

FABRÍCIA HALLACK LOURES

**HISTOGÊNESE E EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA ESTRÓGENO E
PROGESTERONA EM SARCOMAS DE TECIDOS MOLES CUTÂNEOS EM
CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L892h
2016

Loures, Fabrícia Hallack, 1979-

Histogênese e expressão de receptores para estrógeno e progesterona em sarcomas de tecidos moles cutâneos em cães / Fabrícia Hallack Loures. – Viçosa, MG, 2016.
viii, 54f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.35-39.

1. Câncer em animais. 2. Cão - Doenças. 3. Sarcoma.
4. Histogênese. 5. Progesterona. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

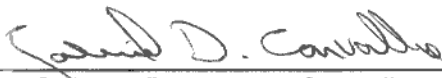
CDD 22 ed. 636.0896994061

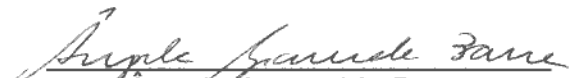
FABRÍCIA HALLACK LOURES

**HISTOGÊNESE E EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA ESTRÓGENO
E PROGESTERONA EM SARCOMAS DE TECIDOS MOLES CUTÂNEOS
EM CÃES**

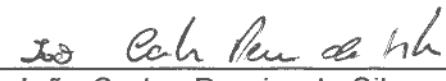
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

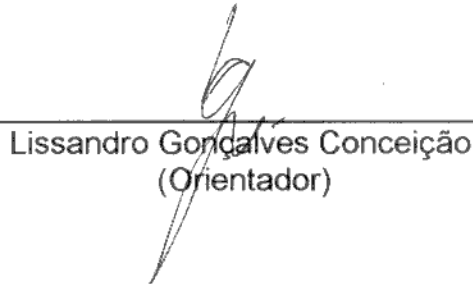
APROVADA: 21 de outubro de 2016.


Gabriel Domingos Carvalho


Ângela Aparecida Barra


Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Coorientadora)


João Carlos Pereira da Silva
(Coorientador)


Lissandro Gonçalves Conceição
(Orientador)

Às minhas queridas
filhas, Gabriele e Isabela,
amores da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo amor que preenche e impulsiona, sustenta e fortalece, guia e conduz.

À Universidade Federal de Viçosa, através do Departamento de Veterinária e Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de realização do doutorado.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Lissandro Gonçalves Conceição, professor, parceiro, companheiro e amigo em todos os momentos.

À professora Renne Laufer Amorim e ao aluno de pós-graduação Juliano Nobrega, pela grandiosa colaboração com a imuno-histoquímica.

Aos professores Eduardo Paulino da Costa e Fabyano Fonseca e Silva, pela cuidadosa análise estatística.

Aos professores João Carlos Pereira da Silva e Marlene Isabel Vargas Vitoria, pela co-orientação.

Ao Provet e a todos os médicos veterinários solicitantes dos exames dermatopatológicos, pelo envio dos casos apresentados neste estudo.

Aos familiares, pelo incentivo e estímulo.

A todos os professores, colaboradores e funcionários que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	3
3.MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Amostras.....	7
3.2 Critérios de inclusão dos casos e informações clínicas.....	7
3.3 Avaliação histopatológica.....	7
3.4 Imuno-histoquímica.....	9
3.5 Análises estatísticas.....	12
4.RESULTADOS.....	13
4.1 Informações clínicas.....	13
4.2 Avaliação histopatológica.....	14
4.3 Imuno-histoquímica.....	17
5.DISSCUSSÃO.....	28
6.CONCLUSÕES.....	33
7.PERSPECTIVAS FUTURAS.....	34
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	40

RESUMO

LOURES, Fabrícia Hallack, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Histogênese e expressão de receptores para estrógeno e progesterona em sarcomas de tecidos moles cutâneos em cães.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição. Coorientadores: João Carlos Pereira da Silva e Marlene Isabel Vargas Viloria.

Sarcomas de tecidos moles (STM) caninos compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, classificadas coletivamente por apresentarem alterações histopatológicas similares, baixa a moderada taxa de recorrência e baixo potencial metastático. Apesar disto, foram descritos padrões histopatológicos vasculares e neurais, específicos para tumor de parede perivascular e tumor de bainha de nervo periférico, respectivamente. Ademais, recentemente foram apontadas diferenças no comportamento biológico dos tumores de parede perivascular, em relação a outros STM. Em medicina humana, a expressão de receptor para estrógeno (RE) e receptor para progesterona (RP) nos sarcomas tem sido estudada, visando a busca de fatores prognósticos e novos alvos para tratamentos. Na medicina veterinária, ainda não foram realizados estudos similares. Os objetivos deste trabalho foram investigar por imuno-histoquímica a histogênese e a expressão de RE e RP em uma série de 80 sarcomas cutâneos e subcutâneos de cães, com características histopatológicas de tumor de bainha de nervo periférico e tumor de parede perivascular. Vinte e um casos (26,25%) apresentaram características morfológicas compatíveis com tumor de parede perivascular, 23 casos (28,75%) com tumor de bainha de nervo periférico, 27 casos (33,75%) compartilharam padrões neurais e vasculares e 9 casos (11,25%) foram indiferenciados. Por imuno-histoquímica, 65 casos (81,25%) apresentaram positividade apenas para marcadores neurais e os outros 15 casos (18,75%) positividade simultânea para marcadores neurais e musculares. A maioria mostrou ser tumor de bainha de nervo periférico. Os padrões histopatológicos tipo perivascular não refletiram a histogênese, que na maior parte das vezes foi negativa para os marcadores musculares e positiva para os marcadores neurais. Todos os casos foram positivos para RP e negativos para RE. Tumores de alto grau de malignidade (grau III) exibiram maior expressão deste receptor que os tumores de baixo grau (grau I). Esta diferença também foi observada para tumores com atividade mitótica maior que 9 figuras mitóticas/10 campos de grande aumento. Houve

correlação positiva entre o índice de proliferação celular (Ki67) e a expressão de RP. Assim, a progesterona parece desempenhar um papel na patogênese desses tumores. Futuros trabalhos poderão explorar a ação dos moduladores seletivos de receptor de progesterona como agentes terapêuticos nos sarcomas caninos, além de avaliar a expressão do RP como preditiva de prognóstico.

ABSTRACT

LOURES, Fabrícia Hallack, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Histogenesis and estrogen and progesterone receptor expression in canine soft tissue sarcomas.** Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-advisers: João Carlos Pereira da Silva and Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Soft tissue sarcomas (STS) canines comprise a heterogeneous group of malignancies, collectively classified due to similar histopathological features, low to moderate recurrence rate and low metastatic potential. Nevertheless, vascular and neural histopathological pattern have been described as specific for perivascular wall tumor and nerve sheath tumor, respectively. Moreover, differences were recently identified in the biological behavior of perivascular wall tumor in comparison to other STM. In human medicine, the expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in sarcomas has been studied to search for prognostic factors and new targets for treatment. In veterinary medicine, similar studies have not yet been carried out. The objectives of this study were to investigate by immunohistochemistry the histogenesis and ER and PR expression in a series of 80 cutaneous and subcutaneous sarcomas in dogs with histopathological features of peripheral nerve sheath tumor and perivascular wall tumor. Twenty-one cases (26.25%) showed morphological characteristics compatible with perivascular wall tumor, 23 cases (28.75%) with peripheral nerve sheath tumor, 27 cases (33.75%) shared both neural and vascular patterns and 9 cases (11.25%) were undifferentiated. By immunohistochemistry, 65 cases (81.25%) were positive only for neural markers and the other 15 cases (18.75%) demonstrated simultaneous positivity for neural and muscle markers. Most tumors proved to be peripheral nerve sheath tumor. The perivascular histopathologic type did not reflect histogenesis, which in most cases was negative for muscle markers and positive for the neural markers. All cases were positive for PR and negative for ER. Tumors of high malignancy grade (grade III) exhibited higher PR expression than low-grade tumors (grade I). This difference was also observed for tumors with mitotic activity greater than 9 mitotic figures / 10 high power fields. There was a positive correlation between cell proliferation (Ki67) and PR expression. Thus, it is possible that progesterone play a greater role in the pathogenesis of these tumors. Future researches may explore the potential for selective progesterone receptor modulators as

therapeutic agents in canine STS, as well as evaluating the PR expression as a predictor of prognosis.

1. INTRODUÇÃO

Sarcomas de tecidos moles (STM) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, derivadas de tecidos mesenquimais extra-esqueléticos, classificadas coletivamente por apresentarem alterações histopatológicas e comportamento biológico similares (Ettinger, 2003; Dennis et al., 2011). Estas neoplasias ocorrem com frequência no tecido cutâneo e subcutâneo e exibem, em geral, baixo potencial metastático e variável taxa de recorrência após excisão cirúrgica (Dennis et al., 2011; Avallone et al., 2014).

A despeito disto, foram descritos padrões histopatológicos vasculares e neurais, específicos para tumor de parede perivascular e tumor de bainha de nervo periférico, respectivamente (Chijiwa et al., 2004; Gross et al., 2005; Gaitero et al., 2008; Stefanello et al., 2011; Avallone et al., 2014). Ademais, recentemente foram apontadas diferenças no comportamento biológico dos tumores de parede perivascular, que parecem representar uma forma mais benigna entre os STM, com baixas taxas de recidiva e metástases (Stefanello et al., 2011). Assim, entende-se a necessidade de aprofundar nos estudos imuno-histoquímicos e estabelecer o valor dos padrões histopatológicos perivasculares e neurais para o diagnóstico destes tumores.

No que se refere à expressão de RE e RP em STM, em medicina humana recentes estudos foram conduzidos, com finalidade prognóstica e busca por novos alvos para tratamentos (Ioffe et al., 2009; Valkov et al., 2011; Akashi et al., 2013; Li et al., 2013; Sorbye et al., 2013; Thanopoulou et al., 2014). Em cães, o significado prognóstico da expressão de receptor para estrógeno (RE) e receptor para progesterona (RP) foi avaliado principalmente em neoplasias mamárias (Millanta et al., 2005; Millanta et al., 2006). Não há relatos, entretanto, que indiquem o estudo destes receptores em sarcomas caninos. A compreensão da influência dos hormônios esteroides no desenvolvimento e crescimento destas neoplasias pode ser importante para a pesquisa de novas abordagens terapêuticas. Além disso, a investigação da expressão desses receptores em STM de ocorrência natural em animais poderá fornecer informações adicionais para a pesquisa do câncer em seres humanos (Vail et al., 2000).

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram investigar a histogênese dos STM que apresentaram compatibilidade morfológica com o que é descrito

para o tumor de parede perivascular e tumor de bainha de nervo periférico; avaliar por imuno-histoquímica as expressões de RE e RP nestes sarcomas, correlacionando-as com aspectos histopatológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

STM compreendem 15% de todas as neoplasias subcutâneas em cães (Vail et al., 2000), sendo um grupo heterogêneo de neoplasias mesenquimais, incluindo tumor de bainha do nervo periférico, hemangiopericitoma, lipossarcoma, fibrossarcoma, mixossarcoma, tumores de parede perivascular e sarcomas indiferenciados (McSporran, 2009). Esses tumores são de difícil distinção histológica, por serem comumente formados por células fusiformes, organizadas em feixes intercruzantes e arranjo concêntrico. Eles são localmente expansivos e crescem entre planos fasciais profundos. Em cães, muitos destes sarcomas apresentam um bom prognóstico, exibem baixa a moderada taxa de recorrência pós-cirúrgica (variando de 7 a 35%) e metástases são descritas em até 17% dos casos (Ettinger, 2003; McSporran, 2009; Dennis et al., 2011).

Devido à similaridade histológica entre os diferentes tipos de STM cutâneos e subcutâneos, vários estudos avaliaram a expressão de marcadores imuno-histoquímicos nestas neoplasias, com a finalidade de fornecer informações diagnósticas (Perez et al., 1996; Williamson et al., 1998; Chijiwa et al., 2004; Avallone et al., 2007; Gaitero et al., 2008). De modo geral, não existe um único marcador que seja específico para uma ou outra neoplasia e estes tumores parecem compartilhar padrões variados de imunomarcção, o que reflete na possibilidade de serem constituídos por células de diferentes linhagens (Williamson et al., 1998) ou células tronco mesenquimais pluripotenciais, capazes de sofrer diferenciação em diversas direções (Yager & Wilcock, 1994). Com base neste fato, além da maioria destes tumores apresentarem comportamento biológico e prognóstico comuns, alguns autores defendem a ideia de integrá-los sob o único termo “tumor fusocelular de tecidos moles”, ao invés de classificá-los segundo a sua histogênese (Yager & Wilcock, 1994; Williamson et al., 1998). Por outro lado, o diagnóstico objetivando definir a origem celular, levando em conta as características histomorfológicas e imuno-histoquímicas, poderia permitir a identificação de variáveis prognósticas para um grupo específico de STM (Stefanello et al., 2011; Avallone et al., 2014).

Neste sentido, Avallone et al. (2007) demonstraram características citológicas, histopatológicas e fenotípicas específicas para os “tumores de parede perivascular”, anteriormente classificados como hemangiopericitomas e

definidos como neoplasias derivadas de diferentes componentes celulares da parede vascular, exceto as células endoteliais. Em veterinária, este grupo inclui, além do hemangiopericitoma, o miopericitoma, angioleiomioma, angioleiomiossarcoma, tumor adventício, angiofibroma (Avallone et al., 2007). Histologicamente, estes tumores são definidos por apresentarem padrões de crescimento vascular (ex. “*staghorn*” ou “chifre de veado”, placentoide, redemoinhos pericapilares e feixes irradiantes a partir da túnica média ou adventícia) e não vasculares (feixes inter cruzantes ou paralelos, áreas sólidas, arranjo estoriforme, mixóide e semelhante a Corps de Verocay) (Stefanello et al., 2011; Avallone et al., 2014).

