

Figura 21 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, epiglote, Bovino 10. Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) no interior e ao redor de ilhas de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados. Hematoxilina-eosina, barra: 50 µm.

Figura 22 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, faringe/orofaringe, Bovino 26. Acentuado infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) ao redor de ilhas e agregados de queratinócitos neoplásicos. Hematoxilina-eosina, barra: 50 µm.

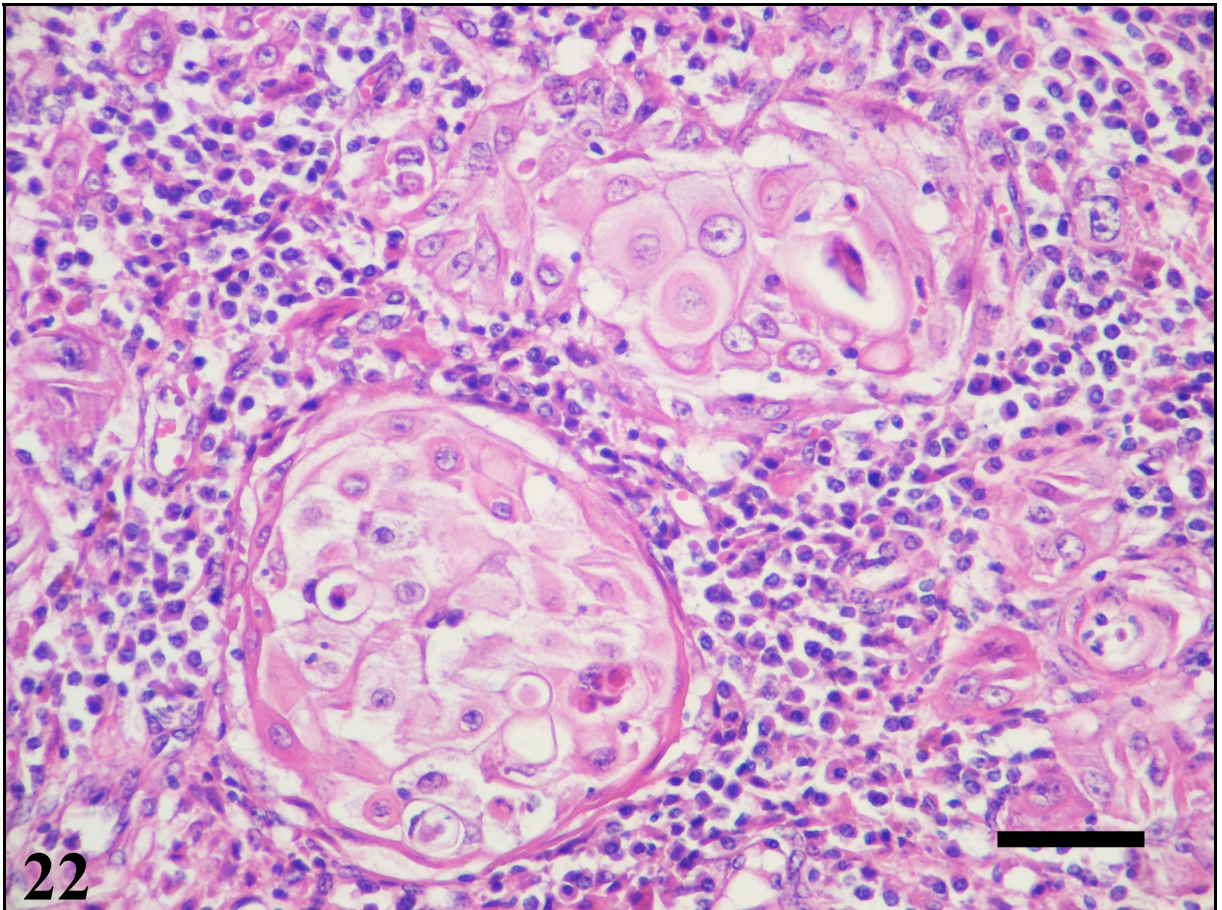
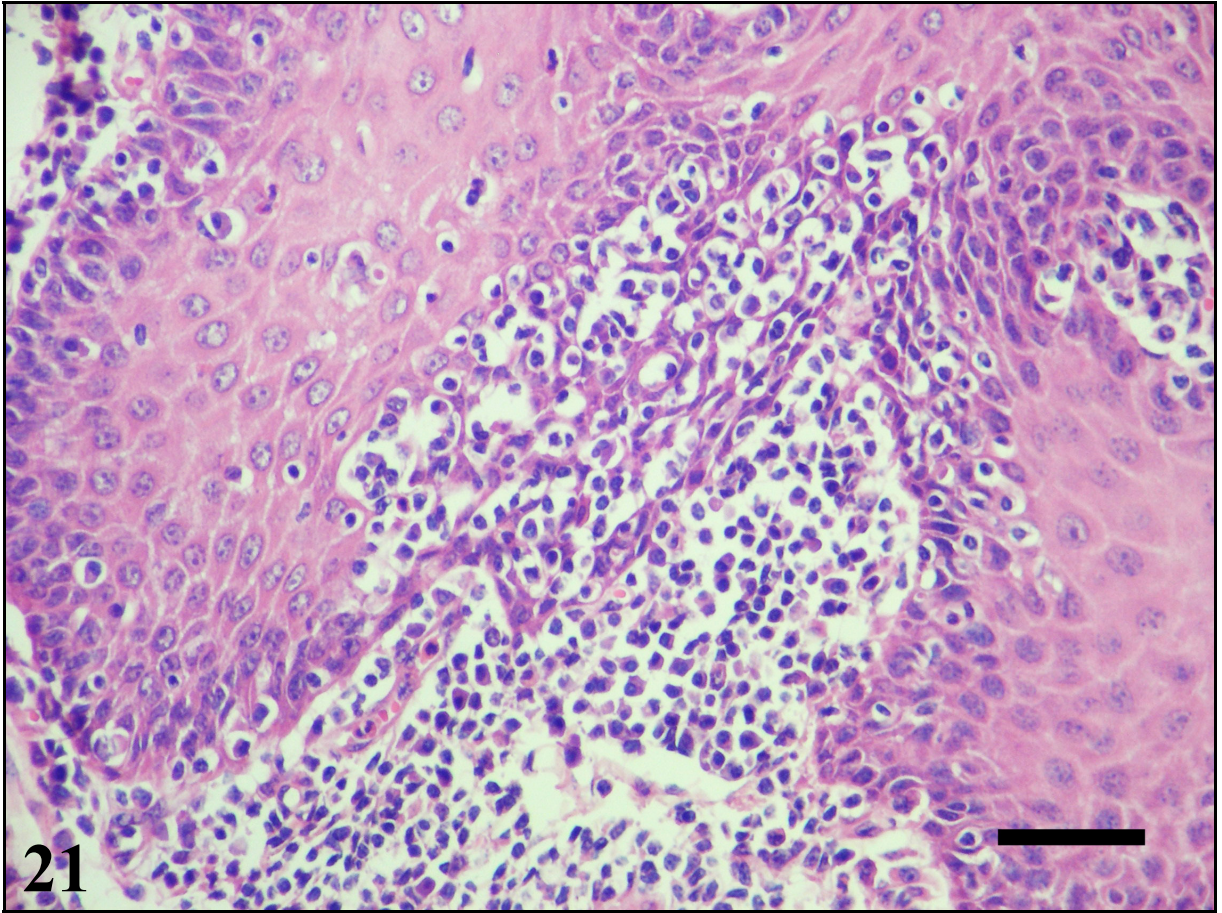


