verificou igualmente que 50,9% dos 112 meningiomas envolviam os hemisférios cerebrais.

Os meningiomas apresentaram uma distribuição anatómica variada, e num único caso foram atingidos mais do que um lobo (frontal e bulbo olfactivo). Assim, no caso dos meningiomas, as lesões localizaram-se nos seguintes lobos/regiões anatómicas: frontal (3), parietal (2), tronco cerebral (2) e bulbo olfactivo (1). Por outro lado, os gliomas apresentaram frequentemente lesões extensas e, em seis casos, mais do que um lobo estava afectado. Nos gliomas a distribuição por lobo/região anatómica foi a seguinte: frontal (11), temporal (8), piriforme (2), bulbo olfactivo (1), e tálamo (1). Ainda que a análise estatística entre meningiomas e gliomas no que respeita aos lobos envolvidos se tenha revelado não ser significativa ($p=0,099$), muito em virtude das diferentes combinações de lobos apresentadas pelos gliomas, estas localizações são semelhantes àquelas reportadas por Braund (1986) e Koestner *et al.* (1999). Bagley (2005a) e O'Brien & Axlund (2005) corroboram que os meningiomas tendem a surgir como lesões bem delimitadas e localizadas, enquanto os gliomas são frequentemente infiltrativos, mal delimitados e abrangendo extensões consideráveis.

Duas das lesões avaliadas na TAC como tendo localização intra-axial revelaram, após exame histopatológico, tratar-se de meningiomas; um dos quais localizado no tronco cerebral, e o outro no bulbo olfactivo e lobo pré-frontal. Embora o nosso número de casos

seja reduzido, este achado parece concordar com a opinião de Kraft *et al.* (1997), que considera que a localização anatômica e a origem axial podem ser enganadoras e não completamente diagnósticas, pois tumores como os meningiomas podem ocorrer em localizações muito diversas, incluindo localizações paranasais, supra-selares, e intraventriculares podendo, desta forma, ser confundidos com outros tipos de tumores mais típicos e específicos dessas localizações. Polizopoulos *et al.* (2004) constatou que a TAC identificou correctamente o tipo histopatológico em 86% dos casos. Também Rodenas, Pumarola, Gaitero, Zamora & Anor (2009) identificou erroneamente, em RM, 2 meningiomas como tendo origem intra-axial. Tendo em atenção estes dados, é possível e provável que a avaliação da origem axial, baseada exclusivamente na imagem da TAC, esteja, no nosso estudo, incorrecta em mais casos, já que não obtivemos a classificação histopatológica (considerada como sendo o diagnóstico definitivo) na totalidade dos 105 casos.

4.1.4. Densidade e Padrões de captação de contraste

Dos 16 gliomas avaliados por TAC, 7 (43,8%) eram hipo-densos, 8 (50%) iso-densos e 1 (6,3%) apresentava densidade mista (iso e hipo-denso). Estes dados são similares àqueles de diversos autores compilados por Kraft & Gavin (1999). Após a administração de contraste, por via endovenosa, 10 (62,5%) gliomas evidenciaram captação do mesmo, apresentando os seguintes padrões: 6 (60%) em anel, 2 (20%) em anel e não uniforme, 1 (10%) não uniforme e 1 (10%) em anel e uniforme. Estes resultados substanciam aqueles de Berry (1998), Kraft & Gavin (1999) e Long (2006) que referem que entre os vários padrões de captação de contraste associado aos gliomas se encontra uma grande diversidade que pode ir desde nenhuma a forte captação e esta pode apresentar padrão em anel, uniforme, não uniforme ou misto. Rodenas *et al.* (2009) ainda que tenha utilizado como método imagiológico a RM, também verificou que 5 dos 15 gliomas não captavam contraste. Acerca desta última referência, podemos acrescentar que a técnica de diagnóstico imagiológico utilizada pelo autor não é relevante já que tanto em TAC como em RM a captação de contraste resulta do mesmo fenómeno e que corresponde a uma alteração da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (Atlas *et al.*, 2002, citado por Rodenas *et al.*, 2009). No entanto, deveremos ter em mente que, embora a captação de contraste evidenciada por uma lesão cerebral possa ser indicativa do tipo de doença implicada, alguns trabalhos já validaram que certos padrões de captação em anel não são patognomónicos de tumores cerebrais (Plummer *et al.* 1992 e Berry, 1998), podendo estar presentes em meningiomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, metástase de tumor mamário, malformações arterio-venosas, MEG encefalite viral (esgana canina), e encefalite fúngica (Plummer *et al.*, 1992 e Wolf *et al.*, 1995). Kraft & Gavin (1999) também corroboram que

existe uma importante variação no padrão de captação de contraste entre os diversos tipos de tumores cerebrais, particularmente naqueles com origem intra-axial como é o caso dos gliomas. Wolf *et al.* (1995) num estudo de correlação de lesões intracranianas que apresentavam um padrão de captação em anel, verificou que este tipo de padrão de captação de contraste em TAC não era um fenómeno específico, e que pode ocorrer numa variedade grande de lesões intracranianas no cão, sejam elas de origem neoplásica ou não neoplásica. Rodenas *et al.* (2009) num estudo das características imagiológica em RM de 40 tumores intracranianos no cão, verificou que dos 15 gliomas, 11 foram identificados correctamente pelos imagiologistas, reforçando a ideia de que, mesmo sendo a RM considerada como o melhor método para detecção de massas intracranianas, a diferenciação entre os diferentes tipos de tumores ainda carece da classificação histopatológica. Mais ainda, Cherubini, Mantis, Martinez, Lamb & Cappello (2005) apenas encontraram associação significativa entre alguns parâmetros imagiológicos em RM e lesões cerebrais de natureza neoplásica, não tendo sido observada qualquer associação para lesões de natureza não-neoplásica, em cães e gatos.

Seis em 7 (85,7%) meningiomas eram iso-opacos, e 1 (14,3%) era hipo-opaco. Estes resultados são similares àqueles de diversos autores compilados por Kraft & Gavin (1999). Todos os 7 casos de meningiomas evidenciaram captação de contraste após administração por via endovenosa. Destes, 3 (42,9%) apresentavam um padrão uniforme, 2 (28,6%) em anel, 1 (14,3%) não uniforme, e 1 (14,3%) uniforme e em anel. Estes dados são concordantes com aqueles de Hathcock (1996) e Long (2006) que afirmam serem os meningiomas tipicamente massas superficiais que apresentam padrões de captação de fortes e uniformes a discretamente não uniforme. Rodenas *et al.* (2009) ainda que tenha utilizado como método imagiológico a RM, também verificou que todos os 9 meningiomas captavam contraste. Esta tendência, evidenciada pelos meningiomas, em captar contraste num padrão forte e uniforme deve-se ao facto deste tipo de tumores ter origem num tipo de tecido que carece de uma barreira hemato-encefálica restritiva (Kraft & Gavin, 1999). Rodenas *et al.* (2009) num estudo das características imagiológica em RM de 40 tumores intracranianos, verificou que dos 9 meningiomas, 6 foram identificados correctamente pelos imagiologistas.

Concordando com a discussão dos dois parágrafos anteriores, a análise estatística entre meningiomas e gliomas no que respeita à opacidade das lesões e captação de contraste não foram significativas com valores de $p=0,324$ e $p=0,124$, respectivamente. Também a diferença estatística, no que respeita ao padrão de captação de contraste, entre gliomas e meningiomas mostrou não ser significativa ($p=0,139$), o que está de acordo com literatura que consistentemente não atribui um padrão de captação de contraste para meningiomas e gliomas.

O único caso de tumor hipofisário era iso-denso e apresentava captação de contraste uniforme. Este achado é concordante com Berry (1998) e Kraft & Gavin (1999) que afirmam que certos tipos de tumores cerebrais, como os tumores da glândula pituitária, tendem a ter uma localização específica e captar contraste num padrão forte e uniforme. Já Pollard *et al.* (2010) num estudo de 33 tumores da hipófise (adenomas, adenomas invasivos e adenocarcinomas) em cães, constatou que 93,9% eram visíveis na TAC ou RM e 93,9% captavam contraste (30,3% não uniforme, 63,6% uniforme). Embora no nosso trabalho apenas tenhamos um caso de tumor da hipófise, parece haver consenso entre a bibliografia acima citada que os tumores da hipófise apresentam uma tendência a captar contraste e de maneira uniforme, como no nosso caso. Isto não é estranho já que a hipófise é uma estrutura com origem extra-axial que não possui uma barreira hemato-encefálica restritiva (Kraft & Gavin, 1999).

O único caso de neuroblastoma cerebral apresentava densidade mista (iso e hiper-denso) tendo um padrão de captação de contraste uniforme.

O único caso de metástase cerebral apresentava densidade mista (iso e hiper-denso) tendo um padrão de captação de contraste uniforme. Este achado não é concordante com o descrito por Kraft & Gavin (1999) que afirmam que as metástases apresentam frequentemente um padrão de captação em anel com um centro hipo ou iso-denso. No entanto, Rodenas *et al.* (2009) ainda que tenha utilizado como método imagiológico a RM, também verificou que 4 das 5 metástases captavam contraste. Esta discrepância pode ser apenas devido ao facto de nosso estudo ter um número muito reduzido de lesões metastáticas.

4.1.5. Sistema ventricular cerebral e foice do cérebro

Dos 105 casos submetidos a TAC, e que revelaram a presença de uma lesão com efeito de massa intracraniana, 45,7% e 23,8% casos apresentavam assimetria e dilatação do sistema ventricular cerebral, respectivamente. Quarenta e nove e meio por cento dos casos revelaram desvio mais ou menos acentuado da foice do cérebro. De acordo com Kraft & Gavin (1999), os diferentes tipos de patologias associadas a alterações das margens e limites anatómicos cerebrais em TAC, são geralmente não específicas mas podem indiciar acerca da natureza benigna ou agressiva da lesão intracraniana em evolução. Além disso, a presença de edema ou desvio, compressão, ou destruição das margens anatómicas normais são exemplos de alterações imagiológicas que sugerem a existência de efeito de massa (Kraft & Gavin, 1999).

É importante salientar aqui que a avaliação da dimensão do sistema ventricular cerebral em TAC põe alguns problemas pois são poucas as publicações que fazem referência àquela.