Estes últimos autores definiram três principais grupos para tumores de parede perivascular, com alto valor prognóstico. No grupo 1, os tumores caracterizaram-se por intermediária taxa de recorrência, localizaram-se em extremidades, limitados ao tecido subcutâneo e com crescimento expansivo, o que permitiu excisão com margens cirúrgicas completas. O grupo 2 incluiu tumores não localizados nas extremidades, com crescimento infiltrativo ou nódulos satélites, alcançando as camadas musculares e apresentando maior taxa de recorrência e metástase. O grupo 3 incluiu tumores não localizados em extremidades, limitados ao subcutâneo, com crescimento expansivo, caracterizados por baixas taxas de recidiva. Os autores concluíram que o risco de recorrência depende da interação de diferentes parâmetros clínico-patológicos, como local, profundidade da lesão, tipo de crescimento e qualidade de margens cirúrgicas. Estes autores também propuseram um painel imuno-histoquímico para a diferenciação dos diferentes tipos de tumores de parede perivascular (Avallone et al., 2007). Aqui será utilizado o já consagrado termo “tumor de parede perivascular”, apesar da compreensão de que essas neoplasias na verdade derivam de células da parede vascular propriamente dita.

Estudos imuno-histoquímicos também foram conduzidos afim de identificar marcadores neurais para tumores de bainha de nervo periférico. Também denominados schwannoma, neurilemoma e neurofibroma, estas neoplasias são derivadas de células de Schwann, fibroblastos perineurais ou ambos (Chijiwa et al., 2004; Gaitero et al., 2008). Presume-se que a maioria dos tumores de bainha de nervo periférico em cães origine-se das células de Schwann. A exata incidência desta neoplasia é difícil de ser avaliada, já que

apresenta similaridades morfológicas e imunofenotípicas com outros tumores fusocelulares (Gross et al., 2005). Nessas neoplasias, em cães, as lesões são nodulares, normalmente circunscritas, lobuladas, desenvolvendo-se no tecido subcutâneo, podendo se expandir à derme e localizam-se comumente no tronco e região distal de membros. Os cães acometidos são de meia idade a idosos (Gross et al., 2005).

Na veterinária, a nomenclatura dos tumores de bainha de nervo periférico é confusa. Baseado na morfologia podem ser divididos em benignos e malignos, embora ambos apresentem comportamento biológico maligno (Gaitero et al., 2008). Histologicamente, no tipo benigno, as células são predominantemente fusiformes, arranjadas em feixes sólidos, intercruzantes e redemoinhos (padrão *Antoni A*). Os núcleos são pequenos, eucromáticos e a atividade mitótica é rara. Ocasionalmente, células poligonais podem estar distribuídas em matriz fibrilar e mucinoide (padrão *Antoni B*). As alterações morfológicas dos tumores malignos de bainha de nervo periférico são similares às descritas para os benignos, mas no geral a celularidade é maior, os padrões neurais são menos evidentes, o crescimento é infiltrativo, as células são pleomórficas, com núcleos vesiculares e a atividade mitótica é mais proeminente. Pode haver áreas de necrose, diferenciação óssea ou cartilaginosa (Chijiwa et al., 2004; Gross et al., 2005; Gaitero et al., 2008).

O tratamento de escolha para STM em cães é a excisão cirúrgica, com ampla margem de segurança, definida como 3 cm a partir das laterais do tumor e um plano fascial profundo. A radioterapia, em combinação com a cirurgia, é indicada para o tratamento da doença microscópica. A quimioterapia, geralmente indicada para o tratamento de doença metastática e para os tumores de alto grau ou incompletamente excisados, apresenta pouca eficiência nos STM (Ettinger, 2003; Miller et al., 2013).

A acurada informação prognóstica é necessária para orientar a conduta clínica e identificar pacientes que podem se beneficiar de uma ou de outra modalidade terapêutica. Em veterinária, assim como na medicina humana, o grau histológico, índice mitótico e avaliação das margens cirúrgicas apresentam valor prognóstico para STM em cães (Dennis et al., 2011). Tumores com margens cirúrgicas completas são improváveis de recorrer (McSporran, 2009). A recorrência parece aumentar com o grau histológico e as metástases ocorrem

mais comumente para sarcomas de grau III (McSporran, 2009; Dennis et al., 2011). O elevado índice mitótico (maior que 9 figuras mitóticas/10 campos de grande aumento) é prognóstico para reduzida sobrevida (Dennis et al., 2011).

Para os tumores de parede perivascular o diâmetro e a profundidade do tumor foram significativamente associados com o aumento na probabilidade de recorrência. O risco de recidiva para tumores com invasão muscular foi aproximadamente oito vezes maior que para aqueles localizados apenas no subcutâneo. Os cães com tumores maiores que 5 cm tiveram probabilidade seis a sete vezes maior de apresentarem recidiva. O alto impacto prognóstico do tamanho do tumor salienta a necessidade de diagnóstico precoce, permitindo a completa excisão cirúrgica (Stefanello et al., 2011; Avallone et al., 2014).

Em relação aos outros STM, tumores de parede perivascular apresentaram um favorável prognóstico e comportamento biológico não agressivo, com baixa tendência à ocorrência de metástases. Diferente de estudos prévios, neste subgrupo de sarcomas a recorrência local foi baixa, ocorrendo, em sua maioria, após longo período (um a dois anos após a primeira excisão). Também não houve correlação estatística entre o grau histológico (considerando variáveis como percentual de necrose, taxa de mitose e grau de diferenciação) e recorrência. Esses fatores suportam a hipótese de que o comportamento biológico dos tumores de parede perivascular pode ser distinto de outros STM (Stefanello et al., 2011).

Em humanos, estudos sobre a patogênese dos diversos mecanismos envolvidos na carcinogênese dos STM tem buscado por fatores prognósticos e novos alvos para tratamentos (Dennis et al., 2011). Entre eles, a expressão de RE e RP foi demonstrada em STM, cutâneos e extra cutâneos. Os receptores para hormônios sexuais esteroides regulam a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e na apoptose, além de atuarem na diferenciação celular e agirem como fatores de crescimento (Chabbert-Buffet et al., 2005; Fishbein et al., 2007; Sorbye et al., 2013). A maioria dos estudos avaliou o impacto prognóstico e terapêutico desta expressão em sarcomas uterinos (Ioffe et al., 2009; Valkov et al., 2011; Akashi et al., 2013; Li et al., 2013; Sorbye et al., 2013; Thanopoulou et al., 2014). Também se investigou o papel destes esteroides em schwannomas vestibulares e neurofibromatose (Fishbein et al., 2007; Overdiek et al. 2008; Jaiswal et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foi realizado estudo retrospectivo no período de 2010 a 2014, de uma série de 4054 biópsias (neoplásicas e não neoplásicas), encaminhadas ao setor de diagnóstico dermatohistopatológico do Provet (Medicina Veterinária Diagnóstica) de São Paulo. Os espécimes cutâneos foram coletados por biópsia (punch, incisional ou excisional), fixados em formalina 10%, processados de maneira habitual e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram feitos com espessura de 3 a 5 micrômetros e corados com hematoxilina e eosina (HE).

3.2. Critérios de inclusão dos casos e informações clínicas

Foram selecionados 80 casos diagnosticados como STM, sugestivos de tumor de bainha de nervo periférico e tumor de parede perivascular. Não foram incluídos outros tipos histológicos de STM, como fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma e rabdomiossarcoma. As informações clínicas referentes ao sexo, idade, raça, localização e tamanho das lesões foram obtidas através dos formulários de requisição do exame histopatológico.

3.3. Avaliação histopatológica

As lâminas em HE foram revisadas, sob microscopia de luz, em relação ao diagnóstico, grau histológico e classificação do tipo histológico provável dos tumores. O grau histológico baseou-se no somatório de escores atribuídos à taxa mitótica, percentagem de necrose e diferenciação da neoplasia (Tabela 1 - Dennis et al., 2011).

Tabela 1. Sistema de Graduação para Sarcomas de Tecidos Moles cutâneos e subcutâneos em cães (Dennis et al., 2011)

Escore de diferenciação	
1	Sarcomas que lembram o tecido mesenquimal maduro normal
2	Sarcomas em que o tipo histológico pode ser determinado, embora a diferenciação seja menos evidente
3	Sarcomas indiferenciados
Escore de índice mitótico (nº de figuras de mitose/10 campos de grande aumento - 400x)	
1	0-9
2	10-19
3	>19
Escore de necrose tumoral	
0	ausente
1	≤ 50% de necrose
2	> 50% de necrose
Grau histológico e escore total (somatório dos escores atribuídos à diferenciação, índice mitótico e necrose tumoral)	
I	≤ 3
II	4 ou 5
III	≥ 6

O tipo histológico foi definido em função do padrão arquitetural da neoplasia (padrão de crescimento vascular ou padrão neural clássico). O padrão de crescimento vascular caracterizou-se pela presença de um ou mais arranjos perivasculares, definidos como arranjo semelhante a “chifre de veado”, redemoinhos pericapilares, arranjo placentóide, redemoinhos ou feixes que irradiam a partir da túnica média e adventícia (Avallone et al., 2007). O padrão neural clássico foi definido como a presença de padrão Antoni A (áreas com células fusiformes densamente organizadas) e Antoni B (áreas hipocelulares, com abundante matriz mixóide e ocasionais células redondas) e/ou pela

presença de arranjo estoriforme, paliçadas, redemoinhos, feixes ondulantes, sem evidência de nenhum padrão vascular (Gross et al., 2005). Dessa forma, os casos foram classificados em tumor de parede perivascular ou tumor de bainha de nervo periférico. Aqueles que compartilharam os padrões destes dois tipos histopatológicos foram referidos como tumores mistos e os demais foram considerados indiferenciados.

3.4. Imuno-histoquímica

Os blocos de parafina foram cortados com três micrômetros de espessura e distendidos sobre lâminas carregadas eletricamente (Starfrost®). A técnica seguiu o protocolo já definido pelo Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu. Os anticorpos utilizados, a diluição e o método empregado estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados na imunomarcagem dos STM caninos: marca, clone e diluição do anticorpo primário, método de recuperação antigênica, tempo de incubação, anticorpo secundário e cromógeno utilizados nas reações imuno-histoquímicas

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação	Tempo de incubação	Secundário	Cromógeno
CD56	Biocare Medical, Concord, CA, USA	BC56C04	1:200	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Polyclonal Rabbit Anti-S100	Dako, Glostrup, Denmark	Policlonal	1:1000	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin	Dako, Glostrup, Denmark	IA4	1:1000	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin	Dako, Glostrup, Denmark	D33	1:50	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor	Dako, Glostrup, Denmark	Policlonal	1:1000	-	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Monoclonal Mouse Anti-Human Neuron-Specific Enolase (NSE)	Dako, Glostrup, Denmark	BBS/NC/VI-H14	1:3000	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Glial Fibrillary Acidic Protein Rabbit Polyclonal Antibody	Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA	Policlonal	1:300	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor	Dako, Glostrup, Denmark	ID5	1:20	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Progesterone Receptor Ab-2 Mouse Monoclonal Antibody	Thermo Scientific, Runcorn, UK	hPRa2	1:50	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen	Dako, Glostrup, Denmark	MIB-1	1:50	Citrato pH 6.0/Pascal	<i>Overnight</i>	EnVision	DAB

Após serem mantidos na estufa a 54°C, overnight, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em álcool etílico em diluições decrescentes e submetidos a dez lavagens com água deionizada. Para a recuperação antigênica foi utilizado citrato em pH 6.0 na panela de pressão (Pascal®). Após o resfriamento e lavagem, as amostras foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem, adicionou-se o anticorpo primário e as lâminas foram mantidas na câmara úmida a 4°C durante 18 horas *overnight*. Após este período, realizaram-se duas lavagens com tampão TRIS em pH 7.4 durante 5 (cinco) minutos cada e então utilizou-se o sistema de polímero com anticorpo secundário ligado a peroxidase (EnVision, DakoCytomation®) de acordo com as recomendações do fabricante. As preparações histológicas foram lavadas com tampão TRIS em pH 7.4 e o complexo foi revelado com o uso do 3,3'-*diaminobenzidine tetrachloride* - DAB (DakoCytomation®); contra-coradas com hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por 5 (cinco) minutos. Após este processamento, as amostras foram desidratadas no álcool etílico em diluições crescentes, diafanizadas em xilol e as lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Como controles positivos para RE e RP foram utilizados cortes histológicos de hiperplasia endometrial cística canina. Controles positivos internos (tecido muscular e células endoteliais) foram usados para actina do músculo liso, desmina e fator Von Willebrand. Para os demais anticorpos, os controles positivos consistiram de neoplasias sabidamente positivas para cada um deles. Para todos os anticorpos, os controles negativos foram realizados omitindo os anticorpos primários.