Figura 23 – Carcinomas de células escamosas, Bovinos. Padrões morfológicos de migração e invasão, observados através da imunomarcção para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris. A) Ilha de queratinócitos neoplásicos, barra: 50 μm (Bovino 17). B) Padrão de fita de queratinócitos neoplásicos, barra: 50 μm (Bovino 31). C) Agregados celulares, barra: 50 μm (Bovino 29). D) Cordões de queratinócitos neoplásicos, barra: 50 μm (Bovino 28). E) Células individuais de formato redondo (amebóides), barra: 25 μm (Bovino 38). F) Célula individual de formato alongado (fusiforme) no centro da foto, barra: 25 μm (Bovino 38).

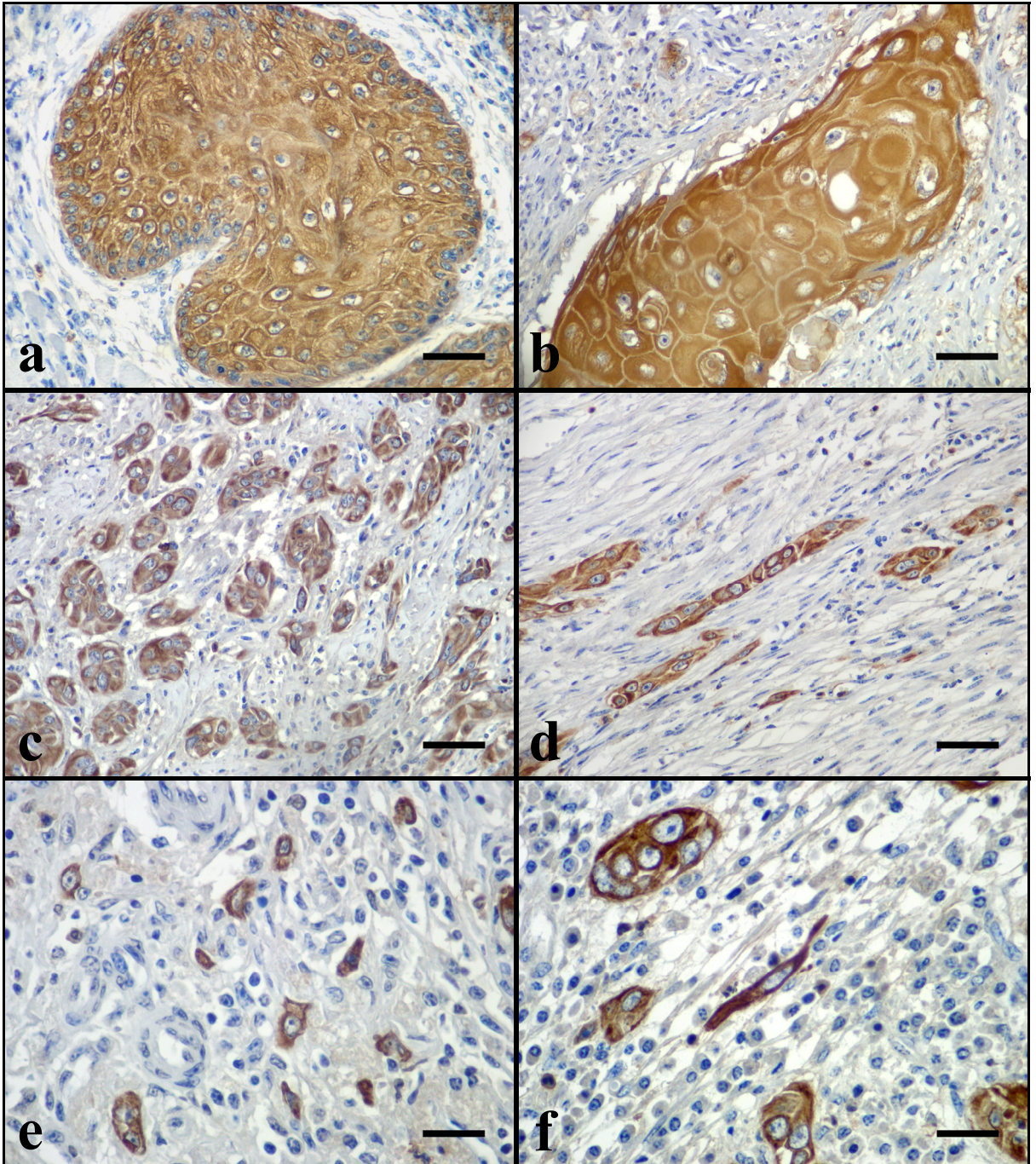


Figura 24 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, epiglote, Bovino 10. Ilhas de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados. Observe que há também outros padrões de migração e invasão. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μ m.

Figura 25 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, base da língua, Bovino 35. Ilha de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados. Há formação de extensas fitas a partir desta ilha. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 50 μ m.