Borras, Ferrer & Pumarola (1999) num estudo das alterações associadas ao envelhecimento no cérebro de cães verificou que 60% dos animais velhos (>8 anos) evidenciavam um aumento ligeiro a moderado dos ventrículos laterais, e que este achado era constante nos animais com mais de 14 anos, e ausente no grupo controlo de animais jovens (<5 anos). Em humanos este aumento dos ventrículos está associado a uma atrofia da população de neurónios corticais assim como o aumento do próprio lúmen dos ventrículos (Borras *et al.* 1999). A tarefa de avaliar a dimensão do sistema ventricular cerebral é ainda dificultada pela aparente e fisiológica assimetria de numerosas estruturas anatómicas pares (De Hann, Kraft, Gavin, Wendling & Griebenow, 1994 e Vullo *et al.*, 1997). Num estudo realizado por De Haan *et al.* (1994) numa amostra de 62 Labradores Retrievers (sem patologia cerebral rastreada por RM) e em que a apreciação do volume e simetria ventriculares foi realizada de maneira subjectiva, assim como no nosso estudo, verificaram que: 61% dos animais possuíam um sistema ventricular de dimensão e simetria normais, 8% ventrículos dilatados e simétricos, e 31% ventrículos dilatados e assimétricos. Um estudo realizado por Vullo *et al.* (1997) em 17 Cães da Raça Beagle, sem patologia intracraniana, encontrou uma grande variação no volume ventricular (entre 77mm³ e 11726mm³), assim como assimetria, tendo estas diferenças sido consideradas como estando dentro da normalidade. Ainda um outro estudo de Vite, Insko, Schotland, Panckeri & Hendricks (1997) constatou que, em Bulldogs, o volume ventricular era substancialmente maior do que na raça Beagle afirmando, inclusivamente, que se nos abstraíssemos da raça do animal todos os Bulldogs seriam classificados como tendo hidrocefalia.

É interessante verificar que dos 16 gliomas, 10 (62,5%) apresentavam dilatação ventricular, 9 (56,3%) assimetria ventricular e 13 (81,3%) desvio da foice do cérebro. Enquanto que, no caso dos 7 meningiomas, apenas 1 (14,3%) apresentava dilatação ventricular, 1 (14,3%) assimetria ventricular e 2 (28,6%) desvio da foice do cérebro. A análise estatística comparando meningiomas e gliomas no que respeita à dilatação ventricular e simetria do sistema ventricular não foi significativa com valores de $p=0,069$ e $p=0,089$, respectivamente; tendo sido significativa para o desvio da foice do cérebro ($p=0,026$). Daqui é fácil deduzir que os gliomas exercem frequentemente efeito de massa comparado com os meningiomas, o que está de acordo com Rodenas *et al.* (2009) que afirma que os gliomas estão frequentemente associados a edema e conseqüente efeito de massa, muito mais do que os meningiomas.

4.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Nos 26 casos em que foi obtido um diagnóstico definitivo, recorrendo à sua classificação histopatológica, verificou-se que todas as lesões intra-cranianas eram de natureza neoplásica - 96,2% (25/26) tumores primários e 3,8% (1/26) metástase cerebral - tornando este tipo de lesão a única, e mais frequente, encontrada neste estudo. Estes resultados são concordantes com um estudo realizado por Platt *et al.* (2002), em que entre dez casos de biópsias e citologias de lesões intra-cranianas de cães todas elas foram classificadas como neoplásicas. Mas diferem daqueles apresentados por Wolf *et al.* (1995), no qual, de entre 15 casos, encontrou 3 (20%) lesões de origem não-neoplásica, 8 (53,3%) de neoplasias primárias cerebrais, e 4 (26,7%) de metástases cerebrais. Uma vez que o estudo de Wolf *et al.* (1995) foi retrospectivo em animais cujas lesões cerebrais evidenciaram um padrão de captação de contraste em anel, e além disso, não faz referência às raças dos cães incluídos no estudo, poderemos sugerir que a discrepância de resultados apresentada pelo nosso estudo pode ser, apenas, devida aos diferentes critérios de inclusão utilizados, como também às diferentes proporções de raças representadas.

Dos 26 casos em que obtivemos a classificação histopatológica das lesões intra-cranianas, 16 (61,5%) eram gliomas, 7 (26,9%) meningiomas, 1 (3,8%) adenoma acidófilico da hipófise, 1 (3,8%) neuroblastoma cerebral, e 1 (3,8%) metástase de tumor não identificado. A prevalência de gliomas (61,5%) no nosso estudo está de acordo com a literatura, já que os gliomas constituem a maioria dos tumores cerebrais em várias espécies animais, especialmente no cão (Uchida *et al.*, 1995; Koestner *et al.*, 1999; e Rodenas *et al.*, 2009), e em humanos (Lipsitz *et al.*, 2003). Segundo Stoica *et al.* (2004) o astrocitoma (um tipo de glioma) é o tumor do SNC mais comum nos animais; sendo o cão a espécie mais afectada dentro dos animais domésticos. No entanto os nossos resultados estão em desacordo com Kraft *et al.* (1997) e Mandrioli *et al.*, (2007) que afirmam que os meningiomas são os tumores primários cerebrais mais frequentes nos animais domésticos. Também um estudo realizado por Vernau *et al.* (2001) é contraditório pois, de entre 80 casos de citologias intra-operatórias, encontraram 44 meningiomas e 16 gliomas. Bagley *et al.* (1999) também verificou que 47% dos tumores supra-tentoriais eram meningiomas. De acordo com a bibliografia constatámos que existe uma discrepância no que diz respeito ao tipo de tumor cerebral mais frequente no cão, o que sugere que estas diferenças terão provavelmente a ver com a variabilidade das amostras entre estudos, e com a popularidade das várias raças de cães nos diferentes países.

O facto de só termos obtido um único caso de neuroblastoma parece estar em concordância com Koestner *et al.* (1999), Koestner & Higgins (2002) e Kuwamura *et al.* (2004), que

afirmam que as neoplasias neuronais, dentro das quais estão incluídas os neuroblastomas, são extremamente raras.

De entre os 16 gliomas obtivemos os seguintes resultados: 50% de oligodendrogliomas, 43,8% de astrocitomas, e 6,3% oligo-astrocitoma. Kraft *et al.* (1997); Bagley *et al.* (1999), e Snyder *et al.* (2006) em estudos semelhantes ao nosso obtiveram prevalência de astrocitomas sobre oligodendrogliomas, enquanto Rodenas *et al.* (2009) encontraram o inverso. Estas incongruências serão, no nosso entender, devidas à variabilidade das amostras entre estudos. No nosso caso, foram encontrados 2 (7,7%) casos de astrocitomas de elevado grau (equivalentes a GBM na classificação usada em Humanos) entre os 26 tumores diagnosticados. Rodenas *et al.* (2009) num estudo de 40 tumores intracranianos não encontrou nenhum caso de GBM. Snyder *et al.* (2006) num estudo de 173 tumores primários intracranianos encontrou 5 casos (2,9%) de GBM. Este resultado é concordante com Lipsitz *et al.* (2003) que afirma que o GBM representa apenas 5% dos astrocitomas e que estes representam apenas 10% dos tumores do SNC. O nosso resultado juntamente com a bibliografia consultada parece indicar que existe uma baixa incidência de GBM no cão, ao contrário do que acontece nos humanos, onde é considerado como o tumor cerebral primário mais comum nos adultos (Bigner, McLendon, Al-dosari, & Rasheed, 2002 e King *et al.*, 2005).

4.3. MUTAÇÕES DO GENE p53

No caso do nosso estudo não foram encontradas mutações em nenhum dos 19 tumores cerebrais estudados e nas regiões amplificadas (exão 5 a exão 10) de p53. No único artigo de medicina veterinária (e que seja do nosso conhecimento) que estudou as mutações de p53 em tumores cerebrais de cão, nomeadamente astrocitomas; dos 12 casos estudados, Stoica *et al.* (2004), apenas encontrou um caso de uma mutação com substituição de um aminoácido (mutação “missense”) num GBM. Dickinson (2009) afirma que mutações de p53 não são comuns (<10%) nos astrocitomas do cão, acrescentando que este gene poderá estar alterado por outro mecanismo que não as mutações. Estes resultados são muito semelhantes ao por nós obtido. Embora seja precipitado tirar qualquer conclusão definitiva desta única comparação, não será de descartar a hipótese de, efectivamente, no cão as mutações de p53 nos tumores cerebrais não ocorrerem com uma frequência semelhante àquela verificada no Homem. A ausência de detecção de mutações de p53 no nosso caso poderá ser explicada pelo facto de não ter sido estudada toda a extensão da sequência codificante (exão 2 a exão 11). Kirpensteijn *et al.* (2008) num estudo de 59 osteossarcomas em que toda a sequência de p53 foi analisada, encontraram 27 mutações em 24 tumores,

localizadas maioritariamente nos exões 4 e 5. No entanto, nos poucos casos em que os exões 4 a 11 foram estudados em Medicina Humana, apenas se encontraram uma mão-cheia de mutações fora das regiões altamente conservadas (exão 5 a exão10) (Sarkar *et al.*, 2002).

Outra hipótese para o facto de, no nosso estudo, não termos detectado mutações de p53, pode-se prender com o facto de, efectivamente, não existirem mutações no gene p53, mas outros genes que o regulam (pRb, p16^{INK4a}, p21), ou são regulados por ele (mdm2) poderem, esses sim apresentar mutações. Zuckermann *et al.* (2009) num artigo de revisão sobre o efeito supressor tumoral de p53, e You *et al.* (2004) um artigo experimental afirmam que mutações na via pRb, nomeadamente em p16^{INK4a}, são suficientes para prevenir a senescência celular e assim abrir caminho para a progressão tumoral. Nassir *et al.* (2001) afirmam que a função de p53 como guardião do ciclo celular pode ficar comprometida quando existe sobre-expressão do oncogene mdm2. Momand *et al.* (1998) citado por Nassir *et al.* (2001) afirmam que, em humanos, a maioria dos cancros que apresentam amplificação do gene mdm2 estão associados a alelos “wild-type” do gene supressor tumoral p53, o que segundo Schiebe *et al.* (2000) e Nassir *et al.* (2001), sugere que o gene mdm2 poderá induzir a oncogénese por inactivação de p53 e assim representar um mecanismo alternativo de inactivação da função de p53. Já Setoguchi *et al.* (2001b) constataram que 8 em 9 tumores, de cães, estudados e que apresentavam hiperamplificação de centrosomas, apresentavam também mutações de p53, sobre-expressão de mdm2 ou ambos. Segundo Setoguchi *et al.* (2001b) a análise desses resultados indica que aberrações de p53 ou sobre-expressão de mdm2 poderão induzir a hiperamplificação de centrosomas e aneuploidia evidenciada pelos tumores objecto de estudo. Segundo Setoguchi *et al.* (2001b) estes resultados poderão clarificar o papel de múltiplas vias e mecanismos da tumorigénese nos cães.

Outra razão possível para o facto de não terem sido encontradas mutações no nosso caso, pode dever-se à técnica utilizada para a detecção das mesmas e que foi a sequenciação directa de produtos de PCR (de exão 5 a exão 10). Jenkins (2004) afirma que o método de detecção de mutações conhecido como “restriction site mutation”, no homem, constitui um bom método de rastreio de mutações, sobretudo quando estas ocorrem com uma baixa frequência. No entanto esta técnica só detecta mutações que coincidam com locais de restrição.