A interpretação imuno-histoquímica foi realizada sob microscopia de luz. As neoplasias foram examinadas em menor aumento para identificar as áreas de maior intensidade de imunomarcção. As áreas com intensa inflamação ou necrose foram evitadas, uma vez que células inflamatórias podem ser positivas para Ki67. Para o Ki67 foi definida a percentagem de núcleos positivos, com a contagem manual de no mínimo 1000 células em 10 campos de grande aumento (400x), utilizando o programa *Image Pro Plus*®. Para a expressão de RE e RP, foram definidos escores em relação ao percentual de células coradas nos cortes estudados (escore 0: negativo; escore 1: positividade em 1-33% das células;

escore 2: positividade em 34-66% das células; escore 3: positividade em 67-100% das células). Adicionalmente, todos os casos foram avaliados para a presença de feixes nervosos normais no tecido peritumoral e suas respectivas imunomarcações para RE e RP. Para os demais anticorpos (Fator Von Willebrand, actina de músculo liso, desmina, NSE, GFAP, S100, CD56), utilizados para excluir hemangiossarcoma e classificar os tumores quanto ao tipo histológico (tumor de parede perivascular ou tumor de bainha de nervo periférico), os casos foram considerados positivos quando no mínimo 10% das células tumorais exibiram imunomarcação (Ramos-Vara et al., 2014).

3.5. Análises estatísticas

Foi realizada estatística descritiva para análise das informações clínicas (sexo e idade dos animais, tamanho e localização das lesões).

Foi realizado risco relativo (*Odds Ratio*) para avaliar a predisposição das raças ao STM, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa estatístico MedCalc (Easy to use statistical software), disponível em https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php. Para avaliar a predisposição dos sexos ao STM foi calculado intervalo de confiança de 95%, para a proporção de ocorrência. Dessa forma, as proporções consideradas estatisticamente iguais foram identificadas por sobreposição destes intervalos. Os intervalos relatados foram obtidos no pacote prop.test do software estatístico R (R Development Core Team, 2008).

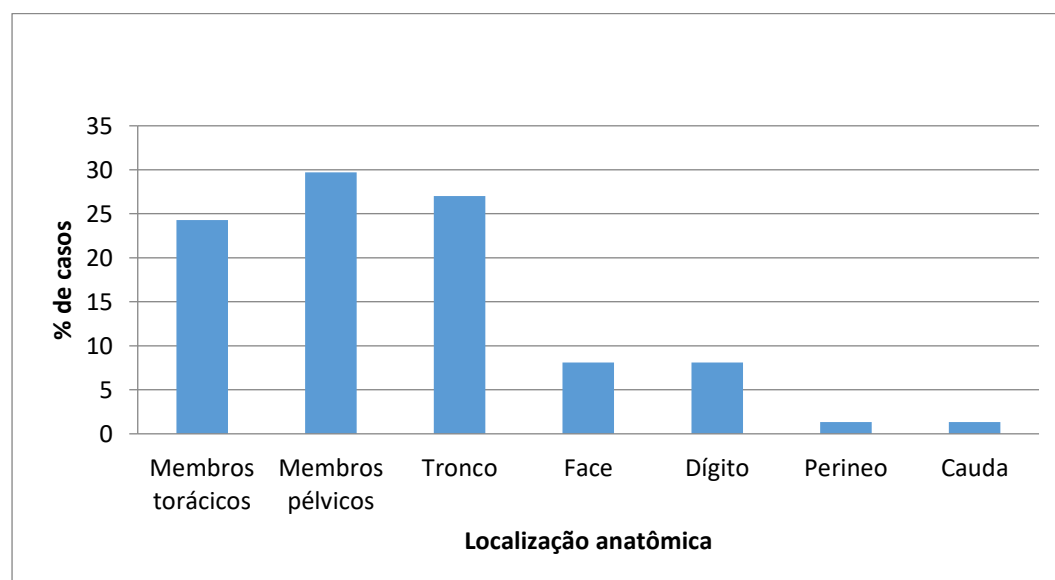
As variáveis qualitativas (RE e RP) foram comparadas entre os graus tumorais e escores para atividade mitótica, utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon (SAEG, 1999). O índice de proliferação celular (Ki67) foi correlacionado com a extensão da imunomarcação para progesterona (correlação de Spearman) (Sistema de Análise Estatística e Genética, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Informações clínicas

Foram selecionados 80 casos de STM em cães, com características histopatológicas de tumor de bainha de nervo periférico e/ou tumor de parede perivascular. Do total de animais, 34 (42,5%) casos ocorreram em machos e 46 (57,5%) em fêmeas. A relação macho/fêmea foi de 1:1,3. Pela análise do intervalo de confiança, não houve predisposição de nenhum dos sexos para o desenvolvimento da doença. A idade (informada em 72 casos) variou de 2 a 16 anos, sendo a média 10 anos ($\pm 2,93$) e a moda 12 anos. A localização dos tumores foi referida em 74 casos, com mais da metade (54,0% - 40 casos) ocorrendo nos membros (torácicos - 24,3% e pélvicos - 29,7%). Outras regiões anatômicas foram envolvidas com menor frequência: tronco (20 casos - 27%); face (6 casos - 8,1%); dígito (6 casos - 8,1%); períneo (1 caso - 1,35%) e cauda (1 caso - 1,35%) (figura 1). O tamanho das lesões (informação obtida em 35 casos) variou de 1,5 a 25 cm de diâmetro, sendo a média 5,5 cm ($\pm 4,9$) e a moda 2,0 cm de diâmetro.

Figura 1. Localização anatômica dos STM em cães (n=74 casos)



Cães sem raça definida (SRD), Labrador Retriever, Maltês, Poodle, Boxer, Golden Retriever e Husky Siberiano foram os acometidos com mais frequência. No entanto foram os Huskies Siberianos (Odds Ratio:7.68; P=0,0003) e os

Maltêses (Odds Ratio:2.60; P=0,048) os mais predispostos para o desenvolvimento da doença; eles apresentaram, respectivamente, sete e duas vezes mais predisposição que as demais raças.

4.2. Avaliação histopatológica

Os tumores foram classificados quanto à diferenciação histológica, atividade mitótica e necrose. Na maioria dos casos predominou escore 2 para a diferenciação (61 casos ou 76,25%), enquanto os escores 1 (10 casos -12,5%) e 3 (9 casos -11,25%) foram menos frequentes. O escore 1 para atividade mitótica foi atribuído a 41 (51,25%) dos 80 casos estudados. O escore 2 ocorreu em 27 (33,75%) e o 3 em 12 casos (15,0%). Necrose estava ausente em mais da metade dos casos (43 casos ou 53,75%). No restante, escore 1 para necrose ocorreu em 35 casos (43,75%) e escore 2 em 2 casos (2,5%).

Baseado na somatória dos escores acima, os tumores foram classificados em graus histológicos. Nesta série de casos, 26 (32,5%) foram histologicamente classificados como grau I, 43 (53,75%) como grau II e 11 (13,75%) como grau III.

Vinte e um casos (26,25%) apresentaram características histopatológicas compatíveis com tumor de parede perivascular (figuras 2 e 3) e 23 casos (28,75%) com tumor de bainha de nervo periférico (figuras 4, 5 e 6). Vinte e sete casos (33,75%) compartilharam padrões histopatológicos vasculares e neurais e foram considerados tumores mistos. Os 9 casos restantes (11,25%) apresentaram-se indiferenciados.

Figura 2. Sarcoma de tecidos moles em cão, com características histopatológicas de tumor de parede perivascular: células fusiformes organizadas em feixes e redemoinhos pericapilares (coloração em Hematoxilina & Eosina - HE, 400x)

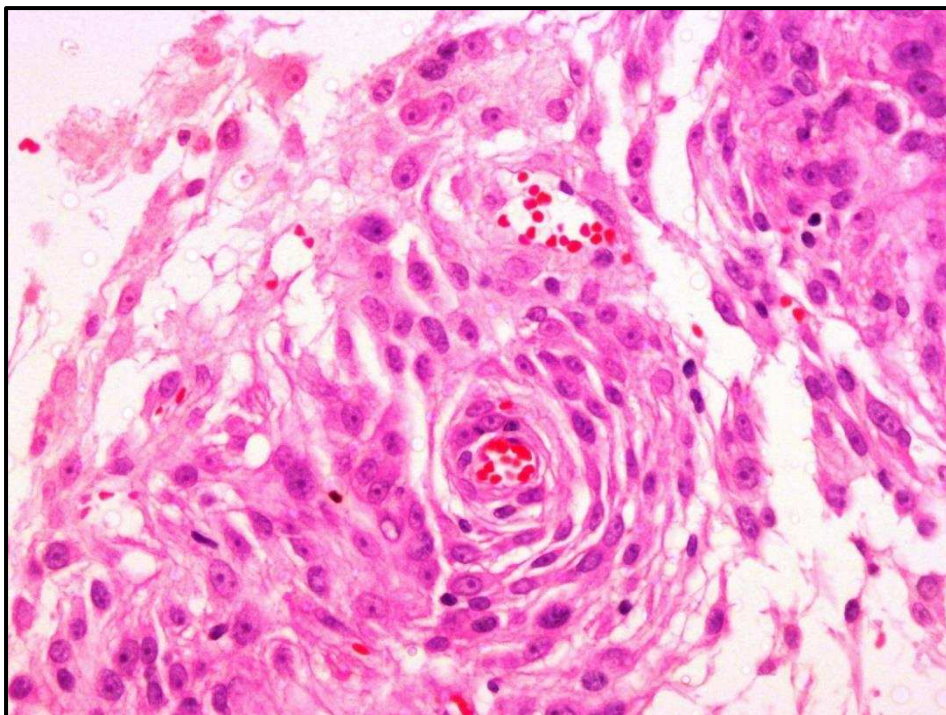


Figura 3. Sarcoma de tecidos moles em cão, com características histopatológicas de tumor de parede perivascular: vasos sanguíneos em arranjo semelhante a “chifre de veado” (coloração em Hematoxilina & Eosina - HE, 40x)



Figura 4. Sarcoma de tecidos moles em cão, com características histopatológicas de tumor de bainha de nervo periférico: células fusiformes arranjadas em feixes ondulantes (coloração em Hematoxilina & Eosina - HE, 100x)

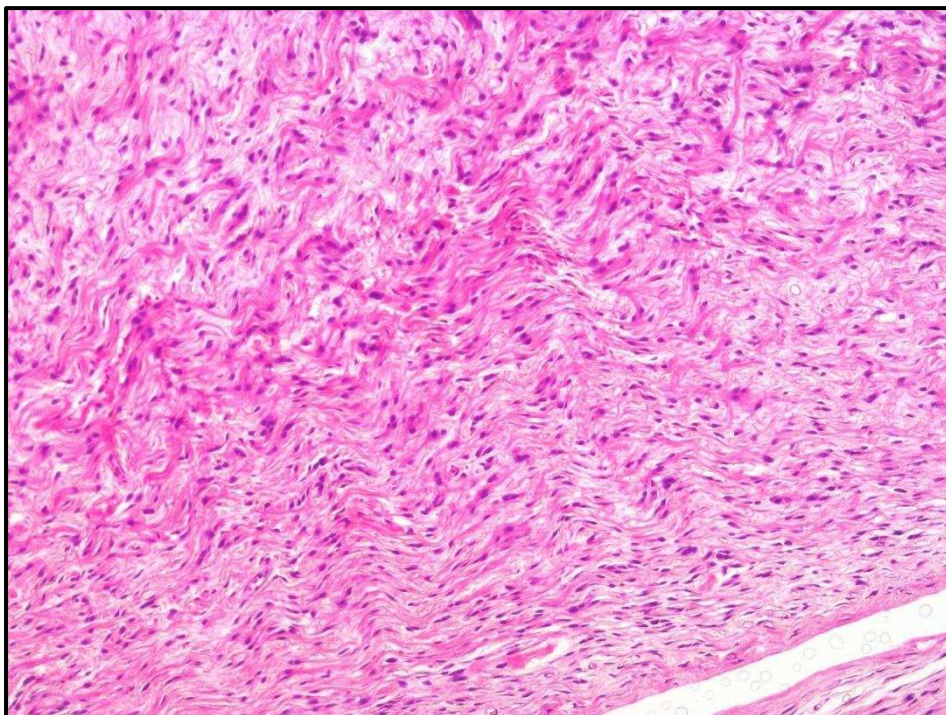


Figura 5. Sarcoma de tecidos moles em cão, com características histopatológicas de tumor de bainha de nervo periférico: redemoinhos e arranjo estoriforme, na ausência de padrão perivascular (coloração em Hematoxilina & Eosina - HE, 100x)