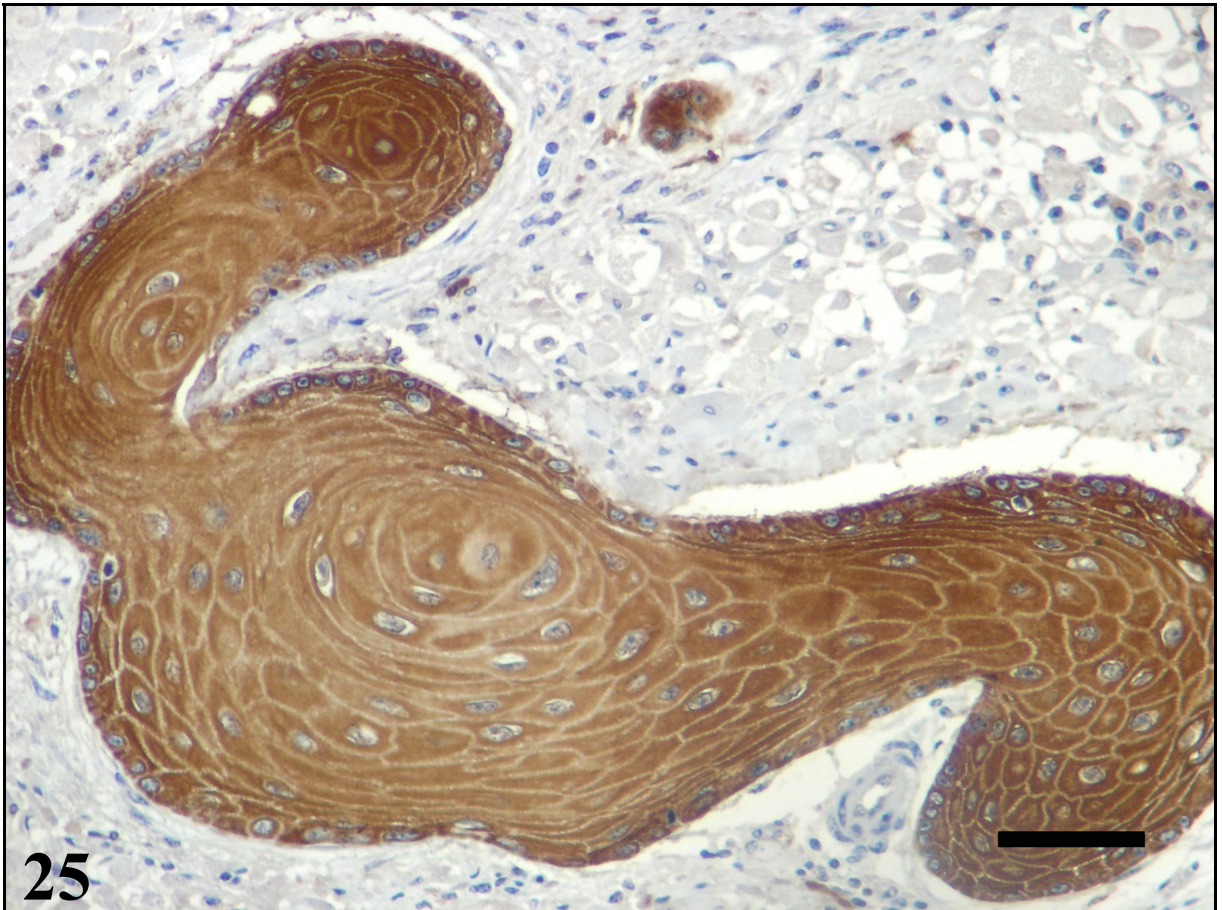


Figura 26 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, faringe/orofaringe, Bovino 36. Ilha de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados com diferente intensidade na imunomarcção para citoqueratina. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 50 μm .

Figura 27 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, faringe/orofaringe, Bovino 36. Magnificação da Figura 26. Observe a presença de pontes intercelulares e a distribuição dos filamentos de citoqueratina no interior do queratinócito neoplásico. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 25 μm .