Finalmente, outra hipótese para a ausência de mutações de p53 no nosso estudo pode dever-se ao número relativamente pequeno de amostras incluídas no estudo.

No Homem, de acordo com Sarkar *et al.* (2002) a presença de mutações está correlacionada com o prognóstico em tumores da mama, estômago, colorectais e de pulmão, mas esta relação nos astrocitomas ainda é controversa. Segundo Pollack *et al.*

(1997) a presença de mutações em gliomas malignos de crianças está associado a um mau prognóstico.

4.4. EXPRESSÃO DO GENE EGFR

No nosso estudo foram analisados 5 meningiomas e 11 gliomas (5 astrocitomas e 6 oligodendrogliomas), tendo os resultados sido apresentados sob a forma da média de N-fold. Os meningiomas apresentaram uma expressão relativa de mRNA de EGFR de 9,27-fold, enquanto os gliomas uma expressão de transcriptos relativa de 7,87-fold, comparada com a expressão em tecido cerebral normal. Este resultado é consistente com aquele obtido por Dickinson *et al.* (2006) que demonstrou que a expressão de mRNA de EGFR (avaliada pelo mesmo método usado no presente estudo) estava consistentemente aumentada em todos os tipos de tumores cerebrais (17 meningiomas e 39 gliomas). Estes 2 estudos parecem sugerir que os meningiomas e gliomas cerebrais do cão tendem a apresentar um aumento da expressão de mRNA de EGFR como acontece no Homem. No nosso trabalho também constatámos que, dentro dos gliomas, os astrocitomas apresentaram uma expressão relativa de mRNA de 10,46-fold, enquanto os oligodendrogliomas uma expressão relativa de 5,72-fold, quando comparada com a expressão no tecido cerebral normal. Estes resultados são ligeiramente diferentes daqueles de Dickinson *et al.* (2006) que verificou que a expressão de mARN de EGFR (avaliada por PCR em tempo-real) era maior naqueles gliomas de elevado grau (GBM e oligodendrogliomas), e menor nos meningiomas de grau I. O autor verificou, igualmente, que a expressão nos oligodendrogliomas era significativamente maior do que nos meningiomas de grau I. Uma das explicações possíveis para esta diferença pode dever-se ao facto de na nossa amostra termos uma percentagem inferior (7,7%) de GBM do que Dickinson (12,1%). Temos também de lembrar que o sistema de classificação histopatológica por nós adoptado não contempla a atribuição de graus de malignidade, podendo aqui residir uma possível explicação para as diferenças encontradas em relação ao estudo de Dickinson *et al.* (2006).

Os resultados por nós obtidos são, como se disse anteriormente, semelhantes àqueles que estão documentados no Homem. Andersson *et al.* (2004) encontrou maior expressão de mARN de EGFR em gliomas de grau elevado e na maioria dos meningiomas. Segundo Collins (2004) a amplificação do gene EGFR é encontrada em cerca de 35% dos glioblastomas, estando geralmente sobre-expresso. A sobre-expressão de EGFR está presente em mais de 60% dos glioblastomas primários, mas raramente (em menos de 10%) nos glioblastomas secundários (Ohgaki & Kleihues, 2007 e Puputti *et al.*, 2006).

4.5. HISTOPATOLOGIA

A classificação histopatológica foi realizada segundo os critérios recomendados pela OMS para a classificação dos tumores do sistema nervoso nos Animais Domésticos, tendo sido utilizada a seguinte referência: Koestner *et al.* (1999). Este esquema de classificação, ao contrário daquele em vigor para os tumores cerebrais em Medicina Humana, é baseado nas características celulares e subtipos, sem atribuir graus de malignidade exceptuando a designação de anaplásico (Sturges *et al.* 2008).

Ainda que no nosso caso o número de tumores de cada tipo celular tenha sido pequeno tendo, por si só, limitando o tipo de análise estatística, este esquema de classificação dos tumores cerebrais nos animais domésticos pode, em caso de amostras numerosas, dificultar uma análise de marcadores de proliferação celular, ou outros marcadores celulares, quanto ao seu valor como factor de prognóstico, já que para isso é necessário agrupar os tumores por graus definidos de malignidade.

4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

4.6.1. Imunohistoquímica de Ki-67

Os índices de proliferação médios foram os seguintes: 27,57% nos meningiomas, 23,26% nos gliomas, 4,86% no neuroblastoma cerebral e 0% no adenoma da hipófise. Dentro dos gliomas obtivemos 30,80% nos oligodendrogliomas e 15,73% nos astrocitomas.

Como, de acordo com o nosso conhecimento, só existe uma referência ao IP por marcação imunohistoquímica de Ki-67 em tumores cerebrais do cão, só podemos fazer uma única comparação directa. No nosso estudo o IP médio em astrocitomas foi de 15,73% (variando entre 1,15% e 45,65%) enquanto que Lipsitz *et al.* (2003) obtiveram um IP médio em GBM de 16,2% (variando entre 6% e 26%). Embora estes valores sejam muito semelhantes, na ausência de valores de IP médios para oligodendrogliomas, meningiomas e gliomas, não podemos ainda sugerir valores médios de IP característicos e diagnósticos para cada tipo celular.

Em oligodendrogliomas de 2 gatos Dickinson *et al.* (2000) obteve 4% e 15% (média 9,5%) de IP de Ki-67 (MIB-1). Comparando com o IP médio por nós obtido em oligodendrogliomas de cão e que foi de 30,80%, verificamos que o nosso valor é muito superior àquele de Dickinson *et al.* (2000). Esta comparação apresenta as limitações de ser feita entre espécies diferentes, e carece de mais estudos até se poder estabelecer ou sugerir um padrão consistente da imunomarcação de Ki-67 em oligodendrogliomas de cão.

Se no tecido cerebral de cão as referências à imunomarcagem de Ki-67 são raríssimas, já noutros tecidos de origem canina existem numerosos estudos. Peña *et al.* (1998) afirma que a imunomarcagem de Ki-67 em tumores mamários benignos e malignos de cão são similares àquelas documentadas em tumores da mama em Humanos. Os mesmos autores concluíram ainda que a imunomarcagem de Ki-67 era um parâmetro de prognóstico objectivo no que diz respeito ao comportamento pós-cirúrgico dos carcinomas mamários, incluindo a probabilidade de metastização. Costa *et al.* (2007) obteve boa correlação entre a imunomarcagem em mastocitomas de cão e o grau histológico, índice mitótico, presença de necrose e ulceração. Labelle *et al.* (2004) em neoplasias adrenocorticais verificaram que o índice de proliferação em carcinomas era significativamente mais elevado do que em adenomas, sendo útil como indicador de malignidade. Sanchez *et al.* (2007) afirmam que o marcador de proliferação celular Ki-67 poderá ser usado como ferramenta para prever o comportamento biológico de melanomas orais no cão. Num outro estudo de Al-Dissi, Haines, Singh & Kidney (2007) que envolveu a imunomarcagem de carcinomas de células escamosas e tricoepiteliomas caninos, os autores testemunharam uma correlação entre o IP celular (Ki-67) e a expressão de VEGF e VEGF-2, duas moléculas envolvidas na angiogénese (fenómeno crucial para o crescimento e metastização dos tumores). De acordo com a bibliografia consultada parece consensual a ideia de que o IP de Ki-67 é um bom indicador da malignidade e prognóstico da maioria dos tumores no cão; no entanto, existem exemplos contraditórios como o de Rijn *et al.* (2010) que, num estudo de 17 tumores corticotrópicos da hipófise não consideraram os marcadores de proliferação celular Ki-67 e PCNA como sendo úteis para o estudo da patobiologia deste tipo de tumores. Também da mesma opinião é Lohr, Teifke, Failing & Weiss (1997) que num estudo de tumores mamários no cão concluíram que a imunomarcagem de Ki-67 não apresentava vantagem sobre a história clínica, aspecto macroscópico e histopatologia como factor de prognóstico.

Em Medicina Humana, Collins (2004) advoga que apesar do marcador de proliferação celular Ki-67, entre outros, ser considerado como bom indicador de prognóstico em vários tipos de tumores, o mesmo ainda não foi reconhecido como tal no caso dos tumores cerebrais. Segundo Mandrioli *et al.* (2007) vários autores já tentaram estabelecer uma associação entre o IP de Ki-67 e as recidivas de meningiomas, em humanos; no entanto, a relevância prognóstica destes parâmetros ainda permanece controversa. Esta opinião é reforçada por Rodriguez, Scheithauer, Giannini, Bryant & Jenkins (2008) num estudo com vários marcadores epiteliais, e regulação do ciclo celular em glioblastomas e gliossarcomas humanos, e onde não encontraram uma associação significativa entre o IP celular por imunomarcagem de Ki-67 (MIB-1) e a sobrevivência sem recidiva, a idade do paciente, a dimensão do tumor, a sua localização e a actividade mitótica. Collins (2004) acrescenta ainda que, numa mesma amostra de tumor cerebral existem áreas individuais com uma

grande variação de IPs, o que dificulta a definição de IPs relevantes. Lebelt *et al.* (2008) num estudo IP de Ki-67, mas em células de endotélio vascular, de gliomas humanos encontrou uma correlação positiva entre o IP e a dimensão do tumor no caso dos astrocitomas (não anaplásicos) e glioblastomas, sugerindo que o IP em células do endotélio vascular poderá ser um bom indicador da angiogénese nestes dois tipos de gliomas. Na verdade, a indefinição do valor diagnóstico e prognóstico deste marcador celular nos astrocitomas humanos é tão grande que Johannessen & Torp (2006), convenientemente, analisaram e compararam 16 artigos publicados e verificaram que todos os artigos relatavam um aumento da imunomarcção de Ki-67 em função do grau de malignidade; no entanto, a maioria dos artigos acrescentava que o IP de Ki-67 distinguia entre astrocitomas difusos (grau II) e astrocitomas anaplásicos (grau III), e entre astrocitomas difusos (grau II) e GBM (grau IV), sem conseguir distinguir entre aqueles de grau III e IV. Outra conclusão desta comparação realizada por Johannessen & Torp (2006) foi a de que existia uma grande variação nos valores de IP considerados como diferenciadores entre os vários graus de astrocitomas. Já no que respeita ao valor prognóstico deste marcador celular, a maioria dos artigos mostravam que o IP era um indicador significativo de sobrevivência e recidivas, apresentando, no entanto, valores de referência tão díspares como 1,5% e 15,3%. Assim, Johannessen & Torp (2006) concluíram que o IP celular de Ki-67 não poderá ser usado por si só como factor de diagnóstico ou prognóstico no caso dos astrocitomas humanos, sendo necessário ter em consideração dados clínicos, radiográficos e histopatológicos.