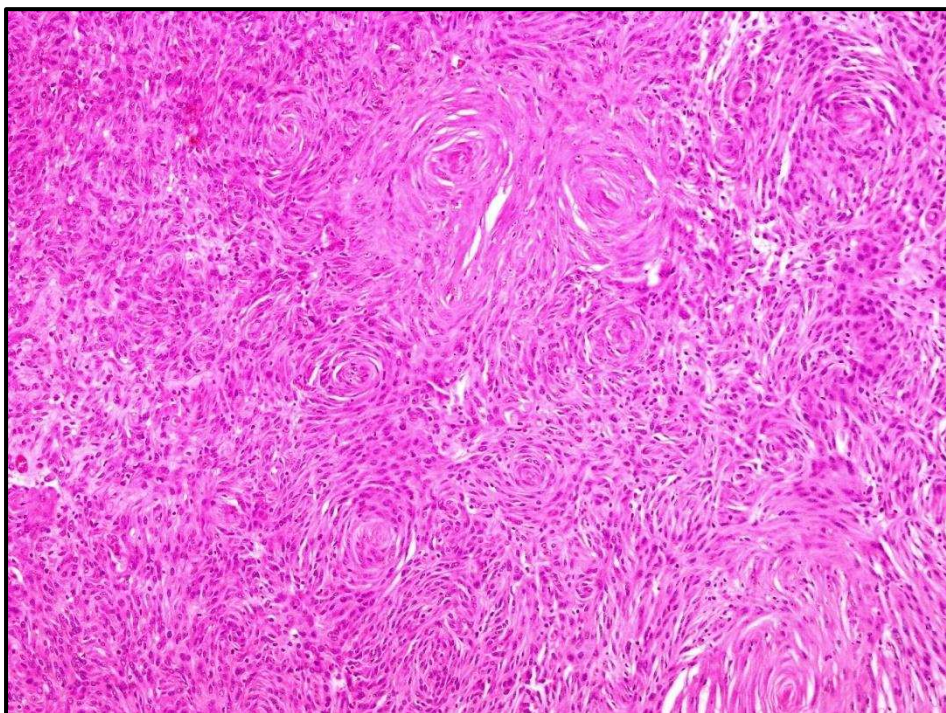
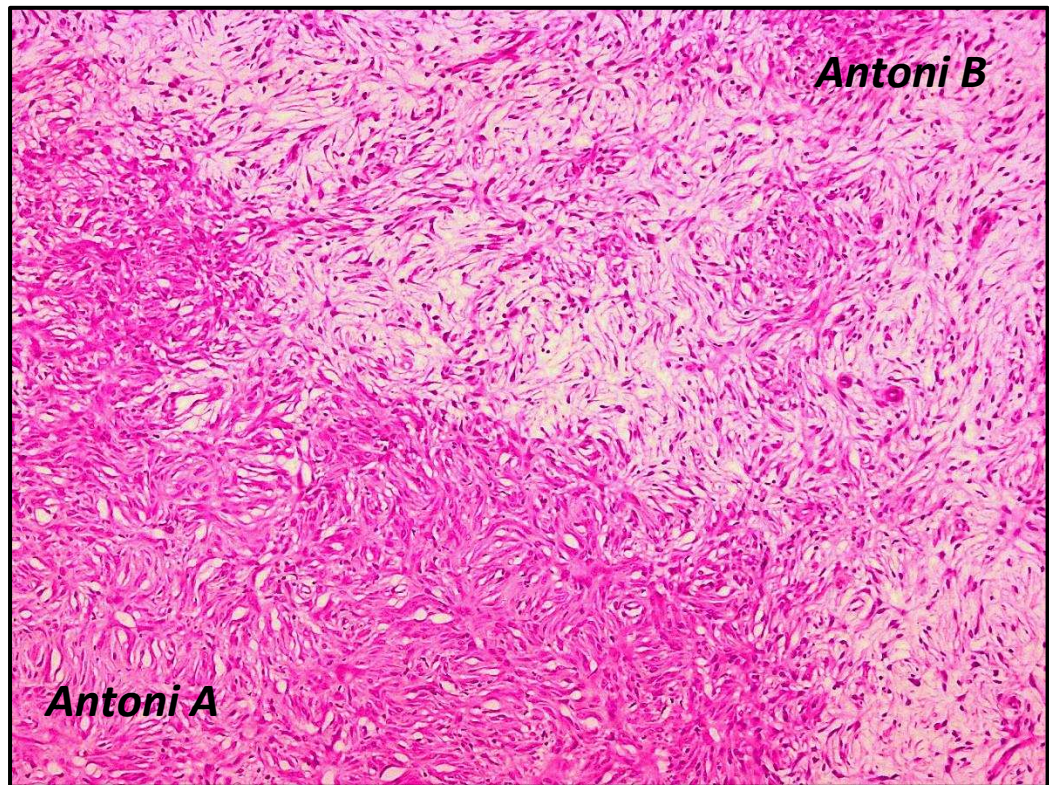


Figura 6. Sarcoma de tecidos moles em cão com características histopatológicas de tumor de bainha de nervo periférico: área com arranjo *Antoni A* (células densamente organizadas) e *Antoni B* (células em matriz mixoide. Coloração em Hematoxilina & Eosina - HE, 100x)



4.3. Imuno-histoquímica

Dos 80 casos, 65 (81,25%) foram positivos exclusivamente para marcadores neurais, sendo então classificados, agora com base em critérios imuno-histoquímicos, como tumor de bainha de nervo periférico (figuras 7, 8, 9, 10).

Figura 7. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcação para CD56
(400x)

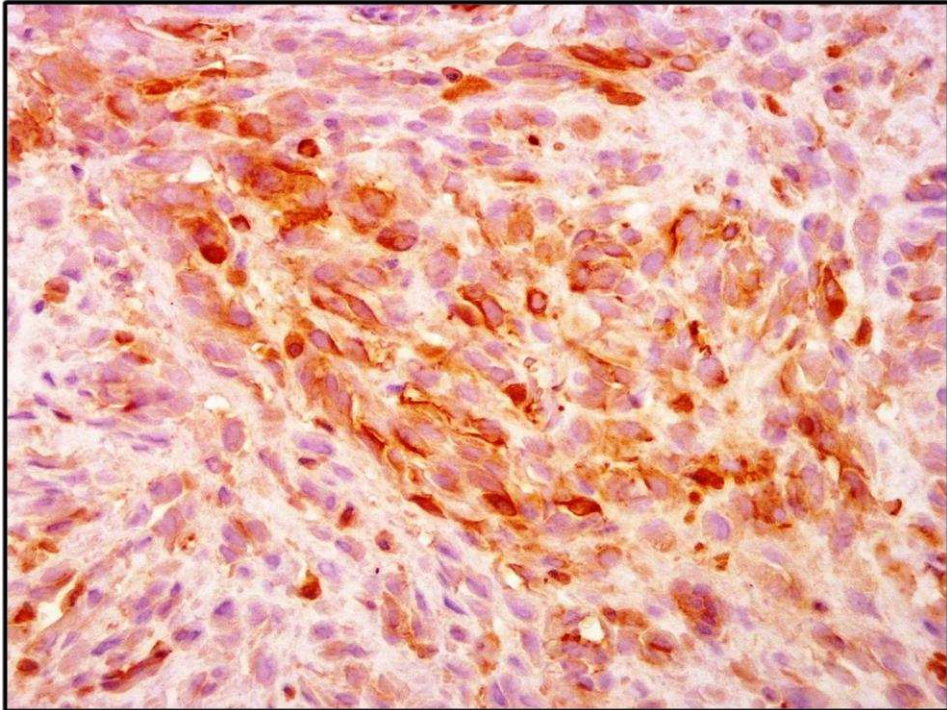


Figura 8. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcação para GFAP
(400x)

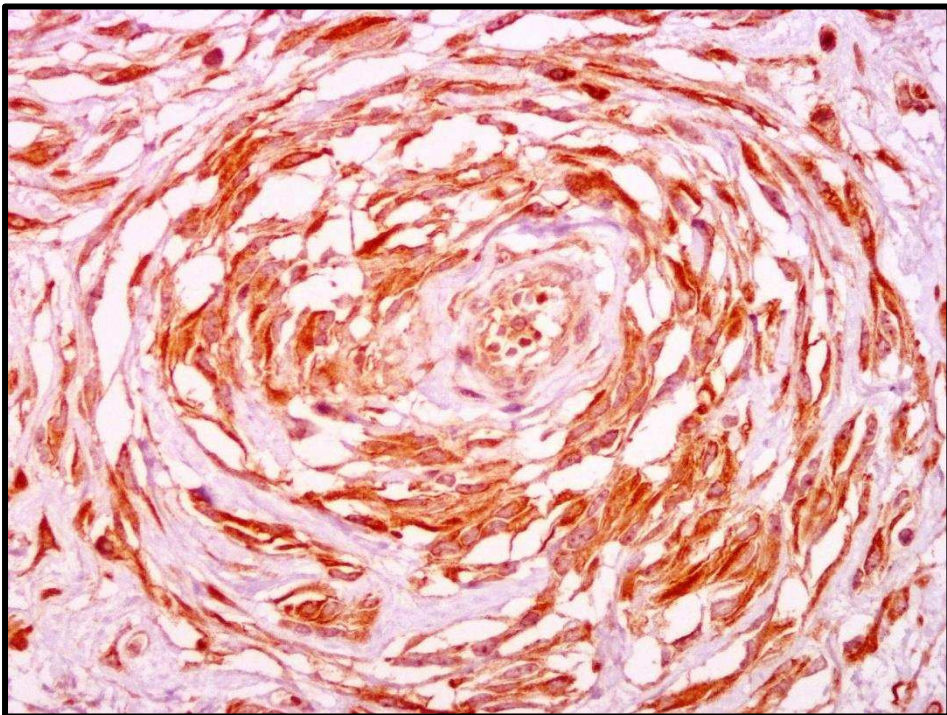


Figura 9. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcacão para S100 (400x)

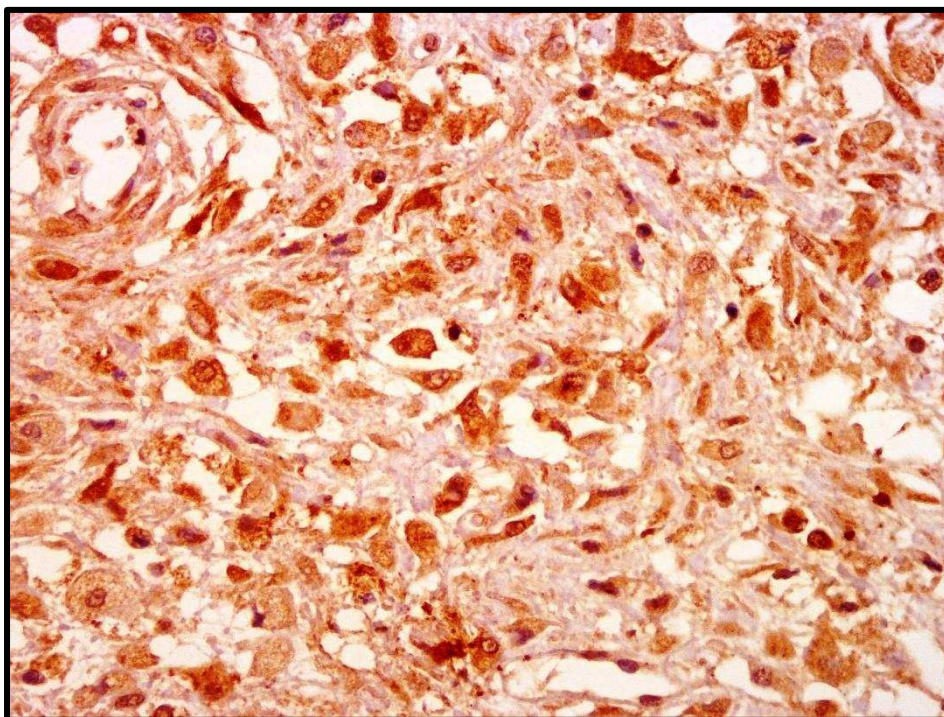
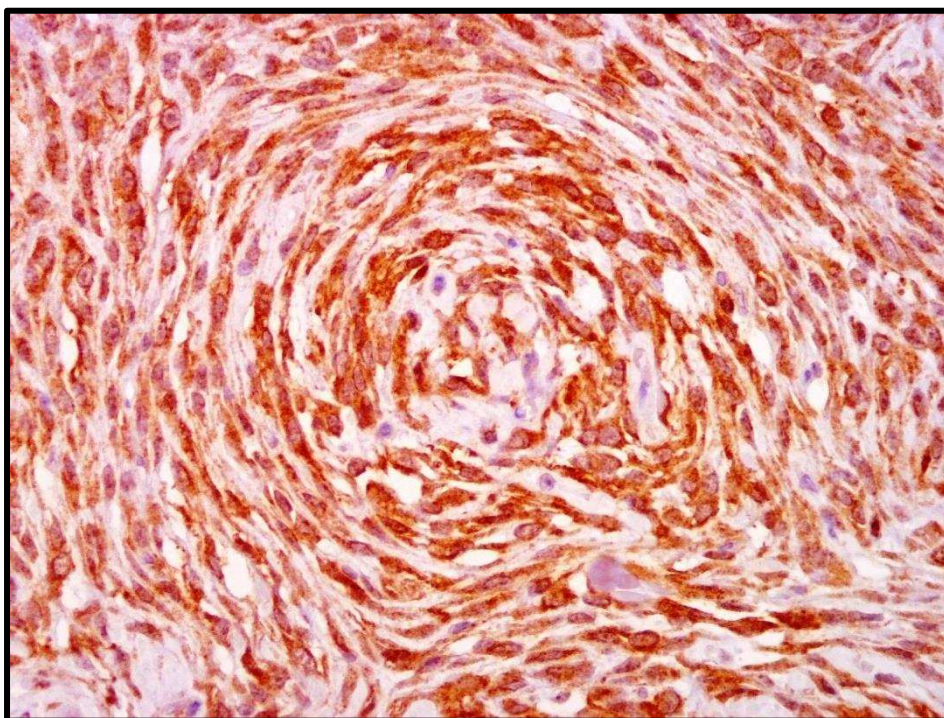


Figura 10. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcacão para NSE (400x)



Os demais 15 casos (18,75%) apresentaram padrão misto de imunomarcação, exibindo positividade tanto para marcadores neurais, quanto para marcadores de musculatura lisa; desmina e actina de músculo liso (figuras 11 e 12). Nenhum dos sarcomas estudados demonstrou exclusivamente positividade para os marcadores desmina e actina de músculo liso. Todos os casos foram negativos para Fator de Von Willebrand.