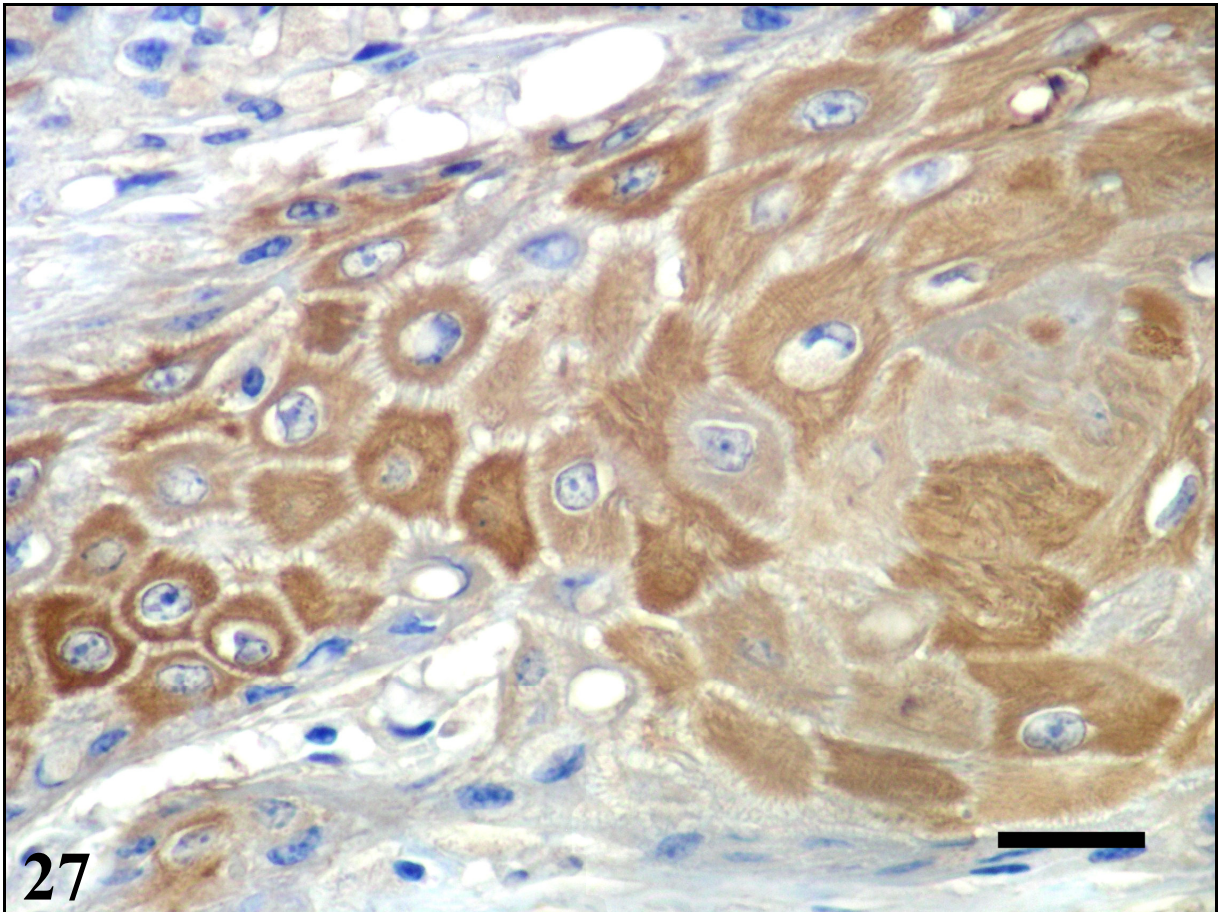
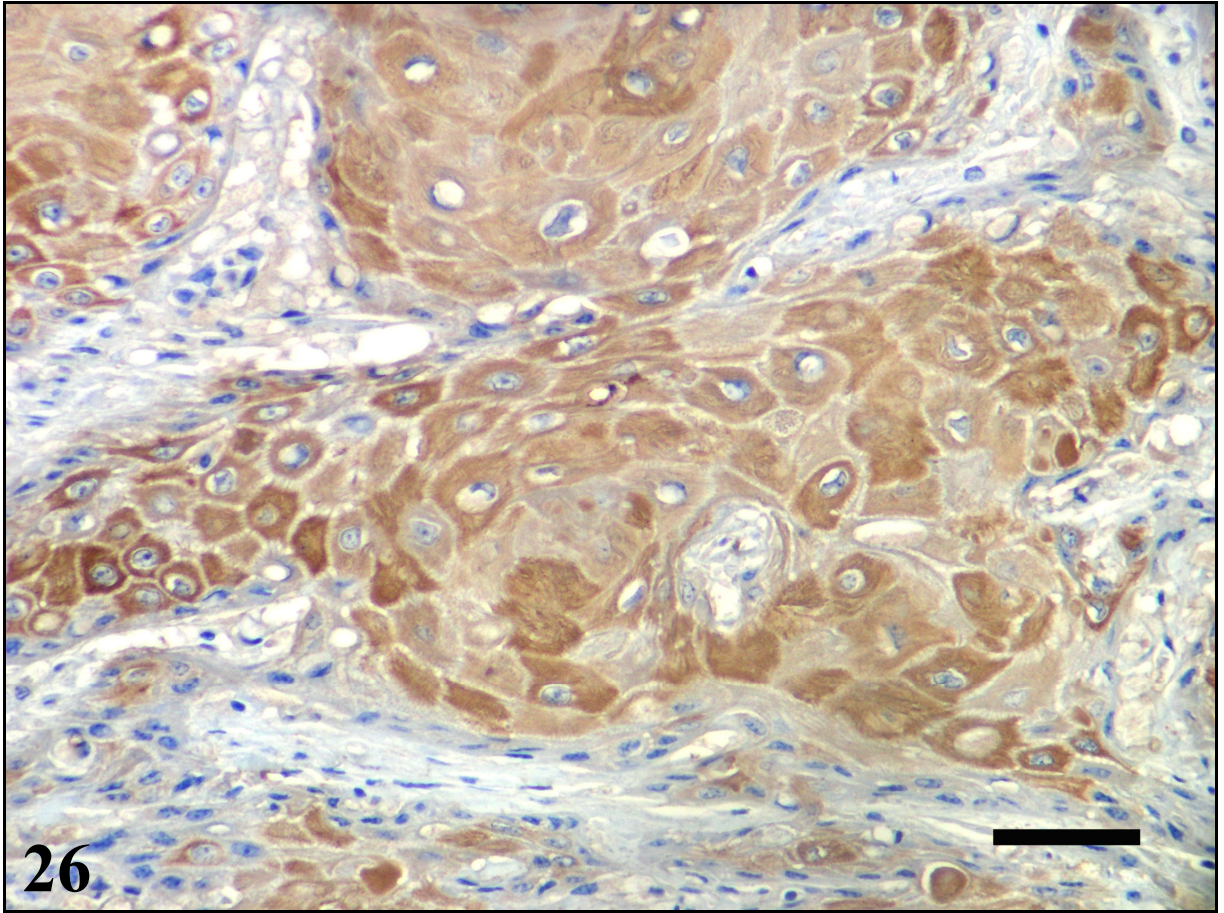


Figura 28 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 22. Cordões anastomosantes de queratinócitos neoplásicos moderadamente diferenciados. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 50 μm .

Figura 29 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 31. Agregados celulares e pequenas ilhas com moderado pleomorfismo celular e nuclear. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 50 μm .