Embora no nosso estudo não tenhamos classificado histologicamente as amostras por graus de malignidade, estatisticamente, as diferenças dos IP celular de Ki-67 entre gliomas e meningiomas e entre astrocitomas e oligodendrogliomas mostraram não ser significativas com valores de $p=0,461$ e $p=0,093$, respectivamente, o que traduz que este marcador de proliferação celular não distingue entre estes tipos histológicos. Este facto é, aliás, concordante com a literatura humana onde existe uma muito maior profusão de estudos em tumores cerebrais e como foi discutido nos parágrafos anteriores.

No que concerne ao valor prognóstico, se, em virtude da única comparação possível em tecido cerebral de cão, considerarmos que a imunomarcção de ki-67 segue a mesma tendência daquela verificada nos tumores de outros tecidos de cão e de tecidos não cerebral humano, então, poderemos inferir que possivelmente a imunomarcção de Ki-67 em tumores cerebrais do cão será tanto maior consoante a malignidade do tumor, e que poderá constituir um bom parâmetro de prognóstico. Se pelo contrário admitirmos que o IP de Ki-67 nos tumores cerebrais do cão segue a tendência verificada no mesmo tecido do Homem, então, aquele poderá não ser considerado um bom parâmetro de prognóstico. Serão necessários mais trabalhos de imunohistoquímica de Ki-67 em tumores cerebrais de cão

para se poder estabelecer um padrão consistente e eventualmente um valor de diagnóstico e prognóstico deste marcador da proliferação celular.

4.6.2. Imunohistoquímica de p53

Neste trabalho, das 24 amostras que foram objecto de estudo imunohistoquímico, apenas um caso de meningioma fibroso se revelou positivo, tendo nos restantes casos se obtido um resultado não satisfatório em qualidade, caracterizado por uma forte marcação inespecífica de fundo que impossibilitou a diferenciação entre núcleos com e sem imunomarcação.

Uma hipótese para a não obtenção de imunomarcação de p53 no nosso estudo pode prender-se com a escolha do anticorpo, já que Stoica *et al.* (2004), ainda que tenha sido o único a estudar o tecido cerebral de cão, conseguiu resultados positivos (11 em 31 casos - 35%) com um anticorpo (p53-coelho policlonal, Santa Cruz Biotechnology) diferente do nosso. A escolha do anticorpo primário parece ser, de facto, um factor determinante no resultado final das imunomarcações de p53 nos tecidos de origem canina. Lee *et al.* (2004), experimentaram dois anticorpos primário de p53 - Pab240 e Pab421- tendo obtido 25% de resultados positivos com o 1º e 0% com o 2º. Albaric *et al.* (2001) testaram 4 anticorpos primários anti-humanos diferentes (2 monoclonais – DO-7 e Pab240; e 2 policlonais Ab-7 e CM-1) em várias espécies animais domésticas, incluindo o cão, e concluíram que o anticorpo Ab-7 não produzia resultados positivos de todo; o anticorpo DO-7 não reagia no cão e no gato; e que a detecção da proteína p53 era possível em todas as espécies animais testadas com os anticorpos CM-1 e Pab240. Também Keller *et al.* (2007) testaram 5 anticorpos primários anti-humanos diferentes em tecido da espécie canina (2 policlonais – CM-1 de dois laboratórios distinto; e 5 monoclonais – DO-7, DO-12, DO-13, Pab122 e Pab240), tendo constatado que os anticorpos DO-12 e DO-13 só produziam marcação citoplasmática inespecífica; enquanto os anticorpos CM-1, Pab122 e Pab240 marcavam 2 dos 3 osteossarcomas. Esta variação de resultados positivos em função do anticorpo primário utilizado parece sugerir, segundo Lee *et al.* (2004) e Keller *et al.* (2007), que haverá diferenças locais na natureza e organização dos aminoácidos da superfície da molécula de p53 canina comparada com aquela do humano.

Outra hipótese colocada por nós para os resultados negativos da imunomarcação de p53 em tumores cerebrais poderá ser devida a uma inespecificidade do anticorpo primário utilizado (p53-CM1), já que estes são para utilização em tecidos da espécie Humana. No entanto, diversos autores utilizaram o mesmo anticorpo que nós, tendo obtido resultados positivos em diversos tecidos, mas nunca no tecido cerebral. Assim, Morris *et al.* (2009) e Rungsipat *et al.* (1999) obtiveram imunomarcações em tumores mamários de cão. Também Wolf *et al.* (1997) num estudo de 80 tumores colorectais (benignos e malignos)

obteve 44% de imunomarcção. Sargartz *et al.* (1996), num estudo de 106 tumores ósseos (96 osteossarcomas e 10 tumores ósseos multilobulares) obtiveram 72% de imunomarcção considerada positiva, utilizando o mesmo anticorpo que nós. Murakami *et al.* (2000), obtiveram imunomarcções positivas de p53 em tumores mamários, carcinomas de células escamosas e tumores de células basais em cão e gato. Loukolpoulos *et al.* (2003) obtiveram 64,8% de marcações positivas de p53 em osteossarcomas. Verifica-se, assim, que dentro da bibliografia consultada, de todos aqueles estudos em que foi utilizado o anticorpo primário igual ao nosso, nenhum o utilizou em tecido cerebral de cão. Assim, a não obtenção de imunomarcção do nosso estudo poderá ter a ver com particularidades intrínsecas do tecido cerebral e da expressão da proteína p53 neste tecido; ou, eventualmente, ainda a uma técnica de imunohistoquímica que ainda precisará de melhor optimização. Ainda acerca da especificidade e reacções cruzadas dos anticorpos desenhados para uso em tecidos humanos e sua utilização em tecidos de outras espécies, pode-se acrescentar que Veldhoen & Milner (1998) testaram por imunoprecipitação 8 anticorpos diferentes anti-p53, não tendo sido a maioria daqueles anti-humano e anti-rato reconhecidos pelos tecidos da espécie canina.

Outras explicações possíveis (e que merecem alguma consideração), uma vez que as nossas imunomarcções foram apenas positivas num único caso, e mesmo este caracterizava-se por apresentar uma marcação de fundo muito considerável, são dadas por Rungsipat *et al.* (1999) e Loukopoulos *et al.* (2003) que afirmam que uma falta de sensibilidade pode ser responsável por uma marcação de fundo muito marcada sendo aquela atribuível a: i) diferentes fixações entre as amostras; ii) tempo de mediou entre a excisão do tecido e a sua fixação; iii) tempo de fixação; ou iv) ao sistema de detecção de imunohistoquímica utilizado. Destas hipóteses a que se pode aplicar ao nosso caso é o tempo que mediou entre a morte do animal e a colheita da amostra (e apenas em poucos casos).

Além das hipóteses anteriormente sugeridas, existe uma outra que, na minha opinião será a que faz mais sentido e, prende-se com o facto de no nosso estudo não terem sido encontradas mutações nas 19 amostras estudadas. Ora, apesar do anticorpo por nós utilizado detectar as proteínas p53 “wild-type” e “mutante”, a proteína “wild-type” tem uma semi-vida tão reduzida (15-30 minutos) (Sarkar *et al.*, 2002) que a sua acumulação nos tecidos é reduzida tornando difícil a sua detecção por imunohistoquímica (Sarkar *et al.*, 2002 e Ziyaie *et al.* 2000). Este facto aliado à ausência de mutações de p53 (responsáveis pelo aumento da semi-vida da proteína p53 nos tecidos) nas nossas amostras, reforça a hipótese da ausência de imunomarcção no nosso estudo se dever à ausência de mutações nas nossas amostras e consequente baixa acumulação da proteína p53. Esta justificação não é inédita e segundo Wolf *et al.* (1997) ainda que controversa, é defendida, por alguns autores,

incluindo Sargartz *et al.* (1996). Liang *et al.*, (1999) e Sun *et al.* (1993), citados por Loukopoulos *et al.* (2003) afirmam que a detecção de p53 por imunohistoquímica indica alterações no gene p53 e seu produto proteico, demonstrando uma progressão no sentido de um fenótipo tumoral. Segundo Zchetti, Garderen & Rutteman (2007) num estudo da avaliação da expressão de p53 por imunohistoquímica em tumores malignos de cão com e sem mutações de p53, concluíram que, de entre os vários anticorpos testados, o anticorpo policlonal CM-1 seria a melhor escolha para a identificação de mutações de p53, o que reforça a nossa hipótese de que a ausência de imunomarcagem de p53 nas amostras de tecido cerebral por nós estudadas poderá ser devida à ausência de mutações.

Outras referências consultadas reforçam esta nossa última hipótese pois, na verdade, muitos casos de imunoreactividade de p53 não são resultantes da acumulação da proteína “mutante” mas sim a uma acumulação/sobreexpressão de proteína p53 “wild-type” (Sarkar *et al.*, 2002), por ligação desta a proteínas celulares (mdm2, hsc70) ou virais ou simplesmente por acumulação da proteína p53 “wild-type” em células tumorais em divisão rápida independentemente da existência de mutação de p53 (Murakami *et al.*, 2000; Sargartz *et al.*, 1996; Sarkar *et al.*, 2002 e Wolf *et al.*, 1997).

A propósito da imunomarcagem de p53 como factor de prognóstico, no Homem Faria, Patrocínio, Filho & Rabenhorst (2007) obtiveram 54,98% de imunomarcagens positivas de p53 em tumores astrocíticos, tendo verificado que esta era tanto maior à medida de aumentava a malignidade do tumor, confirmando que este é um potencial indicador de malignidade nos astrocitomas. Pollack *et al.* (1997) observaram que a imunomarcagem de p53 em gliomas malignos em crianças estava associada significativamente com sobrevivência sem recidiva e sobrevivência total. Rodriguez *et al.* (2008) num estudo com vários marcadores epiteliais, de proliferação celular e regulação do ciclo celular em glioblastomas e gliossarcomas humanos, não encontraram uma associação significativa entre a imunomarcagem de p53 e a sobrevivência sem recidiva, a idade do paciente, a dimensão do tumor, a sua localização e a actividade mitótica. No nosso caso, na ausência de detecção de mutações nos tumores cerebrais do cão, e considerando que esta é real, estas não poderão ser utilizadas como factor de prognóstico, o que é como vimos ainda controverso em Humanos.

4.6.3 Imunohistoquímica de EGFR

Das 24 amostras em que foram realizadas a imunohistoquímica de EGFR, obtivemos imunomarcagens positivas em 4/6 (66,7%) meningiomas, 8/16 (50%) gliomas e, 1/1 (100%) adenoma da hipófise (pars distalis). Dentro dos gliomas obtivemos imunomarcagens positivas em 4/8 (50%) oligodendrogliomas e 4/8 (50%) astrocitomas.