Figura 11. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcação para desmina (400x)

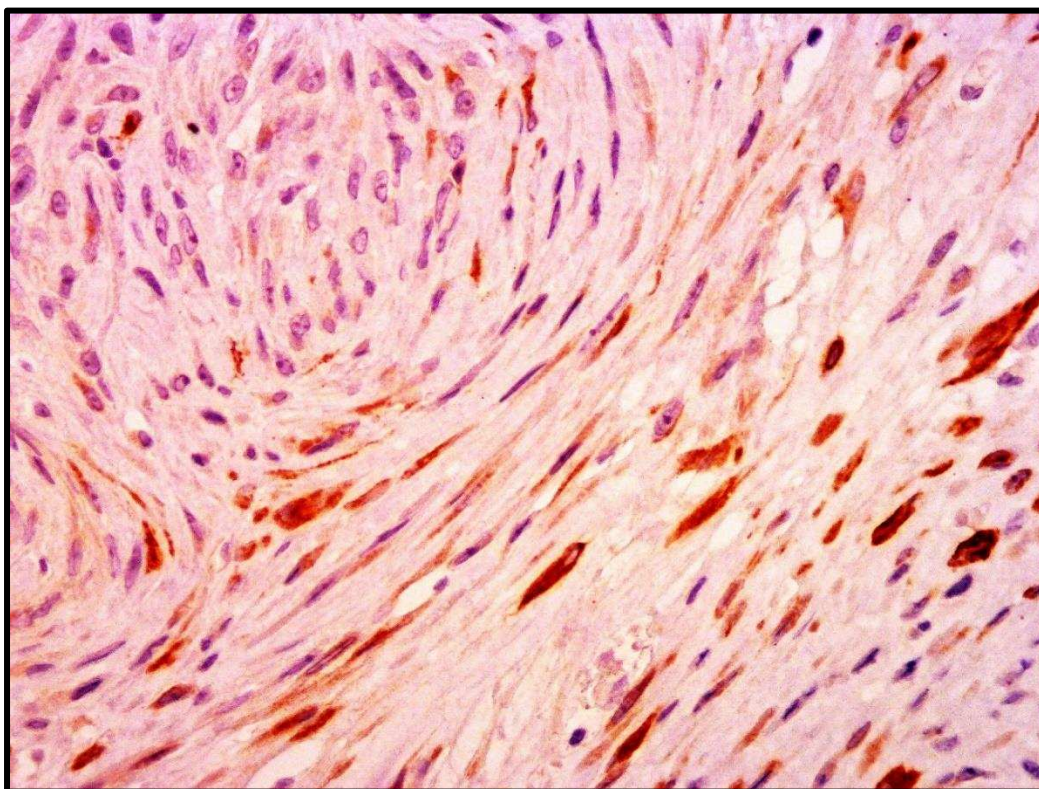
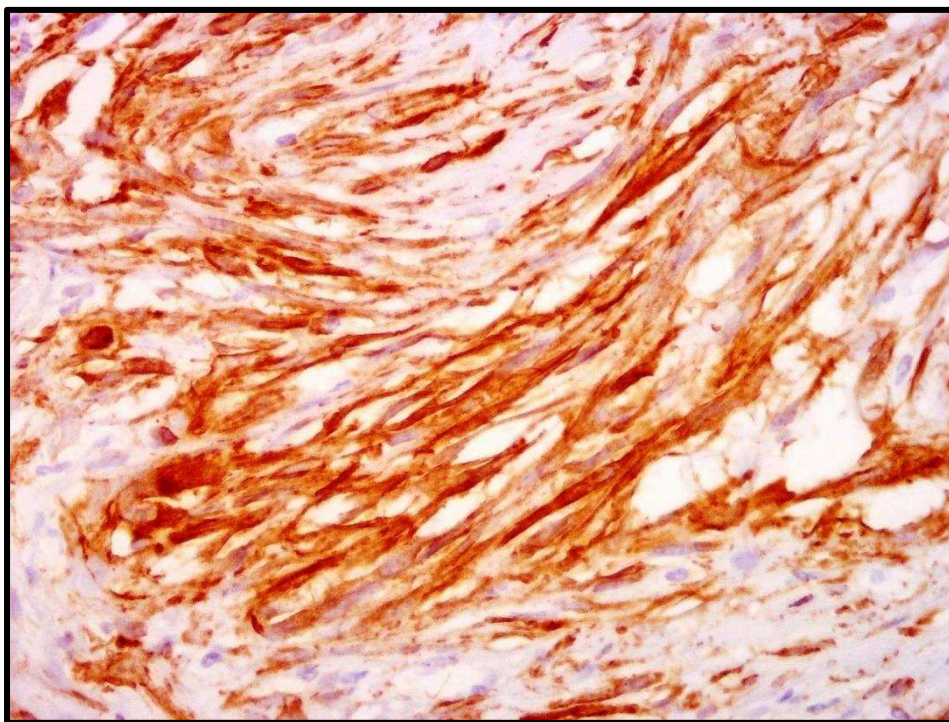
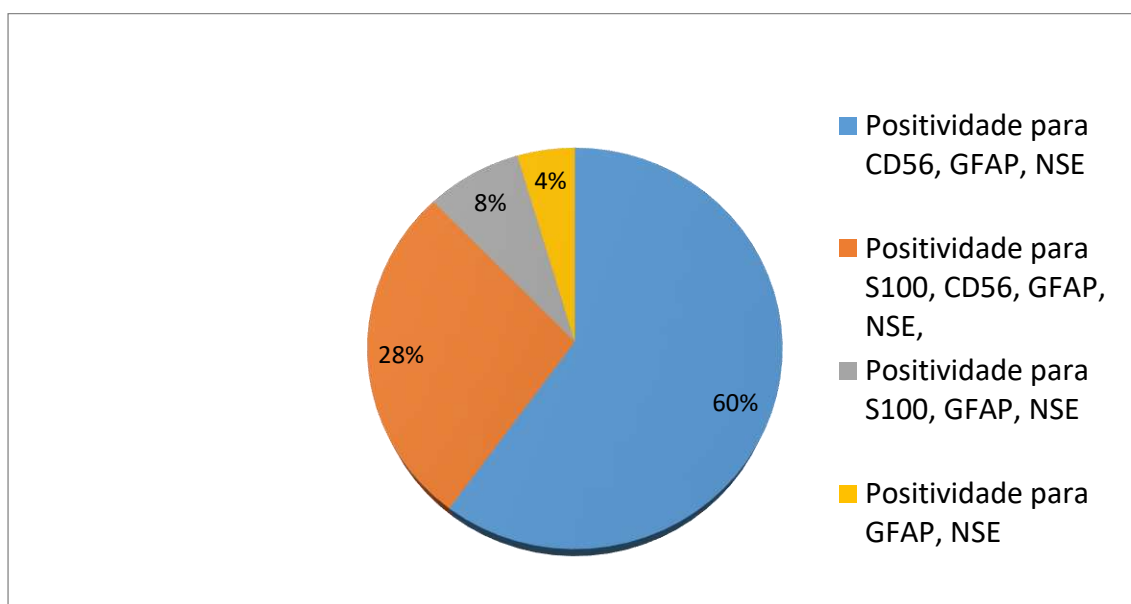


Figura 12. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcação para actina de músculo de liso (400x)



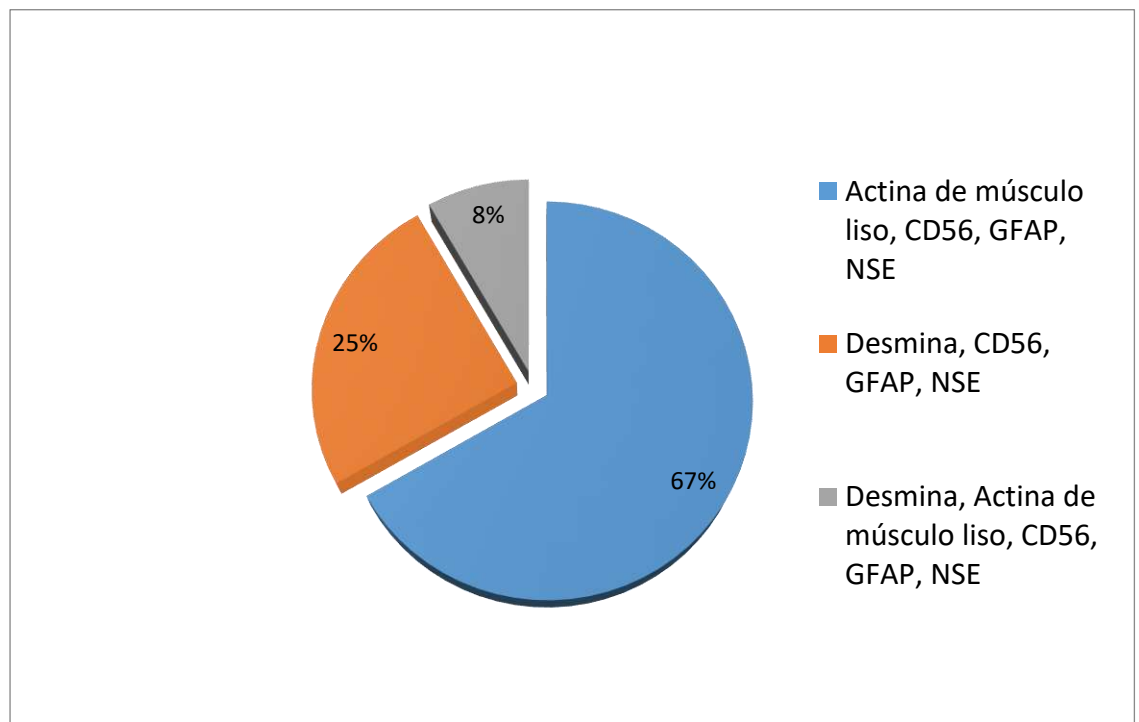
A positividade para os marcadores neurais variou entre os tumores de bainha de nervo periférico, predominando a imunomarcação simultânea para CD56, GFAP e NSE (figura 13).

Figura 13. Imuno-histoquímica dos tumores de bainha de nervo periférico: percentual de positividade para os marcadores neurais (n=65)



Para os tumores de histogênese mista, prevaleceu a positividade concomitante para actina de músculo liso, CD56, GFAP e NSE (figura 14).

Figura 14. Imuno-histoquímica dos tumores com histogênese mista: percentual de positividade para marcadores neurais, desmina e actina de músculo liso (n=15)



A relação entre o diagnóstico realizado apenas com base nos critérios histomorfológicos e os achados imuno-histoquímicos revela que grande parte dos casos com diagnóstico histopatológico prévio de tumor de parede perivascular apresentou imunomarcção apenas para marcadores neurais (tabela 3).

Tabela 3. Imunomarcção de STM em cães e diagnóstico histopatológico prévio

Imunomarcção	Diagnóstico histopatológico prévio				Total
	Tumor de bainha	Tumor de parede	Tumores com característica histopatológica mista	Tumores indiferenciados	
<i>Somente marcadores Neurais</i>	20	19	20	06	65
<i>Marcadores neurais e musculares (tumores IHQ mista)</i>	03	02	07	03	15
Total	23	21	27	09	80

Ademais, dos 27 casos que compartilharam arranjos histopatológicos de tumor de bainha de nervo periférico e tumor de parede perivascular, em apenas sete casos houve imunomarcção simultânea para marcadores neurais e musculares.

Todos os 80 casos analisados exibiram imunomarcção nuclear positiva para RP (figuras 15 e 16).

Figura 15. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcação nuclear positiva para RP em redemoinhos pericapilares, na maior parte da população celular (400x)