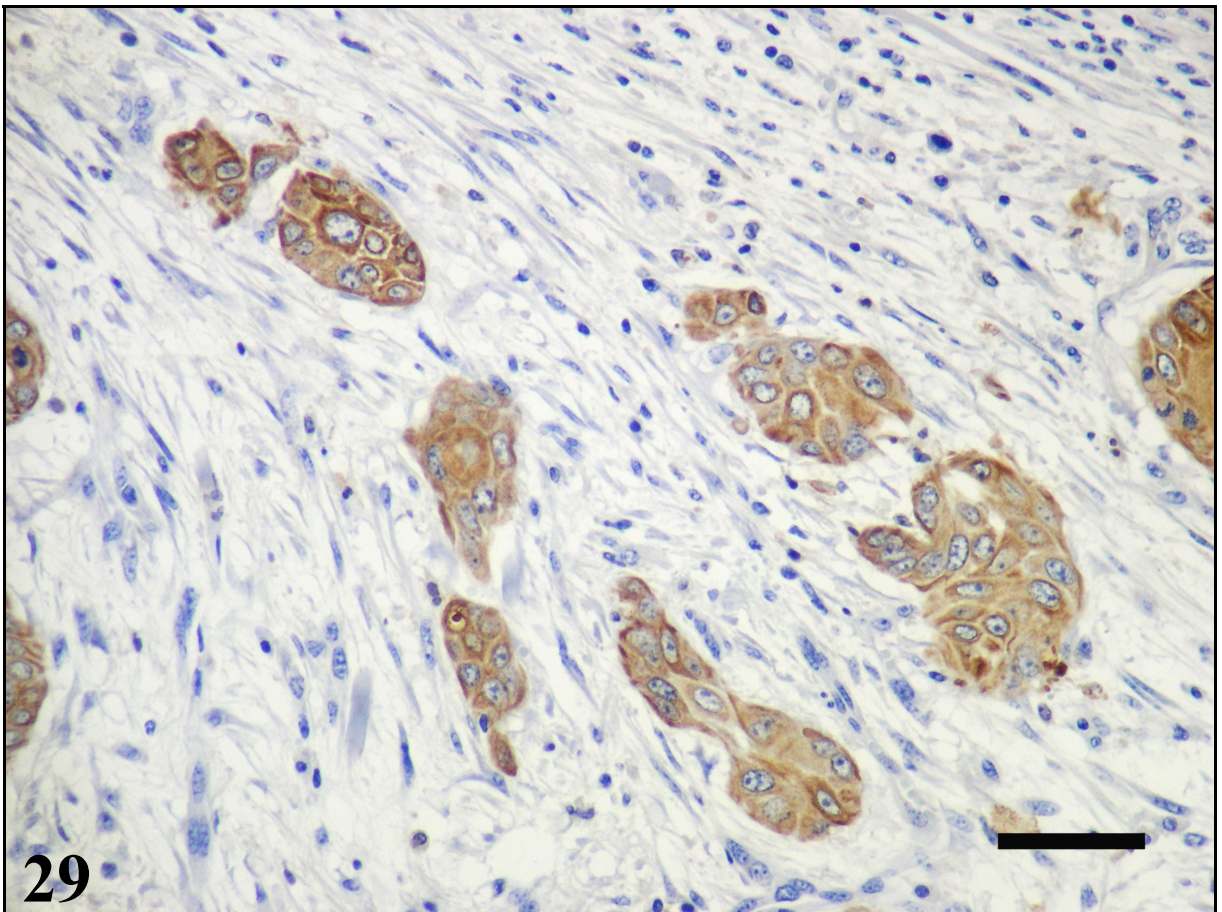
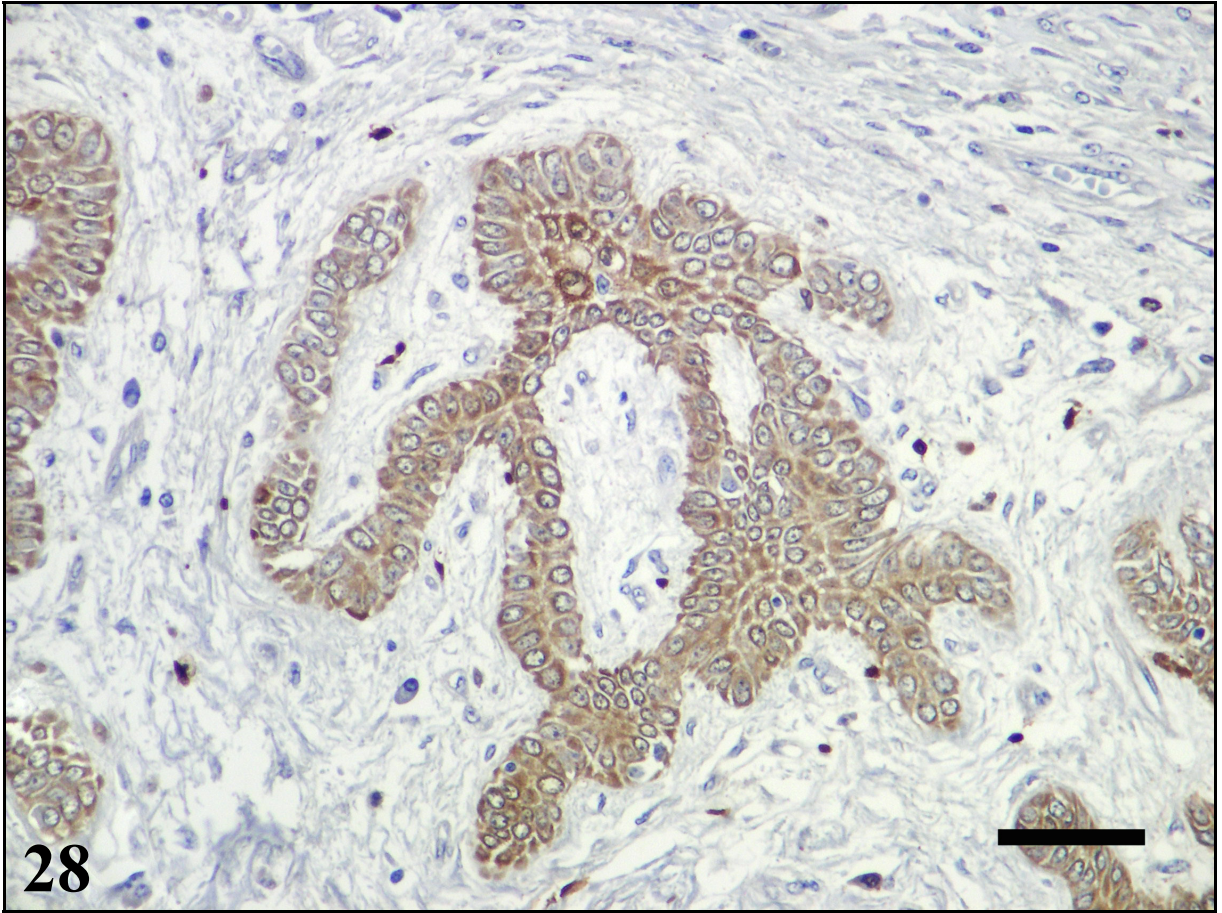


Figura 30 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, esôfago (caudal), Bovino 28. Grande quantidade de agregados celulares e células individuais redondas e alongadas. Presença de ilhas queratinizadas no canto superior direito da foto. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μm .

Figura 31 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, esôfago (caudal), Bovino 28. Agregados, fitas, cordões e células individuais redondas ou alongadas (seta) podem ser observadas em diferentes proporções. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 50 μm .