Stoica *et al.* (2004) num estudo de 31 astrocitomas de cães verificou que 7 (23%) tumores apresentavam sobre-expressão (marcação da membrana citoplasmática) de EGFR que coincidia com as formas mais malignas de astrocitomas; e em 3 casos verificou que existiam simultaneamente sobre-expressão de p53 e de EGFR. Lipsitz *et al.* (2003) obtiveram imunomarcação positiva de EGFR em 3 (60%) do 5 GBM estudados, e Higgins *et al.* (2010) obteve 57% de imunomarcação em GBM, 40% em astrocitomas de grau III e 28% em astrocitomas de grau II. Estas são as únicas referências bibliográficas (do nosso conhecimento) de imunomarcação de EGFR em tecido cerebral, proveniente de tumores espontâneos, de cão. No nosso estudo encontramos uma percentagem de 50% de imunomarcação positiva de EGFR em astrocitomas que é superior à de Stoica *et al.* (2004) e de Higgins *et al.* (2010), e inferior à de Lipsitz *et al.* (2003). Estas diferenças podem ter a ver com o tipo de anticorpo usado (diferentes do nosso) ou com o sistema de graduação da imunomarcação (a que os artigos de Lipsitz *et al.* (2003) e de Stoica *et al.* (2004) não fazem qualquer referência). No entanto, apesar das diferenças entre o nosso trabalho e estes 3 autores, todos eles são coincidentes no sentido dos tumores cerebrais do cão apresentarem tendencialmente uma sobre-expressão de EGFR quando detectada por imunohistoquímica. No nosso estudo, apesar de não termos classificado histologicamente as amostras por graus de malignidade, estatisticamente, as diferenças das imunomarcações de EGFR entre gliomas e meningiomas e entre astrocitomas e oligodendrogliomas mostraram não ser significativas com valores de $p=0,480$ e $p=0,609$, respectivamente, sugerindo que este marcador não distinga entre meningiomas e gliomas nem entre astrocitomas e oligodendrogliomas. É possível que este marcador consiga distinguir entre graus de malignidade mas, como já foi explicado, no nosso estudo isso não foi possível avaliar. Infelizmente, o estudo da sobre-expressão de EGFR, por imunohistoquímica, noutra tipo de tumores do cão também é reduzido. Gama *et al.* (2009) verificou que a imunomarcação de EGFR em tecido mamário de cão era tanto maior quanto maior a malignidade. Liang *et al.* (2008) em astrocitomas pediátricos encontrou 58% de imunomarcação positiva. Em humanos, Stark *et al.* (2003) verificaram, num estudo, que 24 entre 27 GBM coravam positivamente para imunohistoquímica de EGFR. Umesh *et al.* (2009) obtiveram 35,2% de imunomarcação positiva em GBM. Smith, Lal, Harmon-Smith, Bollen & McDermott (2007) obtiveram imunomarcação positiva em 46% dos meningiomas. Shien *et al.* (2005) encontraram 70% de imunomarcações positivas em carcinomas mamários ductais de elevado grau com diferenciação mioepitelial. Fazer comparações dos nossos resultados com os obtidos em tecido não cerebral de cão ou com a literatura humana é difícil, mas todos eles relatam imunomarcações de EGFR positivas em variadas percentagens, sugerindo que este gene está na génese de diversos tipos de tumores.

No que respeita à imunomarcação de EGFR como factor de prognóstico, em Medicina Humana, Stark *et al.* (2003) verificaram, num estudo, que 24 entre 27 (88,9%) GBM coravam positivamente para imunohistoquímica de EGFR. Rodriguez *et al.* (2008) num estudo com vários marcadores epiteliais, de proliferação celular e regulação do ciclo celular em glioblastomas e gliossarcomas humanos, não encontraram uma associação significativa entre a imunomarcação de EGFR e a sobrevivência sem recidiva, a idade do paciente, a dimensão do tumor, a sua localização e a actividade mitótica.

Com tão poucos dados disponíveis no cão é prematuro especular sobre o valor de prognóstico deste marcador celular, sendo necessários mais trabalhos quer em tecido cerebral como noutros tipos de tecidos de origem canina.

Para finalizar, o resultado por nós obtido na imunomarcação de EGFR (50% de gliomas positivos, e 66,7% de meningiomas positivos) parece sugerir que efectivamente este gene estará envolvido no desenvolvimento dos tumores cerebrais no cão. Se analisarmos os resultados da IHC de EGFR com aqueles da quantificação relativa da expressão de mRNA de EGFR por PCR em tempo-real, então verificamos que das 16 amostras processadas por PCR em tempo real, 8 apresentavam imunomarcação positiva de EGFR, e que destas, 7 apresentavam a uma expressão relativa de EGFR superior a 5-fold (a restante apresentava N-fold=1,93). Se considerarmos os resultados de EGFR (PCR em tempo-real e imunohistoquímica) em conjunto com os de p53 (mutações e imunohistoquímica), e admitindo que, a ausência de mutações de p53 e de imunomarcação de p53 por nós encontrada, é efectivamente real, estes dados sugerem que as vias de p53 e EGFR provavelmente constituem duas vias independentes da tumorigénese nos tumores cerebrais do cão; e sobretudo que a via de p53 estará comprometida não ao nível do próprio p53, mas ao nível de qualquer um dos vários genes que p53 controla e/ou que controlam p53. Assim, serão necessários mais estudos de outros genes, e sobretudo aqueles envolvidos na via de p53, para esclarecer com precisão a citogenética dos tumores cerebrais em cães.

4.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo imagiológico por nós realizado veio de modo muito assertivo confirmar o descrito na literatura veterinária, embora ainda haja a necessidade de continuar o estudo sobretudo naqueles tipos de tumores do SNC que são raros e de que ainda existe uma pequena casuística em Medicina Veterinária, no sentido de tentar estabelecer as suas características imagiológicas.

O estudo molecular (detecções de mutações do gene p53 e expressão do gene EGFR) dos tumores cerebrais no cão ainda é uma novidade e os dados por nós obtidos e sobretudo por

Stoica *et al.* (2004) e Dickinson (2009) nos EUA apontam para que as mutações do gene p53 nos tumores cerebrais do cão sejam mais raras do que aquilo que acontece nos humanos, o que sugere que terá de ser continuado o estudo das mutações de p53 em amostras mais numerosas para consolidar os resultados até agora obtidos e avançar para o estudo eventual de outros genes implicados na via de p53, como seja os casos dos genes mdm2, pRb, p21. O estudo da expressão de mRNA do gene EGFR, ainda que muito no seu início nos tumores cerebrais no cão, demonstrou que os tumores cerebrais apresentam uma expressão relativa de EGFR significativa, o que acompanha o que acontece nos humanos. No entanto, em medicina veterinária são necessários mais estudos para consolidar estes resultados já que o número de trabalhos das vias moleculares dos tumores cerebrais do cão é muito pequeno.

No nosso trabalho foi evidente a predisposição da raça Boxer para desenvolver gliomas (75% dos gliomas no nosso estudo ocorreram nesta raça). Este resultado sugere que esta raça apresente algum defeito genético nas suas células da glia, além da sobre-expressão de EGFR já demonstrada, que o torne ao longo da sua vida, e por acumulação com possíveis mutações em genes ainda não identificados, predisposto ao desenvolvimento de gliomas. Seria interessante realizar um rastreio por meio de “microarrays” para identificar as tendências de múltiplos genes no sentido de melhor orientar o estudo das vias moleculares conducentes ao desenvolvimento deste tipo de tumores nesta raça em concreto, e no cão em geral.

No que respeita à IHC de Ki-67, p53 e EGFR em tumores cerebrais de cão ainda há muito trabalho a realizar para tentar encontrar marcadores de proliferação ou outros marcadores celulares que sejam verdadeiramente úteis por si só como factores de diagnóstico e prognóstico. Talvez uma solução passe por desenvolver anticorpos específicos para os tecidos caninos. Outro aspecto que eu penso que será fundamental para se poder comparar literatura veterinária, no que respeita aos estudos histopatológico e de imunohistoquímica, prende-se com o facto de ter de existir uma uniformização dos critérios de classificação dos tumores cerebrais já que as classificações veterinárias e humanas são, como vimos na discussão deste trabalho, diferentes, e a literatura veterinária não é de todo consistente na utilização exclusiva da classificação veterinária. Esta problemática é crucial quando se pretende estudar os marcadores celulares como factores de prognóstico.

Infelizmente, em Medicina Veterinária os fundos para investigação estão profundamente ligados ao interesse dos temas para a Medicina Humana e o trabalho da equipa de que Dickinson faz parte é um exemplo disso (Dickinson *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2009; e Higgins *et al.* 2010). O pouco que se conhece sobre terapia génica em tumores cerebrais de cão tem como base servir a investigação da Medicina Humana o que é perfeitamente legítimo, e sem a qual provavelmente não haveria a maior parte dos estudos até agora

realizados. Mas após consultar a bibliografia para este trabalho, encontrei um trabalho de Candolfi *et al.* (2007) e que fez a comparação entre glioblastoma humano, canino e de rato, por avaliação das características histológicas e de alguns marcadores celulares, chegando à conclusão de que o modelo canino de glioblastoma era aquele que mais se assemelhava ao humano, partilhando mesmo muitas características comuns. É, no entanto, na minha opinião, prematuro e ainda sob o ponto de vista ético muito controverso, generalizar o modelo canino vivo pois existem vias moleculares importantes na tumorigénese que ainda não foram definidas nesta espécie, podendo muito bem, quando devidamente conhecidas e validadas por um número considerável de publicações, não ser semelhantes àquelas dos tumores cerebrais na espécie humana.

Em sùmula, embora na última década tenha havido grande progresso no conhecimento das vias moleculares da tumorigénese no cão e outros animais domésticos, existe a sensação que ainda muito falta conhecer. Talvez um dia toda esta informação molecular poderá servir de base ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que, não só destruam as células tumorais cerebrais ou outras, como deixem o resto dos tecidos normais dos nossos pacientes intactos.

BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

- Albaric, O., Bret, L., Amardeihl, M. & Delverdier, M. (2001). Immunohistochemical expression of p53 in animal tumors: a methodological study using four anti-human p53 antibodies. *Histology and Histopathology*.16, 113-121.
- Al-Dissi, A.N., Haines, D.M., Singh, B. & Kidney, B.A. (2007). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Veterinary Pathology*. 44, 823-830.
- Andersson, U., Guo, D., Malmer, B., Bergenheim, A.T., Brannstrom, T., Hedman, H. & Henriksson, R. (2004). Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathologica*. 108, 135-142.
- Antuofermo, E., Miller, M.A., Pirino, S., Xie, J., Badve, S. & Mohammed, S.I. (2007). Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs – a model of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 16, 2247-2256.
- Badhe, P.B., Chauhan, P.P. & Mehta N.K. (2004). Brainstem gliomas – a clinicopathological study of 45 cases with p53 immunohistochemistry. *Indian Journal of Cancer*. 41, 170-174.
- Bagley, R.S., Gavin, P.R., Moore, M.P., Silver, G.M., Harrington, M.L. & Connors, R.L. (1999). Clinical signs associated with brain tumors in dogs: 97 cases (1992-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 215, 818-819.
- Bagley, R.S. (Ed.) (2005a). *Fundamentals of Veterinary Clinical Neurology*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Bagley, R.S. (2005b). Multifocal Neurological Diseases. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th ed.). (pp. 836-842). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Bagley, R.S. & West, C.R. (2010). Injury to the Brain. In M.J. Bojrab & E. Monnet (Eds.), *Mechanisms of Diseases in Small Animal Surgery*. (3rd ed.). (pp.206-211). Jackson: Teton New Media.
- Barnhart, K.F., Wojcieszyn, J. & Storts, R.W. (2002). Immunohistochemical staining patterns of canine meningiomas and correlation with published immunophenotypes. *Veterinary Pathology*. 39, 311-321.
- Berens, M.E., Bjotvedt, G., Levesque, D.C., Rief, M.D., Shapiro, J.R. & Coons, S.W. (1993). Tumorigenic, invasive, karyotypic, and immunohistochemical characteristics oh clonal cell lines derived from a spontaneous canine anaplastic astrocytoma. *In Vitro Cell & Developmental Biology – Animal*. 29A, 310-318.
- Berry, C.R. (1998). Anatomic and physiologic imaging of the canine and feline brain. In D.E. Thrall (Ed.), *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. (3rd ed.). (pp. 66-79). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Bigner, S.H., McLendon, R.E., Al-dosari, N. & Rasheed, A. (2002). Brain Tumors. In B. Vogelstein & K.W. Kinzler (Eds.), *The Genetic Basis of Human Cancer*. (2nd ed.). (pp.719-729). New York: Mc Graw Hill.

- Blehm, K.N., Spiess, P.E., Bondaruk, J.E., Dujka, M.E., Villares, G.J., Zhao, Y.-J., Bogler, O., Aldape, K.D., Grossman, H.B., Adam, L., McConkey, D.J., Czemiak, B.A., Dinney, C.P. & Bar-Eli, M. (2006). Mutations within the kinase domain and truncations of the epidermal growth factor receptor are rare events in bladder cancer: implications for therapy. *Clinical Cancer Research*. 12, 4671-4677.
- Borras, D., Ferrer, I. & Pumarola, M. (1999). Age-related changes in the brain of the dog. *Veterinary Pathology*. 36, 202-211.
- Braund, K.G (Ed.). (1986). *Clinical Syndromes in Veterinary Neurology*. (1st ed.). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Braund, K.G. (2003). Neurovascular Disorders. In C.H. Vite (Ed.), *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. Acedido em Jul.27, 2010, disponível em: http://www.ivis.org/advances/Vite/braund25/chapter_frm.asp?LA=1
- Candolfi, M., Curtin, J.F., Nichols, W.S., Muhammad, A.K.M.G., King, G.D., Pluhar, E., McNiel, A., Ohlfest, J.R., Freese, A.B., Moore, P.F., Lerner, J., Lowenstein, P.R. & Castro, M.G. (2007). Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathology characterization and tumor progression. *Journal of Neurooncology*. 85, 133-148.
- Cheng, Y., Pang, J. C.-S., Ng, H.-K., Ding, M., Zhang, S.-F., Zheng, J., Liu, D.-G. & Poon, W.-S. (2000). Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas. *Histopathology*. 37, 437-444.
- Cherubini, G.B., Mantis, P., Martinez, T.A., Lamb, C.R. & Cappello, R. (2005). Utility of magnetic resonance imaging for distinguishing neoplastic from non-neoplastic brain lesion in dogs and cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 46, 384-387.
- Chu, L.L., Rutteman, G.R., Kong, J.M.C., Ghahremani, M., Schmeing, M., Misdorp, W., van Garderen, E. & Pelletier, J. (1998). Gemonic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Research and Treatment*. 50, 11-25.
- Collins, V.P. (2002). Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Letters*. 188, 1-7.
- Collins V.P. (2004). Brain tumours: classification and genes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 75 (Suppl), ii2-ii11.
- Costa, R.M.G., Matos, E., Rema, A., Lopes, C., Pires, M.A. & Gartner, F. (2007). CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research*. 3, Article 19. Acedido em Ago. 15, 2010, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/19>.
- De Haan, C.E., Kraft, S.L., Gavin, P.R., Wendling, L.R. & Griebenow, M.L. (1994). Normal variation in size of the lateral ventricles of the Labrador Retriever dog as assessed by magnetic resonance imaging. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 35, 83-86.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G. & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. 37, 112-119.

- Dickinson, P.J., Keel, M.K., Higgins, R.J., Koblik, P.D., LeCouteur, R.A., Naydan, D.K., Bollen, A.W. & Vernau, W. (2000). Clinical and pathological features of oligodendrogliomas in two cats. *Veterinary Pathology*. 37, 160-167.
- Dickinson, P.J. (2005). Localisation of intracranial lesions. In *Proceedings (Veterinary Programme) of the BSAVA 48th Annual Congress, ICC/NIA Birmingham, United Kingdom, 7-10 April 2005*, pp. 465-468.
- Dickinson, P.J., Roberts, B.N., Higgins, R.J., Leutenegger, C.M., Bollen, A.W., Kaas, P.H. & LeCouteur, R.A. (2006). Expression of receptor tyrosine kinases VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR), EGFR-1, PDGFR α , and c-Met in canine primary brain tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. 4, 132-140.
- Dickinson, P.J. (2009). Canine brain tumours: classification, molecular/genetic characterisation, diagnosis and treatment options. Veterinary Masterclass. In *Proceedings (Veterinary Programme) of the BSAVA 52nd Annual Congress, ICC/NIA Birmingham, United Kingdom, 2-5 April 2009*.
- Eberhart, C.G., Chaudhry, A., Daniel, R.W., Khaki, L., Shah, K.V. & Gravitt, P.E. (2005). Increased p53 immunopositivity in anaplastic medulloblastoma and supratentorial PNET is not caused by JC virus. *BMC Cancer*. 5, Article 19. Acedido em Ago 17, 2010, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/19>.
- Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F. & Collins, V.P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , and epidermal growth factor and their expression in human gliomas *in vivo*. *Cancer Research*. 51, 2164-2172.
- Engelhard, H.H., Stelea, A. & Cochran, E.J. (2002). Oligodendroglioma: pathology and molecular biology. *Surgical Neurology*. 58, 111-117.
- Faria, M.H.G., Patrocínio, R.M.S.V., Filho, M.O.M. & Rabenhorst, S.H.B. (2007). Immunoexpression of tumor suppressor genes p53, p21WAF1/CIP1, and p27KIP1 in human astrocytic tumors. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 65, 1114-1122.
- Fenner, W.R. (2000). Neurological Disorders. In W.R. Fenner (Ed.), *Quick Reference to Veterinary Medicine*. (3rd ed.). (pp. 533-627). Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Gamlin, R.M, Sagartz, J.E. & Couto, C.G. (1997). Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 58, 857-863.
- Gillett, N.A., Stegelmeier, B.L., Kelly, G. Haley, P.J. & Hahn, F.F. (1992). Expression of epidermal growth factor receptor in plutonium-239-induced lung neoplasms in dogs. *Veterinary Pathology*. 29, 46-52.
- Gama, A., Gartner, F., Alves, A. & Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*. 87, 432-437.
- Ginn, P.E., Fox, L.E., Brower, J.C., Gaskin, A., Kurman, I.D. & Kubilis, P.S. (2000). Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. 37, 33-39.

- Glazko, G.V., Koonin, E.V. & Rogozin, I.B. (2004). Mutation hotspots in the p53 gene in tumors of different origin: correlation with evolutionary conservation and signs of positive selection. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1679, 95-106.
- Greene, C.E. & Braund, K.G. (1989). Diseases of the brain. In S.J. Ettinger (Ed.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (3rd ed.). (pp. 578-623). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Halper, J. (2010). Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective. *Veterinary Pathology*. 47, 77-97.
- Hathcock, J.T. (1996). Low field magnetic resonance imaging characteristics of cranial vault meningiomas in 13 dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37, 257-263.
- Hayes, V.M., Dirven, C.M.F., Dam, A., Verlind, E., Molenaar, W.M., Mooij, J.J.A., Hofstra, R.M.W. & Buys, C.H.C.M. (1999). High frequency of TP53 mutations in juvenile pilocytic astrocytomas indicates role of TP53 in the development of these tumors. *Brain Pathology*. 9, 463-467.
- Haines, D.M. & West, K.H. (2005). Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 108, 151-156.
- Heimberger, A.B., Suki, D., Yang, D., Shi, W. & Aldape, K. (2005). The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastomas patients. *Journal of Translational Medicine*. 3, Article 38. Acedido em Ago 20, 2010, disponível em: <http://www.translational-medicine.com/content/3/1/38>.
- Higgins, R.J., Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Bollen, A.W., Wang, H., Wang, H., Corely, L.J., Moore, L.M., Zang, W. & Fuller, G.N. (2010). Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR α and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *Journal of Neurooncology*. 98, 49-55.
- Hogarty, M.D. & Brodeur, G.M. (2002). Gene amplification in human cancers: biological and clinical significance. In B. Vogelstein & K.W. Kinzler (Eds.), *The genetic basis of human cancer*. (2nd ed.).(pp. 115-128). New York: Mac Graw Hill
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørliie, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R. & Harris, C.C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research*. 22, 3551-3555.
- Inoue, M. & Shiramizu, K. (1999). Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 120, 169-175.
- Jaffe, M.H., Hosgood, G., Taylor, H.W., Kerwin, S.C., Hedlund, C.S., Lopez, M.K., Davidson, J.R., Miller, D.M. & Paranjpe, M. (2000). Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. 37, 40-46.
- Jenkins, G.J.S. (2004). The restriction site mutation (RMS) method: clinical applications. *Mutagenesis*. 19, 3-11.
- Johannessen, A.L. & Torp, S.H. (2006). The clinical value of Ki-67/MIB-1 labelling index in human astrocytomas. *Pathology Oncology Resarch*. 12, 143-147.