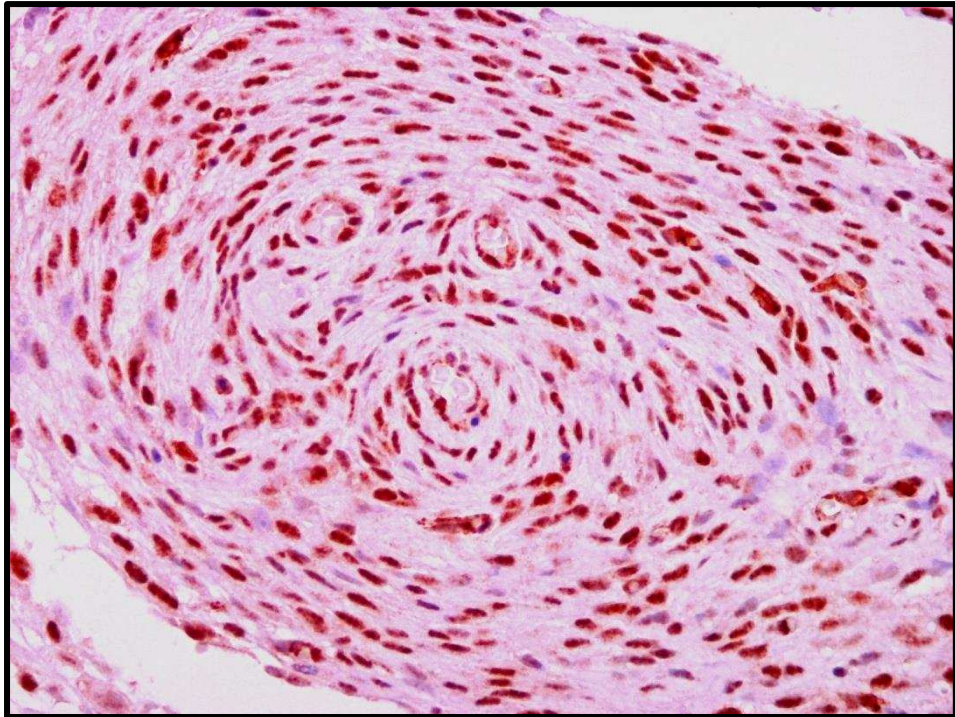
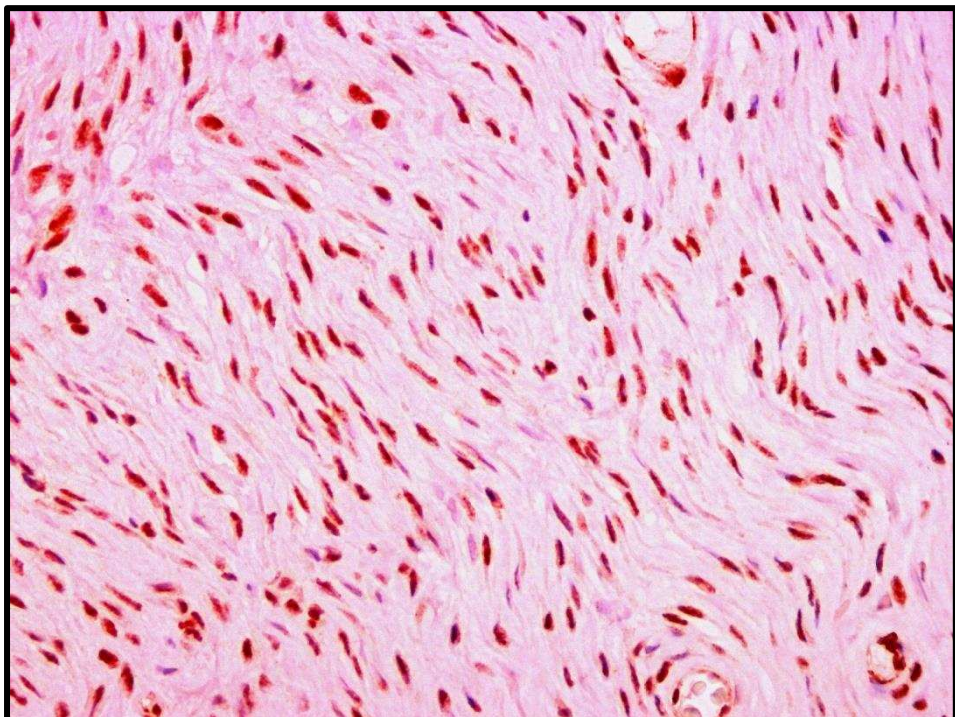


Figura 16. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcação nuclear positiva para RP em feixes ondulantes (400x)



A maioria dos tumores apresentou positividade em no mínimo 66% das células tumorais (escore 3) (figura 17). Este padrão se repetiu quando a positividade para RP foi analisada dentro de cada grau histológico (figura 18).

Figura 17. Percentual de casos nos diferentes escores (E1, E2 e E3) de expressão de RP nos STM em cães (n=80). E1 - positividade em 1-33% das células; E2 - positividade em 34-66% das células; E3 - positividade em 67-100% das células

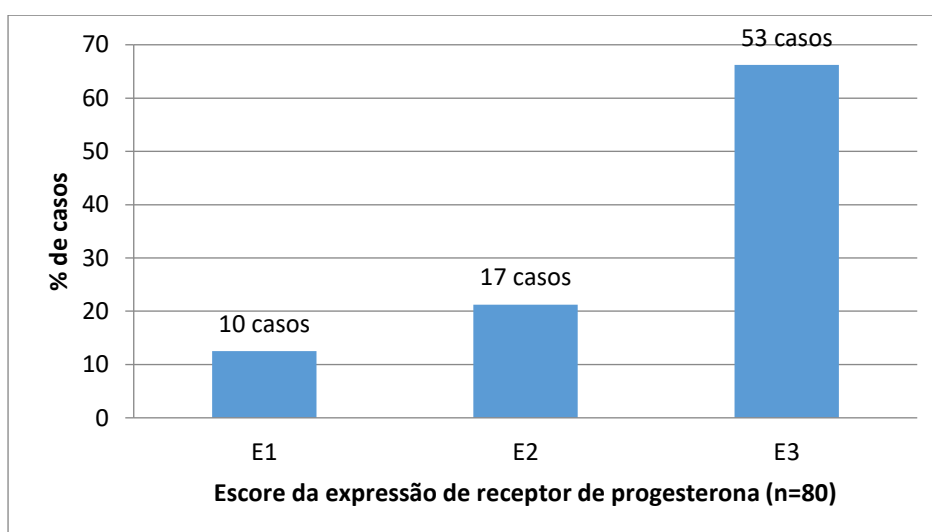
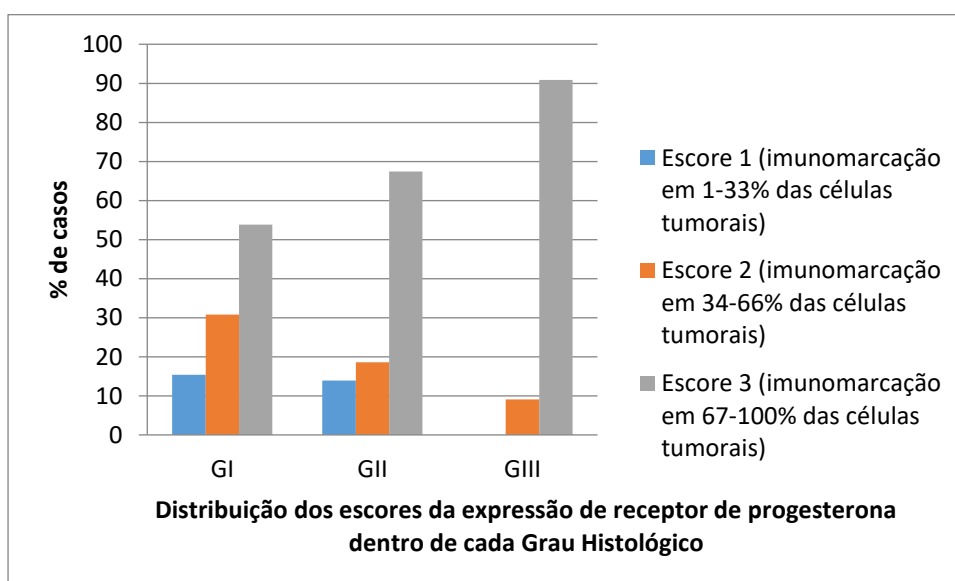


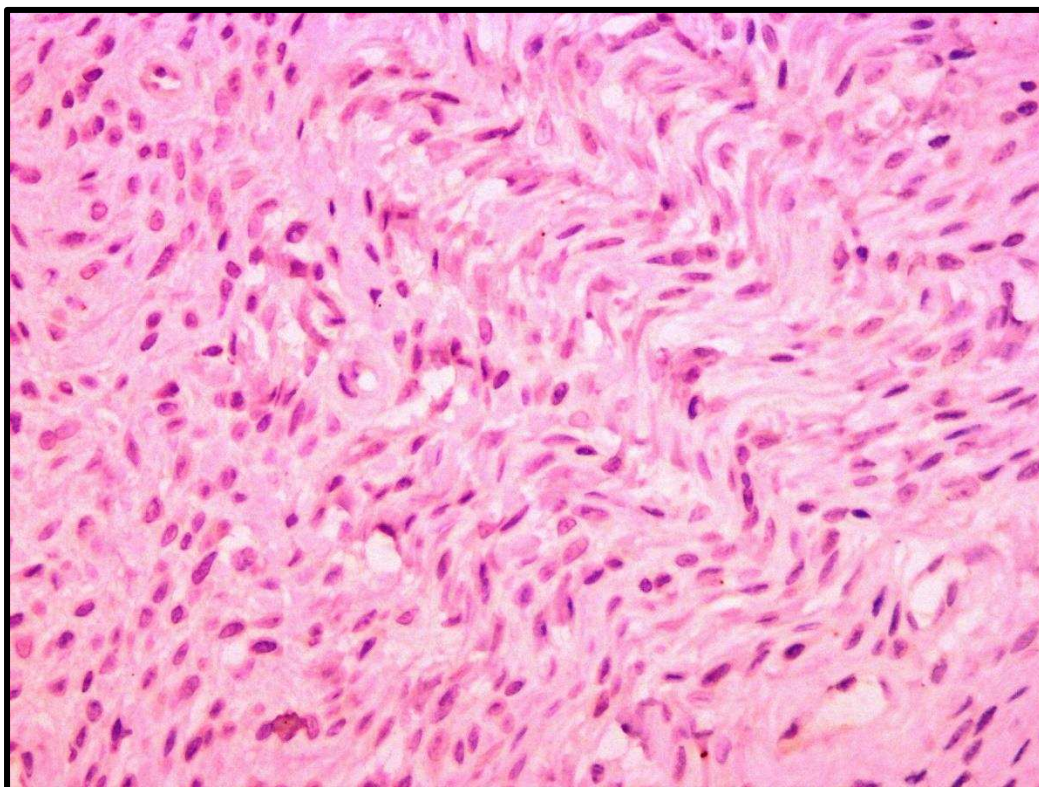
Figura 18. Percentual dos diferentes escores de expressão de RP nos diferentes graus histológicos (GI, GII, GIII) de STM em cães



Em 26 casos (32,55%) pode-se identificar feixes nervosos no tecido circunjacente à neoplasia e todos eles foram negativos para RE e apresentaram ausência ou fraca positividade para RP.

Todos os 80 casos foram negativos para RE (figura 19).

Figura 19. Sarcoma de tecidos moles em cão. Imunomarcção nuclear negativa para RE (400x).



Houve diferença entre os graus histológicos dos tumores em relação à expressão de RP. Tumores de grau III exibiram maior expressão deste receptor que os tumores de grau I ($P=0,015$). A mesma diferença ocorreu quando os tumores de grau I e II foram agrupados e comparados aos de grau III ($P=0,028$). Não houve diferença entre os tumores de grau I e grau II ($P=0,16$) e grau II e III ($P=0,054$).

Também se observou diferença entre os escores atribuídos à atividade mitótica em relação à expressão de RP. Tumores com escore 1 para atividade mitótica exibiram menor expressão deste receptor que os tumores com escore 2 ($P=0,011$) e que os tumores com escore 3 ($P=0,018$). Não houve diferença entre os tumores com atividade mitótica escore 2 e escore 3 ($P=0,39$).

Houve correlação positiva entre o índice de proliferação celular (ki67) e a expressão de RP ($P=0,05$).

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de tumor de parede perivascular e tumor de bainha de nervo periférico é desafiante na medicina veterinária, tendo em vista que muitos destes tumores compartilham padrões variados de imunomarcacão, além de apresentarem semelhanças histopatológicas (Williamson et al., 1998).

No presente estudo, todos os casos foram positivos para marcadores neurais, não sendo possível identificar tumores exclusivamente de origem perivascular, como em trabalhos prévios (Avallone et al., 2007). Além disso, dos casos que apresentavam padrões histopatológicos vasculares, em uma minoria houve positividade para actina de músculo liso e / ou desmina, o que mostra a inespecificidade destes padrões e sua pouca utilidade para o diagnóstico morfológico de tumor de parede perivascular. A maioria dos casos provou ser tumor de bainha de nervo periférico, com negatividade para desmina e actina de músculo liso e positividade apenas para marcadores neurais. A positividade simultânea para marcadores musculares e neurais, confirma o fato de que alguns sarcomas apresentam células de diferentes linhagens (Williamson et al., 1998).

Em uma série de 33 casos de STM com características de tumor de bainha de nervo periférico, a imunomarcacão para GFAP foi detectada apenas em células multinucleadas e o uso do marcador NSE foi limitado devido à presença de fundo (Gaitero et al., 2008). Aqui, todos os 80 casos foram positivos para GFAP e NSE (com marcação difusa na maioria), que se mostram, então, marcadores uteis para o diagnóstico de STM canino. Assim como nos resultados aqui apresentados, outros autores também relataram em hemangiopericitomas a imunoreatividade para marcadores neurais (S100, GFAP e NSE), em associação à positividade para actina de músculo liso (Perez et al., 1996; Chijiwa et al., 2004). Isto corrobora o fato de que entre os STM caninos há um grupo de tumores com histogênese mista e que não deveriam ser classificados puramente como hemangiopericitomas ou como tumores de parede perivascular.

A positividade para RP, em todos os casos e em grande extensão tecidual, aponta para a possível participação da progesterona no desenvolvimento destes sarcomas. Ademais, a negatividade ou a fraca imunomarcacão para RP nos feixes nervosos normais peritumorais revela que as células neoplásicas superexpressam este receptor, o que enfatiza seu possível envolvimento na

patogênese desta neoplasia. A maior expressão de RP em sarcomas de alto grau de malignidade (grau III) e naqueles com alta atividade mitótica mostra que este hormônio também pode estar relacionado à maior agressividade do tumor. Em concordância, o Ki67 (proteína nuclear associada à proliferação celular, expressada em todas as células em fase ativa do ciclo celular - Ettinger et al., 2006), correlacionou-se positivamente com a expressão de RP.