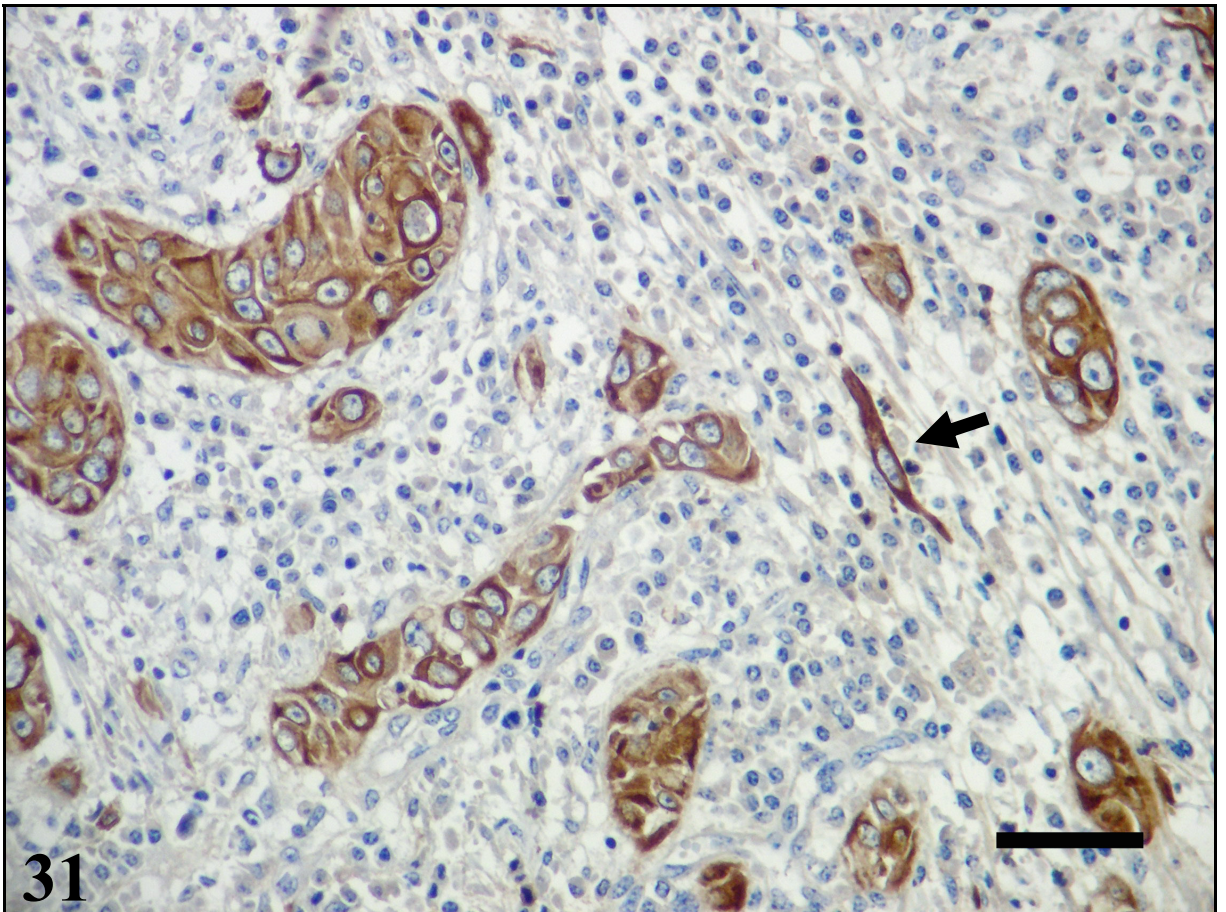
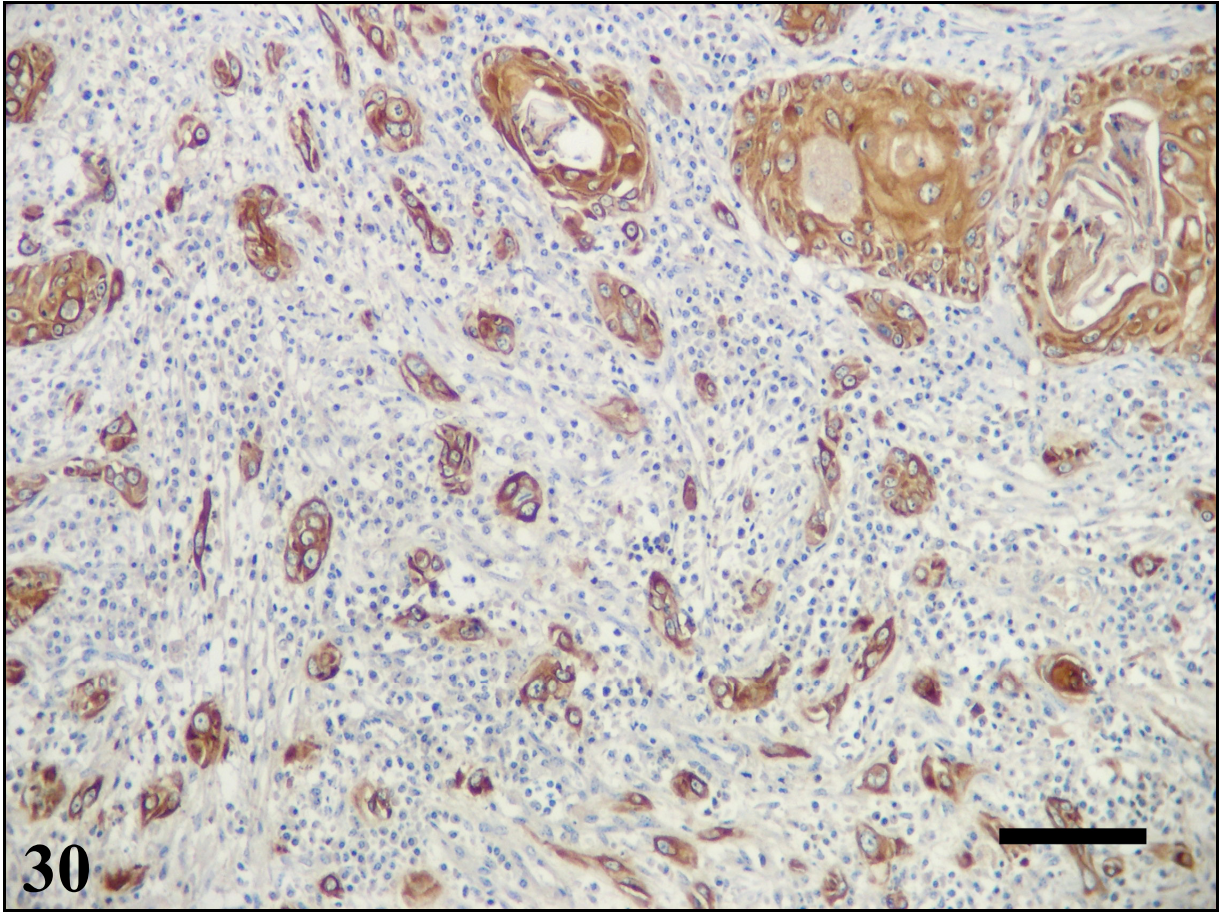