- Jones, J.C. (2004). Neuroimaging. In C.H. Vite (Ed.), *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. Acedido em Jan.16, 2009, disponível em: http://www.ivis.org/advances/Vite/jones/chapter_frm.asp?LA=1
- Jones, T.C., Hunt, R.D. & King, N.W. (Eds.) (1997). *Veterinary Pathology*. (6th ed.). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Kamiya, M. & Nakazato, Y. (2002). The expression of cell cycle regulatory proteins in oligodendroglial tumours. *Clinical Neuropathology*. 21, 52-65.
- Keller, S.M., Schade, B., Rickenbacher, A.B., Brugnera, E., Wergin, M.C., Muller, E.J., Suter, M.M. & Guscetti, F. (2007). A comprehensive test system to identify suitable antibodies against p53 for immunohistochemical analysis of canine tissues. *Journal of Comparative Pathology*. 137, 59-70.
- King, G.D., Curtin, J.F., Candolfi, M., Kroeger, K., Lowestein, P.R. & Castro, M.G. (2005). Gene therapy and targeted toxins for glioma. *Current Gene Therapy*. 5, 535-557.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (2002). Introduction. In B. Vogelstein & K.W. Kinzler (Eds.), *The genetic basis of human cancer*. (2nd ed.).(pp. 3-6). New York: Mac Graw Hill
- Kirpensteijn, J., Kik, M., Teske, E. & Rutteman, G.R. (2008). TP53 gene mutations in canine osteosarcoma. *Veterinary Surgery*. 37, 454-460.
- Kmet, L.M., Cook, L.S. & Magliocco, A.M. (2003). A review of p53 expression and mutation in Human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*. 97, 389-404.
- Koestner, A., Bilzer, T., Fatzer, R., Schulman, F.Y., Summers, B.A. & Van Winkle, T.J. (1999). WHO Histological Classification of Tumors of the Nervous System of Domestic Animals. Second Series. Volume V. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. Washington, D.C.
- Koestner, A. & Higgins, R.J. (2002). Tumors of the nervous system. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. (4th ed.). (697-738). Ames: Iowa State Press.
- Kosel, S., Scheithauer, B.W. & Graeber, M.B. (2001). Genotype-phenotype correlation in gemistocytic astrocytomas. *Neurosurgery*. 48, 187-194.
- Kraegel, S.A., Pazzi K.A. & Madewell, B.R. (1995). Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3-8. *Cancer Letters*. 92, 181-186.
- Kraft, S.L. & Gavin, P.R. (1999). Intracranial neoplasia. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 14, 112-123.
- Kraft, S.L., Gavin, P.R., DeHaan, C., Moore, M., Wendling, L.R. & Leathers, C.W. (1997). Retrospective review of 50 canine intracranial tumors evaluated by magnetic resonance imaging. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 218-225.
- Kumaraguruparan, R., Prathiba, D. & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science*. 81, 218-224.
- Kuwamura, M., Kotera, T., Yamate, J., Kotani, T., Aoki, M. & Hori, A. (2004). Cerebral ganglioneuroblastoma in a Golden Retriever dog. *Veterinary Pathology*. 41, 282-284.

- Labelle, P., Kyles, A.E., Farver, T.B. & De Cock, H.E. (2004). Indicators of malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. *Veterinary Pathology*. 41, 490-497.
- Lebelt, A., Dzieciol, J., Guzinska-Ustymowicz, K., Lemancewicz, D., Zimnoch, L. & Czykier, E. (2008). Angiogenesis in gliomas. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 46, 69-72.
- LeCouteur, R.A., Fike, J.R., Cann, C.E. & Pedroia, V.G. (1981). Computed tomography of brain tumors in the caudal fossa of the dog. *Veterinary Radiology*. 22, 244-251.
- LeCouteur (1999). Current concepts in the diagnosis and treatment of brain tumours in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*. 40, 411-416.
- LeCouteur, R.A. (2002). Diagnosis and treatment of brain tumors. Acedido em Fev. 8, 2010, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2631>
- Lee, C.-H., Kim, W.-H., Lim, J.-H., Kang, M.-S., Kim, D.-Y. & Kweon, O.-K. (2004). Mutation and overexpression of p53 as prognostic factor in canine mammary tumours. *Journal of Veterinary Science*. 5, 63-69.
- Levine, R.A. & Fleischli, M.A. (2000). Inactivation of p53 and retinoblastoma family Pathways in canine osteosarcoma cell lines. *Veterinary Pathology*. 37, 54-61.
- Liang, M.-L., Ma, J., Ho, M., Solomon, L., Bouffet, E., Rutka, J.T. & Hawkins, C. (2008). Tyrosine kinase in pediatric grade astrocytoma. *Journal of Neurooncology*. 87, 247-253.
- Lipsitz, D., Higgins, R.J., Kortz, G.D., Dickinson, P.J., Bollen, A.W., Naydan, D.K. & LeCouteur, R.A. (2003). Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Veterinary Pathology*. 40, 659-669.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25, 402-408.
- Long, S. (2006). Neoplasia of the Nervous System. In C.H. Vite (Ed.), *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. Acedido em Jan.16, 2010, disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Vite/braund26/chapter.asp?LA=1>
- Looper, J.S., Malarkey, D.E., Ruslander, D., Proulx, D. & Thrall, D.E. (2006). Epidermal growth factor expression in feline oral squamous cell carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*. 4, 33-40.
- Lohr, C.V., Teifke, J.P., Failing, K. & Weiss, E. (1997). Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary Pathology*. 34, 212-221.
- Lorenz, M.D. and Kornegay, J.N. (2004). Sistemic or multifocal signs. In M.D. Lorenz & J.N. Kornegay (Eds.), *Handbook of Veterinary Neurology*. (4th ed.). (pp. 355-416). Philadelphia, W.B. Saunders.
- Loukopoulos, P., Thornton, J.R. & Robinson, W.F. (2003). Clinical and pathological relevance of p53 index in canine osseous tumors. *Veterinary Pathology*. 40, 237-248.

- Mandrioli, L., Panarese, S., Cesari, A., Mandara, M.T., Marcato, P.S. & Bettini, G. (2007). Immunohistochemical expression of h-telomerase reverse transcriptase in canine and feline meningiomas. *Journal of Veterinary Science*. 8, 111-115.
- March, P.A. (2000). Diseases of the brain. In S.J. Birchard and R.G. Sherding (Eds.), *Saunders Manual of Small Animal Practice*. (2nd ed.). (1249-1269). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Mayr, B., Dressler, A., Reifinger, M. & Feil, C. (1998). Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 mutation in one mammary tumor from dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 59, 69-78.
- McGrath, J.T. (Ed.) (1960). Intracranial neoplasms. In: *Neurologic Examination of the Dog*. 2nd Edition. Philadelphia: Lea and Febiger. pp 148-195.
- Moissonnier, P., Bordeau, W., Delisle, F. & Devauchelle, P. (2000). Accuracy testing of a new stereotactic CT-guided brain biopsy device in the dog. *Research in Veterinary Science*. 68, 243-247.
- Moissonnier, P., Blot, S., Devauchelle, P., Delisle, F., Beuvon, F., Boulha, L., Colle, M.A. & Lefrancois, T. (2002). Stereotactic CT-guided brain biopsy in the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 43, 115-123.
- Morris, J.S., Nixon, C., King, O.J.A., Morgan, I.M. & Philbey, A.W. (2009). Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasias in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. *The Veterinary Journal*. 179, 422-429.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K. & Yamaguchi, R. (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and p53 in mammary tumors, Squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 62, 743-750.
- Muto, T., Wakui, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Masaoka, T. Ushigome, S. & Furusato, M. (2000). p53 Gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*. 37, 248-253.
- Nassir, L., Rutteman, G.R., Reid, S.W.J., Schulze, Ch. & Argyle, D.J. (2001). Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. *Cancer Letters*. 174, 83-89.
- Nieder, C., Petersen, S., Petersen, C. & Thames, H.D. (2000). The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas. *Cancer Treatment Reviews*. 26, 67-73.
- Nozaki, M., Tada, M., Matsumoto, R., Sawamura, Y., Abe, H. & Iggo, R.D. (1998). Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations in primary non-astrocytic tumors of the central nervous system: reappraisal by yeast functional assay. *Acta Neuropathologica*. 95, 291-296.
- O'Brien, D.P. & Axlund, T.W. (2005). Brain Disease. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th ed.). (pp. 803-835). Philadelphia, Elsevier Saunders.
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*. 170, 1445-1453.

- Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K. & Narama, I. (2002). Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. *Veterinary Pathology*. 39, 557-564.
- Park, M. (2002). Oncogenes. In B. Vogelstein & K.W. Kinzler (Eds.), *The genetic basis of human cancer*. (2nd ed.).(pp. 177-196). New York: Mac Graw Hill
- Patt, S., Gries, H., Giraldo, M., Cervos-Navarro, J., Martin, H., Janisch, W. & Brockmoller, J. (1996). p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. *Human Pathology*. 27, 586-589.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P. & Castano, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10, 237-246.
- Peña, L., Pérez-Alenza, D., Rodríguez-Bertos, A. & Nieto, A. (2003). Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*. 78, 141-148.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper – excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26, 509-515.
- Platt, S.R., Alleman, A.R., Lanz, O.I. & Chrisman, C.L. (2002). Comparison of fine-needle aspiration and surgical-tissue biopsy in the diagnosis of canine brain tumors. *Veterinary Surgery*. 31, 65-69.
- Plummer, S.B, Wheeler, S.J., Thrall, D.E. & Kornegay, J.N. (1992). Computed tomography of primary inflammatory brain disorders in dogs and cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 33, 307-312.
- Polizopoulos, Z.S., Koutinas, A.F., Souftas, V.D., Kaldrymidou, E., Kazakos. G. & Papadopoulos, G. (2004). Diagnostic correlation of CT-MRI and histopathology in 10 dogs with brain neoplasms. *Journal of Veterinary Medicine*. 51, 226-231.
- Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Finkelstein, S.D., Campbell, J.W., Martinez, A.J., Sherwin, R.N., Bozik, M.E. & Gollin, S.M. (1997). The relationship between TP53 mutations and overexpression of p53 and prognosis in malignant gliomas of childhood. *Cancer Research*. 57, 304-309.
- Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Burnham, J., Holmes, E.J., Finkelstein, S.D., Spoto, R., Yates, A.J., Boyett, J.M. & Finlay, J.L. (2002). Impact of proliferation index on outcome in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. *Neurosurgery*. 50, 1238-1245.
- Pollard, R.E., Reilly, C.M., Uerling, M.R., Wood, F.D. & Feldman, E.C. (2010). Cross-sectional imaging characteristics of pituitary adenomas, invasive adenomas and adenocarcinomas in dogs: 33 cases (1988-2006). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24, 160-165.
- Porter, B., Lahunta, A. & Summers, B. (2003). Gliomatosis cerebri in six dogs. *Veterinary Pathology*. 40, 97-102.
- Puente, S. (2003). Pituitary carcinoma in an Airedale Terrier. *Cancer Veterinary Journal*. 44, 240-242.