A progesterona é um hormônio esteroide cujas principais funções fisiológicas estão relacionadas ao desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutivo, mas também são conhecidos seus efeitos em neoplasias hormônio-dependentes, como as da glândula mamária (MacLaughlin & Jacks, 2003; Millanta et al., 2005). A ação da progesterona nos tecidos é mediada pelo receptor para progesterona (pertencente à família de receptores nucleares), presente sob as isoformas A e B (MacLaughlin & Jacks, 2003; Chabbert-Buffet et al., 2005). Recentemente, também foram identificados receptores de membrana para progesterona, cujas funções, ainda pouco conhecidas, podem estar relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias (Schumacher et al., 2008; Cahill et al., 2016). De um modo geral, a isoforma B age como ativadora da transcrição e a isoforma A como repressora (MacLaughlin & Jacks, 2003; Chabbert-Buffet et al., 2005). Assim, a ligação do hormônio ao seu receptor inicia uma série de eventos celulares que resultam na ativação ou supressão de genes alvo (Geller et al., 2008; Patel et al., 2008).

Deve ser ressaltado que as funções da progesterona vão muito além daquelas relacionadas à reprodução. Em relação ao sistema nervoso, este hormônio estimula a mielinização do axônio durante o desenvolvimento e remielinização após lesão (Schumacher et al., 2008). As células de Schwann expressam RP e sintetizam progesterona em resposta a sinais neuronais (Patel et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que as células de Schwann derivadas de neurofibromas apresentaram elevada proliferação na presença deste hormônio esteroide (Overdiek et al., 2008). Aqui, todos os casos foram positivos para marcadores imuno-histoquímicos neurais e possivelmente as células de Schwann sejam o principal componente celular destes sarcomas. Isto explica a presença de RP em grande parte da população celular, como também a sua possível participação na proliferação celular. A lesão do nervo periférico poderia ser um fator iniciador da proliferação das células de Schwann que, assim

como sugerido para neurofibromas em humanos, responderiam à progesterona sérica e à progesterona sintetizada por essas células (McLaughlin et al., 2003).

Comparativamente, os STM deste estudo compartilharam, com algumas variações, semelhanças clínicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas com as neoplasias em humanos, como schwanoma, neurofibroma e tumor maligno da bainha de nervo periférico. Nesse sentido, a influência dos hormônios sexuais esteroides no crescimento do neurofibroma e schwanoma vestibular é bem documentada, com maior prevalência em mulheres. Nesses casos, observam-se aumento no tamanho, número de lesões ou transformação maligna, durante períodos de alterações hormonais, particularmente na puberdade e gestação (Jaiswal et al., 2009; Brown et al., 2011; Geller et al., 2008; Patel et al., 2008). Informações sobre o estado reprodutivo dos animais (p. ex. fêmeas não castradas ou castradas; período do ciclo estral) poderiam ser úteis para a compreensão da relação entre o desenvolvimento destas neoplasias e a condição hormonal.

Ainda em paralelo com a medicina humana, os neurofibromas apresentaram difusa imunomarcagem para RP e raramente positividade para RE (McLaughlin & Jacks, 2003; Geller et al., 2008), em conformidade com o padrão aqui encontrado. Nos schwanomas vestibulares os resultados foram variados, bem como a metodologia empregada. A análise de imuno-histoquímica em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina revelou, em um dos estudos, negatividade para RE e RP em todos os 100 pacientes com schwanomas (Jaiswal et al., 2009). Em outro estudo, com 59 pacientes, todos exibiram positividade para RP e negatividade para RE (Cafer et al., 2008). Em 39 casos avaliados por PCR, houve variável super-regulação (“up-regulation”) para RE e RP (Patel et al., 2008). Aparentemente, o RE não participou do crescimento e proliferação de vários destes tumores (McLaughlin & Jacks, 2003; Cager et al., 2008; Geller et al., 2008; Jaiswal et al., 2009). Em contrapartida, em STM de diferentes histogêneses, localizados nas extremidades, a positividade para RE foi observada em 30% de 89 casos (Valkov et al., 2011). É possível que existam variações entre espécies, indivíduos, tipo histológico ou mesmo entre os estágios do desenvolvimento da neoplasia (mais ou menos diferenciados).

A presença de RE ou RP mostrou impactos diversos na sobrevida de pacientes com STM em humanos. Os pacientes com o perfil imuno-histoquímico

semelhante ao desse estudo (RE negativo e RP positivo) apresentaram sobrevida reduzida (Valkov et al., 2011; Sorbye et al., 2013). Quando cada sexo foi analisado separadamente, a presença de RE foi um fator prognóstico positivo para mulheres, enquanto a expressão de RP em homens foi associada com prognóstico ruim e redução da sobrevida (Valkov et al., 2011). Os pacientes com leiomiossarcomas uterinos e extra-uterinos que expressaram RP e RE exibiram melhor evolução clínica (Ioffe et al., 2009; Li et al., 2013). A natureza retrospectiva deste estudo impossibilitou o seguimento dos animais e a coleta de dados prognósticos (como a qualidade das margens cirúrgicas, presença de recorrência, metástases, intervalo livre de doença e sobrevida dos pacientes). Novas pesquisas, seguindo as recomendações para a condução de estudos prognósticos em veterinária (Webster et al., 2011), poderão avaliar a expressão do RP como um possível marcador molecular preditivo de prognóstico em sarcomas fusocelulares na espécie canina.

Vale ressaltar que as informações sobre a presença e o significado prognóstico de RE e RP em sarcomas humanos são complexas e não totalmente esclarecidas, impossibilitando definir o papel exato destes receptores nestas neoplasias. As múltiplas interações entre as isoformas de RP (A e B) e também com outros receptores (RE, andrógeno, mineralocorticoides) e a associação com co-ativadores e co-repressores representam esta complexidade. Ademais, a expressão de RP pode estar alterada durante a carcinogênese. No câncer endometrial em mulheres foram descritas variações na expressão das isoformas de RP (A e B), com sub ou super-regulação destas isoformas e alterações na localização nuclear, o que pode resultar em diferentes ações da progesterona (Chabbert-Buffet et al., 2005).

A resposta à terapia hormonal também divergiu entre os estudos. Os leiomiossarcomas uterinos e extra-uterinos apresentaram resposta ao tratamento com moduladores seletivos RE ou RP e inibidores de aromatase (Li et al., 2013; Thanopoulou et al., 2014). Os casos de sarcoma estromal endometrial positivos para RP apresentaram resposta terapêutica favorável à progestina (Ioffe et al., 2009; Akashi et al., 2013), enquanto o uso de inibidor de progesterona foi útil no tratamento de leiomiossarcoma uterino (Koivisto-korander et al., 2007). Em condrossarcomas, apesar da expressão de RE e aromatase, não houve benefício com o uso de inibidores de estrógeno, tanto *in*

vitro, quanto *in vivo* (Meijer et al., 2011). Em linhagens celulares provenientes de tumores malignos de nervo periférico, o tamoxifen (um modulador seletivo para RE) inibiu a proliferação e a mitogênese, porém com ação independente de sua ligação ao RE (Byer et al., 2011). Dessa forma, tudo indica que diferentes tipos histológicos de sarcomas respondem de forma específica ao tratamento hormonal. Essas drogas, especialmente os moduladores seletivos de RP, poderão representar uma nova abordagem terapêutica para sarcomas caninos, diminuindo a chance de recorrências e metástases, melhorando o tempo de sobrevida e aumentando o tempo livre de recidivas.

A análise imuno-histoquímica em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina pode apresentar limitações, principalmente em relação aos receptores de estrógeno; o tempo e a qualidade da fixação, assim como outras variáveis, podem interferir diretamente no resultado (Ramos-Vara & Miller, 2014). A fixação do material do presente estudo não foi controlada, o que poderia ser responsável pela negatividade para RE. Por outro lado, contrária a esta hipótese, está o fato de todos os casos terem sido negativos, considerando que sempre foi utilizado um controle positivo.

Os resultados em relação ao tamanho e localização das neoplasias, assim como a distribuição entre os sexos, não diferiram dos descritos na literatura. A predisposição da raça Husky Siberiano também já foi referida para os hemangiopericitomas, mas a raça maltês não foi citada em estudos anteriores. O maior risco citado para outras raças (Golden Retriever, Irish Setter, Pastor Alemão) e cães sem raça definida (SRD) não foi observado no presente trabalho (Goldschmidt & Shofer, 1992).

6. Conclusões

Concluindo, nesta série de STM canino a maioria mostrou ser tumor de bainha de nervo periférico. Tumores puramente de origem perivascular não foram identificados. Os padrões histopatológicos tipo perivascular não refletiram a histogênese destas neoplasias, que na maior parte das vezes mostrou-se negativa para os marcadores musculares e positiva para os marcadores neurais. Também ficou clara a presença de um grupo de STM apenas com histogênese neural e outro com histogênese mista.

Os STM estudados foram positivos para RP e negativos para RE. Os sarcomas de grau histológico III e com atividade mitótica maior que 9 figuras mitóticas/10 campos de grande aumento exibiram maior expressão de RP.

7. Perspectivas futuras

Devido à heterogeneidade imuno-histoquímica e a pouca especificidade histopatológica para os tumores de parede perivascular e de bainha de nervo periférico, atualmente não são claros os critérios para o diagnóstico destes sarcomas. Sem dúvida, este é um fator limitante para a comparação entre os estudos e a identificação de diferenças no prognóstico. Trabalhos de consenso poderão propor orientações para a nomenclatura dessas neoplasias.

No tocante à presença de RP nos sarcomas, novas pesquisas poderão definir se os moduladores seletivos de receptor de esteroides representam uma nova modalidade no controle da doença, bem como estabelecer o valor de RP como preditivo de prognóstico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, D.; TODO, Y.; SHIMADA, C.; OKAMOTO, K.; MINOBE, S.; KATO, H. Successful use of dydrogesterone as maintenance therapy in recurrent endometrial stromal sarcoma: a case report. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.43, p.1145-1149, 2013.

AVALLONE, G.; HELMBOLD, P.; CANIAATI, M.; STEFANELLO, D.; NAYAK, R, C.; ROCCABIANCA, P. The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. **Veterinary Pathology**, v.44, p.607-620, 2007.

AVALLONE, G.; BORACCHI, P.; STEFANELLO, D.; FERRARI, R.; REBUGHINI, A.; ROCCABIANCA, P. Canine perivascular wall tumors: high prognostic impact of site, depth, and completeness of margins. **Veterinary Pathology**, v.51, p.713-721, 2014.

BROWN, C.M.; AHMAD, Z.K.; RYAN, A.F; DOHERTY, J.K. Estrogen receptor expression in sporadic vestibular schwannomas. **Otol Neurotol**, v.32, p.158-162, 2011.

BYER, S.J.; ECKERT, J.M.; BROSSIER, N.M.; CLODFELDER-MILLER, B.J.; TURK, A.N.; CARROLL, A.J.; KAPPES, J.C.; ZINN, K.R.; PRASAIN, J.K.; CARROL, L.S. Tamoxifen inhibits malignant peripheral nerve sheath tumor growth in an estrogen receptor-independent manner. **Neuro Oncology**, v.13, p.28-41, 2011.

CAFER, S., BAYRAMOGLU, I., UZUM, N., YILMAZ, M., MEMIS, L., & UYGUR, K. Expression and clinical significance of Ki-67, oestrogen and progesterone receptors in acoustic neuroma. **The Journal of Laryngology & Otology**, v.122, 125-127, 2008.

CAHILL, M.A.; JAZAYERI, J.A.; CATALANO, S.M.; TOYOKUNI, S.; KOVACEVIC, Z. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. **Biochimica et biophysica Acta**, 2016.

CHABBERT-BUFFET, N.; MEDURI, G.; BOUCHARD, P.; SPITZ, I.M. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and applications. **Human reproduction update**, v.11, p.293-307, 2005.

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

DENNIS, M.M.; McSPORRAN, K.D.; BACON, N.J.; SCHULMAN, F.Y.; FOSTER, R.A., PWERS, B.E. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. **Veterinary Pathology**, v.48, p.73-84, 2011.

ETTINGER, S.N. Principles of treatment for soft-tissue sarcomas in the dog. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, p.118-122, 2003.

ETTINGER, S.N.; SCASE, T.J.; OBERTHALER, K.T.; CRAFT, D.M.; MCKNIGHT, J.A.; LEIBMAN, N.F.; CHARNEY S.C.; BERGMAN, P.J. Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996-2002). **JAVMA**, v.228, p.1053-1062, 2006.

FISHBEIN, L; ZHANG, X.; FISHER, L.B.; LI, H.; THOMPSON, M.C.; YACHNIS, A., RUBENSTEIN, A.; MUIR, D.; WALLACE, M.R. In vitro studies of steroid hormones in neurofibromatosis 1 tumors and Schwann cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.46, p.512-523, 2007.

GAITERO, L.; AÑOR, S.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. Canine cutaneous histopathological and immunohistochemical study. **J. Comp. Path**, v.139, p.16-23, 2008.

GELLER, M. et al. Progesterone and estrogen receptors in neurofibromas of patients with NF1. **Clinical Medicine**, v.1, p.93-97, 2008.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFR, F.S. **Skin tumors of the dog and cat**. 1. ed. Great Britain: Pergamon Press, 1992. 316p.

GEORGE, S. et al. Phase 2 trial of aromatase inhibition with letrozole in patients with uterine leiomyosarcomas expressing estrogen and / or progesterone receptors. **Cancer**, v.1, p.738-743, 2014.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis**. 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. 932p.

IOFFE, Y.J.; LI, A.J.; WALSH, C.S.; KARLAN, B.Y.; LEUCHTER, R.; FORSCHER, C.; CASS, I. Hormone receptor expression in uterine sarcomas:

prognostic and therapeutic roles. **Gynecologic Oncology**, v.115, p.466-471, 2009.