Figura 32 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 16. As ilhas, fitas e cordões de queratinócitos neoplásicos estão fortemente marcados para citoqueratina. O estroma ao redor das células neoplásicas é negativo para essa imunomarcção. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μ m.

Figura 33 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, entrada de rúmen, Bovino 16. Ao contrário da Figura 32, os fibroblastos presentes ao redor dos queratinócitos neoplásicos (reação desmoplásica) estão fortemente marcados pela vimentina. As células neoplásicas são negativas para essa imunomarcção. Imunoistoquímica para vimentina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μ m.

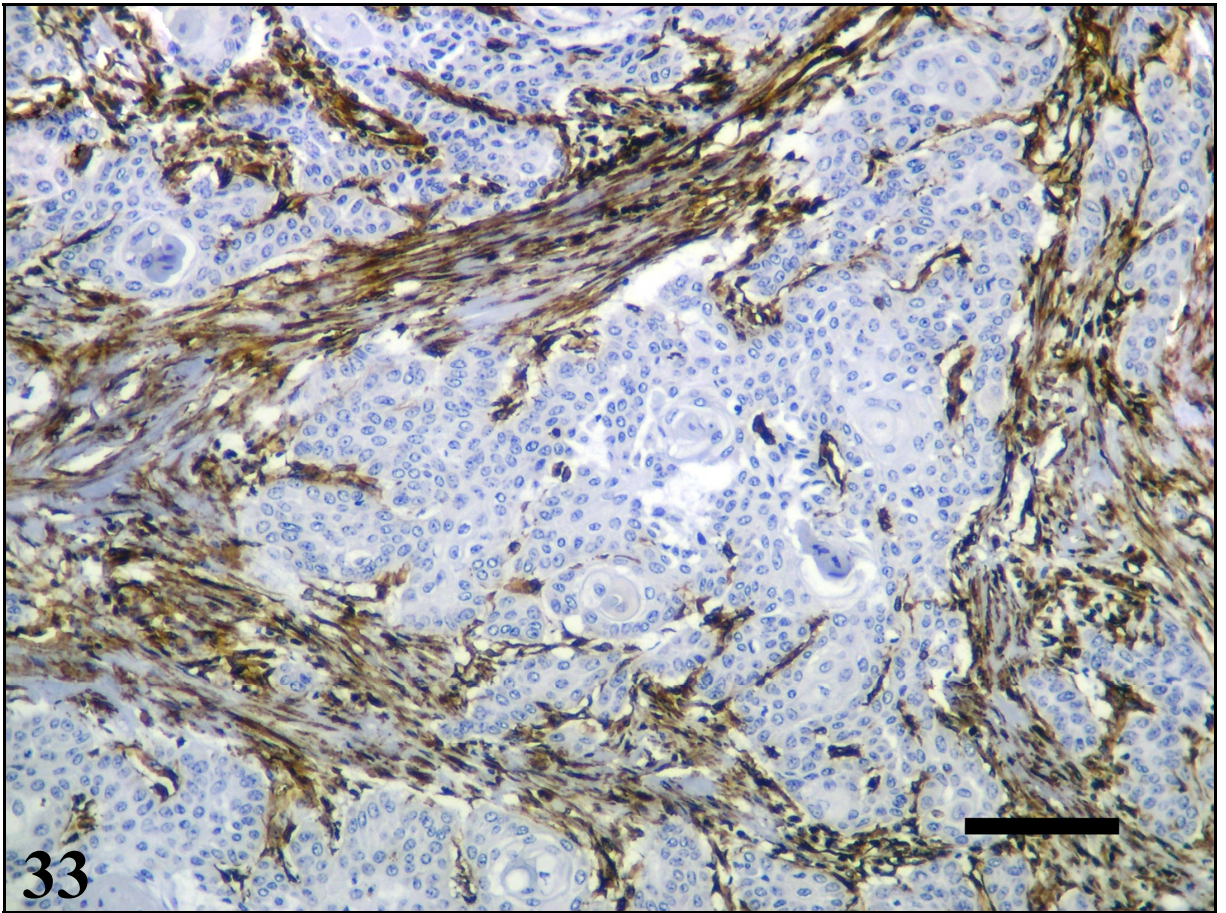
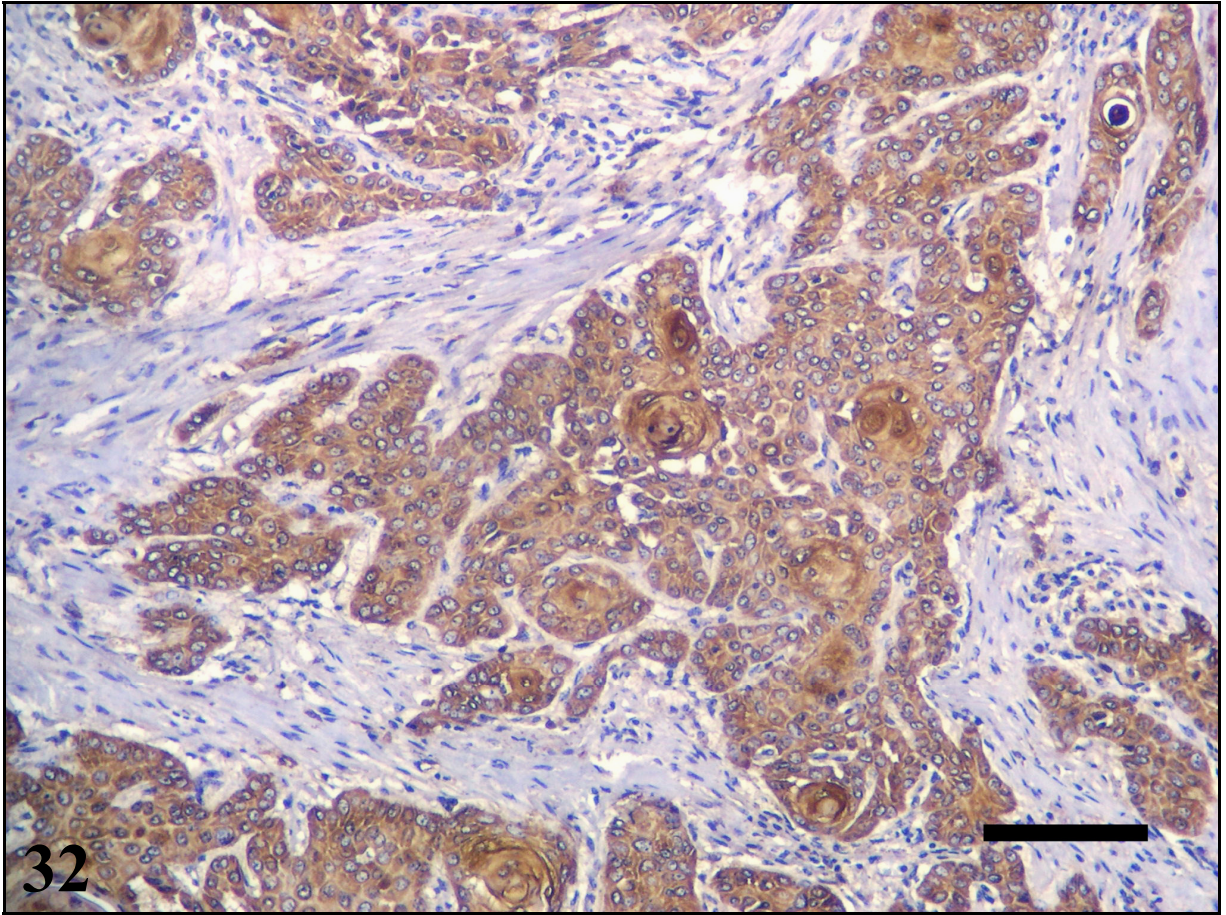