- Puputti, M., Tynninen, O., Sihto, H., Blom, T., Maenpaa, H., Isola, J., Paetau, A., Joensuu, H. & Nupponen, N.N. (2006). Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Molecular Cancer research*. 4, 927-934.
- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Smith, J.S. & McDermott, W. (2005). Techniques to assess the proliferation of brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. 74, 19-30.
- Rae, J.M., Scheys, J.O., Clark, K.M., Chadwick, R.B., Kiefer, M.C. & Lippman, M.E. (2004). EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*. 87, 87-95.
- Rijn, S.J., Grinwis, G.C., Penning, L.C. & Meji, B.P. (2010). Expression of Ki-67 and p27kip1 in canine pituitary corticotroph adenoma. *Domestic Animal Endocrinology*. 38, 244-252.
- Rodenas, S., Pumarola, M., Gaitero, L., Zamora, A. & Anor, S. (2009). Magnetic resonance imaging findings in 40 dogs with histologically confirmed intracranial tumours. *The Veterinary Journal*. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.011
- Rodriguez, F.J., Scheithauer, B.W., Giannini, C., Bryant, S.C. & Jenkins, R.B. (2008). Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastomas and gliosarcomas. *Cancer*. 113, 2779-2789.
- Royds, J.A. & Iacopetta, B. (2006). p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death and Differentiation*. 13, 1017-1026.
- Rudin, C.M. & Thompson, C.B. (2002). Apoptosis and cancer. In B. Vogelstein & K.W. Kinzler (Eds.), *The Genetic Basis of Human Cancer*. (2nd ed.).(pp. 3-6). New York: Mac Graw Hill
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R. Uchida, K., Miyoshi, N. & Hayashi, T. (1999). Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 61, 27-32.
- Rushing E.J., Watson, M.L., Schold, S.C., Land, K.J., Kokkinakis, D.M. (1998). Glial tumors in the MNU rat model: induction of pure and mixed gliomas that do not require typical missense mutations of p53. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 57, 1053-1060.
- Sagartz, J.E., Bodley, W.L., Gamblin, R.M., Couto, C.G., Tierney, L.A. & Capen, C.C. (1996). p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. *Veterinary Pathology*. 33, 213-221.
- Sanchez, J., Ramirez, A., Buendia, A.J., Vilafranca, M., Martinez, C.M., Altamira, J. & Navarro, J.A. (2007). Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. *Veterinary Pathology*. 44, 676-682.
- Sarkar, C., Mukhopadhyay, S. & Sharma, M.C. (2002). p53 in brain tumors: basic science illuminates clinical oncology. *Indian Journal of Human Genetics*. 8, 52-59.
- Sarkar, C., Jain, A. & Suri, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*. 46, 108-119.

- Schiebe, M., Ohneseit, P., Hoffmann, W., Meyermann, R., Rodemann, H.-P. & Bamberg, M. (2000). Analysis of mdm2 and p53 gene alterations in glioblastomas and its correlation with clinical factors. *Journal of Neuro-Oncology*. 49, 197-203.
- Selvarajah, G.T., Kirpenstein, J., van Wolferen, M.E., Rao, N.A.S., Fieten, H. & Mol, J.A. (2009). Gene expression profiling of canine osteosarcoma reveals genes associated with short and long survival times. *Molecular Cancer*. 8, Article 72. Acedido em Nov. 11, 2010, disponível em: <http://molecular-cancer.com/content/8/1/72>.
- Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., Watari, T., Nishimura, R., Sasaki, N., Hasegawa, A. & Tsujimoto, H. (2001a). Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 62, 433-439.
- Setoguchi A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hong, S.-H., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2001b). Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 62, 1134-1141.
- Shien, T, Tashiro, T., Omatsu, M., Masuda, T., Furuta, K., Sato, N., Akashi-Tanaka, S., Uehara, M., Iwamoto, E., Kinoshita, T., Fukutomi, T., Tsuda, H. & Hasegawa, T. (2005). Frequent overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mammary high grade ductal carcinomas with myoepithelial differentiation. *Journal of Clinical Pathology*. 58, 1299-1304.
- Smith, J.S., Lal, A., Harmon-Smith, M., Bollen, A.W. & McDermott (2007). Association between absence of epidermal growth factor receptor immunoreactivity and poor prognosis in patients with atypical meningiomas. *Journal of Neurosurgery*. 106, 1034-1040.
- Snyder, J.M., Shofer, F.S., Van Winkle, T.J. & Massicotte, C. (2006). Canine intracranial primary neoplasias: 173 cases (1986-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 20, 669-675.
- Stacy, B.A., Stevenson, T.L., Lipsitz, D. & Higgins, R.J. (2003). Simultaneously occurring oligodendroglioma and meningioma in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17, 357-359.
- Stark, A.M., Witzel, P., Strege, R.J., Hugo H-H. & Mehdorn, H.M. (2003). P53, mdm2, EGFR, and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 74, 779-783.
- Stoica, G., Kim, H.-T., Hall, D.G. & Coates, J.R. (2004). Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Veterinary Pathology*. 41, 10-19.
- Sturges, B.K., Dickinson, P.J., Bollen, A.W., Koblik, P.H., Kortz, G.D., Vernau, K.M., Knipe, M.F., LeCouteur, R.A. & Higgins, R.J. (2008). Magnetic resonance imaging and histological classification of intracranial meningiomas in 112 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22, 586-595.
- Syring, R.S. (2005). Traumatic Brain Injury. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th ed.). (pp. 409-412). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Tan, P.-H., Bay, B.-H., Yip, G., Selvarajan, S., Tan, P., Wu, J., Lee, C.-H. & Li, K.-B. (2005). Immunohistochemical detection of Ki-67 breast cancer correlates with transcriptional

- regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Modern Pathology*. 18, 374-381.
- Thomas, R., Duke, S.E., Wang, H.J., Breen, T.E., Higgins, R.J., Linder, K.E., Ellis, P., Langford, C.F., Dickinson, P.J., Olby, N.J. & Breen, M. (2009). "Putting our heads together": insights into genomic conservation between human and canine intracranial tumors. *Journal of Neurooncology*. 94, 333-349.
- Tidwell, A.S., Mahony, O.M., Moore, R.P. & Fitzmaurice, S.N. (1994). Computed tomography of an acute hemorrhagic cerebral infarct in a dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 35, 290-296.
- Tong, C.Y.K., Ng, H.-K., Pang, J.C.S., Hui, A.B.Y., Ko, H.C.W. & Lee, J.C.K. (1999). Molecular genetic analysis of non-astrocytic gliomas. *Histopathology*. 43, 331-341.
- Uchida, K., Kuroki, K., Priosoeryanto, B.P., Kato, K., Yano, Y., Murakami, T., Yamaguchi, R. & Tateyama, S. (1995). Giant cell glioblastoma in the frontal cortex of a dog. *Veterinary Pathology*, 32, 197-199.
- Umesh, S., Tandon, A., Santosh, V., Anandh, B., Sampath, S., Chandramouli, B.A. & Kolluri, V.R.S. (2009). Clinical and immunohistochemical prognostic factors in adult glioblastomas patients. *Clinical Neuropathology*. 28, 362-372.
- Veldhoen, N. & Milner, J. (1998). Isolation of canine cDNA and detailed characterization of the full length canine p53 protein. *Oncogene*. 16, 1077-1084.
- Vernau, K.M., Higgins, R.J., Bollen, A.W., Jimenez, D.F., Anderson, J.V., Koblik, P.D. & LeCouter R.A. (2001). Primary canine and feline nervous system tumours: intraoperative diagnosis using the smear technique. *Veterinary Pathology*. 38, 47-57.
- Vite, C.H., Insko, E.K., Schotland, H.M., Panckeri, K. & Hendricks, J.C. (1997). Quantification of cerebral ventricular volume in English Bulldogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 38, 437-443.
- Vite, C.H. (2006). Developmental Disorders. In C.H. Vite (Ed.), *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. Acedido em Ago.14, 2010, disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Vite/braund16/chapter.asp?LA=1>
- Vullo, T., Korenman, E., Manzo, R.P., Gomez, D.G., Deck, M.D.F. & Cahill, P.T. (1997). Diagnosis of cerebral ventriculomegaly in normal adult Beagles using quantitative MRI. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 38, 277-281.
- Wang, Z. & Sun, Y. (2010). Targeting p53 for novel anticancer therapy. *Translational Oncology*. 3, 1-12.
- Wilne, S., Collier, J., Kennedy, C., Koller, K., Grundy, R. & Walker, D. (2007). Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*. 8, 685-695.
- Wolf, M., Pedroia, V., Higgins, R.J., Koblik, P.D., Turrel, J.M. & Owens, J.M. (1995). Intracranial ring enhancement lesions in dogs: a correlative CT scanning and neuropathologic study. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 36, 16-20.
- Wolf, J.C., Ginn, P.E., Homer, B., Fox, L.E. & Kurzman, I.D. (1997). Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. *Veterinary Pathology*. 34, 394-404.

- Wong, R.W.C. & Guillard, L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 15, 147-156.
- Wynford-Thomas, D. (1996). p53: Guardian of cellular senescence. *Journal of Pathology*. 180, 118-121.
- Yonemaru, K., Sakai, H., Murakami, M., Kodama, A., Mori, T., Yanai, T., Maruo, K. & Masegi, T. (2007). The significance of p53 and retinoblastoma pathways in canine hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 69, 271-278.
- Yoon, K.S., Lee, M.C., Kang, S.S., Kim, J.-H., Jung, S., Kim, Y.J., Lee, J.H., Ahn, K.Y., Lee, J.S. & Cheon, J.Y. (2001). P53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma. *Journal of Korean Medical Sciences*. 16, 481-488.
- You, S., Moon, J.-H., Kim, T.-K., Kim, S.-C., Kim, J.-W., Yoon, D.-H., Kwak, S., Hong, K.-C., Choi, Y.-J. & Kim, H. (2004). Cellular characteristics of primary and immortal canine embryonic fibroblast cells. *Experimental and Molecular Medicine*. 36, 325-335.
- Zachetti, A., Van Garderen E, Teske, E., Nederbragt, H., Dierendonk, J.H. & Rutteman, G.R. (2003). Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 111, 430-438.
- Zachetti, A., Van Garderen, E. & Rutteman, G.R. (2007). Immunohistochemical evaluation of p53 expression with different antibodies in malignant canine tumours with or without p53 gene mutation. *Veterinary and Comparative Oncology*. 5, 108-118.
- Zhou, Y.-H., Tan, F., Hess, K.R. & Yung, W.K.A. (2003). The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factors, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clinical Cancer Research*. 9, 3369-3375.
- Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R.V., Haupt, S. & Haupt, Y. (2009). Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *Journal Of Pathology*. 219, 3-15.
- Ziyaie, D., Hupp, T.R., Thompson, A.M. (2000). p53 and breast cancer. *The Breast*. 9, 239-246.