JAISWAL, S.; AGRAWAL, V.; JAISWAL A.K.; PANDEY, R.; MAHAPATRA, A.K. Expression of estrogen and progesterone receptors in vestibular schwannomas and their clinical significance. **Journal of negative results in biomedicine**, v.8:9, 2009.

KOIVISTO-KORANDER, R.; LEMINEN, A.; HEIKINHEIMO, O. Mifepristone as treatment of recurrent progesterone receptor-positive uterine leiomyosarcoma. **Obstetrics & Gynecology**, v.109, p.512-514.

LI, L.; SCHUSTER, I.P.; JACOB, R.; HUPART, K.H.; GOTLIEB, V. Potential benefit of hormonal therapy for non-uterine soft tissue sarcoma (STS) – a case report and literature review. **Springerplus**, v.2, p.536-539, 2013.

McLAUGHLIN, M.E.; JACKS, T. Progesterone receptor expression in neurofibromas. **Cancer Research**, v.63, p.752-755, 2003.

McSPORRAN, K.D. Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas. **Veterinary Pathology**, v.46, p.928-933, 2009.

MEIJER, D.; GELDERBLOM, H.; KARPERIEN, M.; CLETON-JANSEN, A-M.; HOGENDOORN, P.C.W.; BOVEE, J.V.M.G. Expression of aromatase and estrogen receptor alpha in chondrosarcoma, but no beneficial effect of inhibiting estrogen signaling both *in vitro* and *in vivo*. **Clinical Sarcoma Research**, v.1(5), p.1-0, 2011.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G.; NICCOLINI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in veterinary science**, v.79, p.225-232, 2005.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. **Veterinary record**, v.158, p.821-824, 2006.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. **Muller & Kirk's Small animal dermatology**. 7. ed. St. Louis: Elsevier, 2013. 938p.

OVERDIEK, A.; WINNER, U.; MAYATEPEK, E.; THORSTEN, R. Schwann cells from human neurofibromas show increased proliferation rates under the influence of progesterone. **Pediatric research**, v.64, p.40-43, 2008.

PATEL, A.K.; ALEXANDER, T.H.; ANDALIBI, A.; RYAN, A.F.; DOHERTY, J.K. Vestibular schwannoma polymerase chain reaction expression of estrogen and progesterone receptors. **Laryngoscope**, v.118, p.1458-1463, 2008.

PEREZ, J.; BAUTISTA, M.J.; ROLLON, E.; LARA, F.C.; CARRASCO, L.; MULAS, J.M. Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. **Veterinary Pathology**, v.33, p.391-397, 1996.

RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. **Veterinary Pathology**, v.5, p.42-87, 2014.

SCHUMACHER, MICHAEL; SITRUK-WARE, REGINE; DE NICOLA, ALEJANDRO F. Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. **Current opinion in pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 740-746, 2008.

SISTEMA de análise estatística e genética (**SAEG**), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.

SORBYE, S.W.; KILVAER, T.K.; VALKOV, A.; DONNEM, T.; SMELAND, E.; AL-SHIBLI, A.; NREMNES, R.M.; BUSUND, L.T. Prognostic impact of Skp2, ER and PFR in male and female patients with soft tissue sarcomas. **BMC Clinical Pathology**, v.13, 2013.

STEFANELLO, D.; AVALLONE, G.; FERRARI, R.; ROCCABIANCA, P.; BORACCHI, P. Canine cutaneous perivascular wall tumors at first presentation: clinical behavior and prognostic factors in 55 cases. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.1398-1405, 2011.

THANOPOULOU, E.; THWAY, K.; KHABRA, K.; JUDSON, I. Treatment of hormone positive uterine leiomyosarcoma with aromatase inhibitors. **Clinical Sarcoma research**, v.4, p.1-8, 2014.

VAIL, D.M.; McEWEN, E.G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Investigation**, v.18, p.781-792, 2000.

VALKOV, A.; SOBYE, S.; KILVAER, T.K.; DONNEM, T.; SMELAND, E.; BREMNES, R.M.; BUSUND, L.T. Estrogen receptor and progesterone receptor are prognostic factors in soft tissue sarcomas. **International Journal of Oncology**, v.38, p.1031-1040, 2011.

WEBSTER, J.D. et al. Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. **Veterinary Pathology**, v.48, p.7-18, 2011.

WILLIAMSON, M.M.; MIDDLETON, D.J. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation and histogenesis. **Veterinary Dermatology**, v.9, p.43-48, 1998.

YAGER, J.A.; WILCOCK, B.P. **Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat: dermatopathology and skin tumors**. London: Wolfe Publishing, 1994. 320p.

Anexo 1

Análise dos Graus Histológicos em relação aos Escores de positividade para receptor de progesterona. Onde **G** é o grau histológico do tumor (GI, GII, GIII – Dennis et al., 2011) e **E** é o escore de células positivas para receptor de progesterona (E1 – positividade em 1-33% das células, E2 – positividade em 34-66% das células e E3 – positividade em 67-100% das células).

	E1	E2	E3	Total
GI	4	8	14	26
GII	6	8	29	43
GIII	0	1	10	11

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
GC	1.000000	2.000000	0	69
EC	1.000000	3.000000	0	69

Observações Gravadas: 69

Variáveis Totais: 2

Valores Perdidos: 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = EC

Independentes = GC

Teste de Wilcoxon

Variável=EC

GC	Descrição	Médias	Dados
1	-----	2.38462	26
2	-----	2.53488	43

Valor do Teste = 0.97712

Variância = 4843.11768

Significancia = 0.16426

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
GC	1.000000	3.000000	0	37
EC	1.000000	3.000000	0	37

Observações Gravadas: 37

Variáveis Totais: 2

Valores Perdidos: 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = EC

Independentes = GC

Teste de Wilcoxon

Variável=EC

GC	Descrição	Médias	Dados
1	-----	2.38462	26
3	-----	2.90909	11

Valor do Teste = 2.16598

Variância = 644.78827

Significancia = 0.01516

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
GC	2.000000	3.000000	0	54
EC	1.000000	3.000000	0	54

Observações Gravadas: 54

Variáveis Totais: 2

Valores Perdidos: 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = EC

Independentes = GC

Teste de Wilcoxon

Variável=EC

GC	Descrição	Médias	Dados
2	-----	2.53488	43
3	-----	2.90909	11

Valor do Teste = 1.59889

Variância = 1338.67920

Significancia = 0.05493

Anexo 2

Análise dos Graus Histológicos em relação aos Escores de positividade para receptor de progesterona. Onde **G** é o grau histológico do tumor (GI e GII agrupados, GIII) e **E** é o escore de células positivas para receptor de progesterona (E1 – positividade em 1-33% das células, E2 – positividade em 34-66% das células e E3 – positividade em 67-100% das células).

	E1	E2	E3	Total
GI e GII	10	16	43	69
GIII	0	1	10	11

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
GD	1.000000	3.000000	0	80
ED	1.000000	3.000000	0	80

Observações Gravadas... 80
 Variáveis Totais..... 2
 Valores Perdidos..... 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = ED

Independentes = GD

Teste de Wilcoxon

Variável=ED

GD	Descrição	Médias	Dados
1	-----	2.47826	69
3	-----	2.90909	11
Valor do Teste = 1.89829			
Variância = 3574.92603			
Significancia = 0.02883			

Anexo 3

Análise do Índice Mitótico em relação aos Escores de positividade para receptor de progesterona. Onde M é o índice mitótico do tumor (M1 – 0 a 9 figuras mitóticas/10 campos de grande aumento; M2 – 10 a 19 figuras mitóticas/10 campos de grande aumento; M3 – maior que 19 figuras mitóticas/10 campos de grande aumento - Dennis et al., 2011) e E é o escore de células positivas para receptor de progesterona (E1 – positividade em 1-33% das células, E2 – positividade em 34-66% das células e E3 – positividade em 67-100% das células).

	E1	E2	E3	Total
M1	7	13	21	41
M2	3	2	22	27
M3	0	2	10	12

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
MF	1.000000	2.000000	0	68
EF	1.000000	3.000000	0	68

Observações Gravadas: 68

Variáveis Totais: 2

Valores Perdidos: 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = EF

Independentes = MF

Teste de Wilcoxon

Variável=EF

MF	Descrição	Médias	Dados
1	-----	2.34146	41
2	-----	2.70370	27

Valor do Teste = 2.26860

Variância = 4668.18213

Significancia = 0.01165

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
MF	1.000000	3.000000	0	53
EF	1.000000	3.000000	0	53

Observações Gravadas: 53

Variáveis Totais: 2

Valores Perdidos: 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = EF

Independentes = MF

Teste de Wilcoxon

Variável=EF

MF	Descrição	Médias	Dados
1	-----	2.34146	41
3	-----	2.83333	12

Valor do Teste = 2.07589

Variância = 1716.28735

Significancia = 0.01895

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO

Tipo de Leitura - Microsoft Excel

Variáveis	Mínimos	Máximos	Perdidos	Válidos
MF	2.000000	3.000000	0	39
EF	1.000000	3.000000	0	39

Observações Gravadas: 39

Variáveis Totais: 2

Valores Perdidos: 0

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = EF

Independentes = MF

Teste de Wilcoxon

Variável=EF

MF	Descrição	Médias	Dados
2	-----	2.70370	27
3	-----	2.83333	12

Valor do Teste = 0.27327

Variância = 482.06479

Significancia = 0.39233

Anexo 4

Análise da correlação entre Ki67 e o escore de positividade para receptor de progesterona. Onde Ki67 é expresso em % de núcleos positivos em cada caso e E é o escore de células positivas para receptor de progesterona (E1 – positividade em 1-33% das células, E2 – positividade em 34-66% das células e E3 – positividade em 67-100% das células).

Ki67	E
7,94	1
17,26	3
52,96	3
17,05	3
5,73	3
28,63	3
7,54	1
8,99	2
7,52	3
31,69	3
4,89	3
0,58	2
10,71	3
13,24	3
10,77	2
0	2
4,28	3
26,93	3
44,88	3
11,3	2
7,9	2
12,62	2
16,46	3
11,19	3
22,12	2
0,43	3

Ki67	E
25	3
9	3
12,76	3
2,32	3
8,17	3
37,39	3
13,75	3
8,57	2
1,15	2
4,37	1
14,66	3
2,95	3
0	1
5,06	2
2,87	2
1,89	3
0,08	2
0,13	1
4,4	3
0	3
18,39	3
4,84	1
0	3
7,88	2
0,15	3
0,13	3

Ki67	E
2,56	1
0	3
37,33	1
10,88	3
48,69	3
6,39	3
0	2
3,57	3
8,31	3
4,35	3
13,56	1
4,5	3
8,43	3
8,13	2
10,82	3
10,27	3
21,25	3
7,77	3
0,84	3
2,38	3
7,88	3
7,92	3
8,06	3
8,31	2
12,57	3
1,85	3

```
setwd("C:\\Users\\Avell B153\\Desktop\\lissandro_jan_2016")
dados=read.table("Planilha para Sperman.txt",h=T)
cor.test(dados$KI67,dados$RP3,alternative=c("greater"),method=c("spearman"
))
```

```
#####resultado#####
```

Spearman's rank correlation rho

data: dados\$KI67 and dados\$RP3

S = 64430.53, p-value = 0.05

alternative hypothesis: true rho is greater than 0

sample estimates:

rho

0.1852385

Mensagens de aviso perdidas:

In cor.test.default(dados\$KI67, dados\$RP3, alternative = c("greater"), :

Anexo 5

Análise de sobreposição de intervalo de confiança para avaliar a predisposição sexual

#####fêmeas#####

```
> prop.test(46,80)
```

1-sample proportions test with continuity correction

data: 46 out of 80, null probability 0.5

X-squared = 1.5125, df = 1, p-value = 0.2188

alternative hypothesis: true p is not equal to 0.5

95 percent confidence interval:

0.4595439 0.6831962

sample estimates:

p

0.575

#####machos#####

```
> prop.test(34,80)
```

1-sample proportions test with continuity correction

data: 34 out of 80, null probability 0.5

X-squared = 1.5125, df = 1, p-value = 0.2188

alternative hypothesis: true p is not equal to 0.5

95 percent confidence interval:

0.3168038 0.5404561

sample estimates:

p

0.425

Anexo 6

Análise do risco relativo entre as raças mais acometidas pelo STM (n=4054)

Raça	Total de acometidos	Total de cães da raça (acometidos + não acometidos)
Boxer	4	204
Golden Retriever	4	189
Husky Siberiano	4	24
Labrador	6	303
Maltes	5	78
Poodle	5	329
SRD	22	710

####boxer

Odds ratio 0.6900
95 % CI: 0.2458 to 1.9371
z statistic 0.705
Significance level P = 0.4811

####golden

Odds ratio 0.7530
95 % CI: 0.2680 to 2.1155
z statistic 0.538
Significance level P = 0.5904

#####Husky

Odds ratio 7.6826
95 % CI: 2.5250 to 23.3755
z statistic 3.591
Significance level P = 0.0003

#####Labrador

Odds ratio 0.6841
95 % CI: 0.2889 to 1.6199
z statistic 0.863
Significance level P = 0.3880

#####Maltes

Odds ratio 2.6088
95 % CI: 1.0057 to 6.7672
z statistic 1.972
Significance level P = 0.0486

###Poodle

Odds ratio 0.5017
95 % CI: 0.1976 to 1.2738
z statistic 1.451
Significance level P = 0.1468

#####SRD

Odds ratio 1.2551
95 % CI: 0.7123 to 2.2115
z statistic 0.786
Significance level P = 0.4318