Figura 34 – Carcinomas de células escamosas (CCE), Bovinos. Diferentes intensidades da desmoplasia, observadas através da imunomarcção para vimentina. Os fibroblastos estromais da reação desmoplásica estão fortemente marcados em contraste com os queratinócitos neoplásicos negativos para essa imunomarcção. Imunoistoquímica para vimentina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris. A) Desmoplasia leve ao redor de ilhas, fitas e cordões de queratinócitos neoplásicos, barra: 100 μm (Bovino 10). B) Desmoplasia moderada entre fitas e cordões de queratinócitos neoplásicos, barra: 100 μm (Bovino 15). C) Desmoplasia acentuada. Os pequenos agregados celulares estão em meio à intensa proliferação de fibroblastos, barra: 100 μm (Bovino 26).

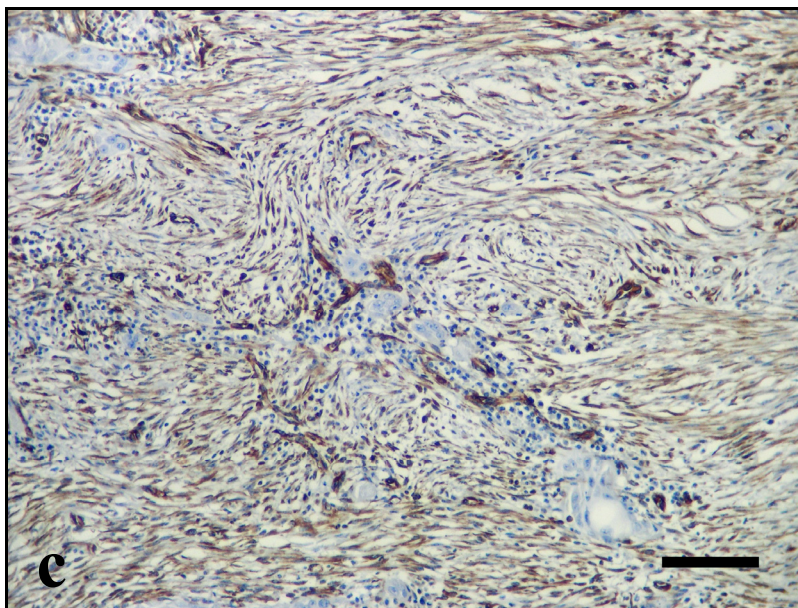
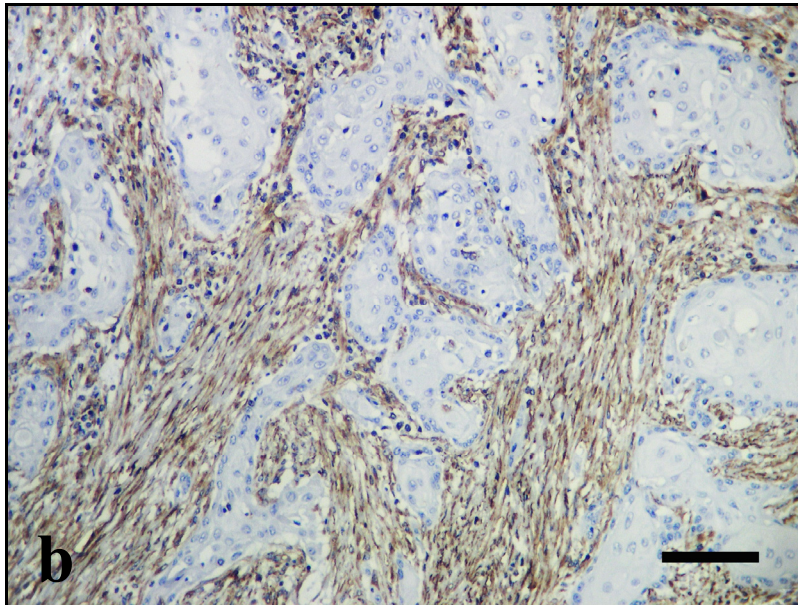
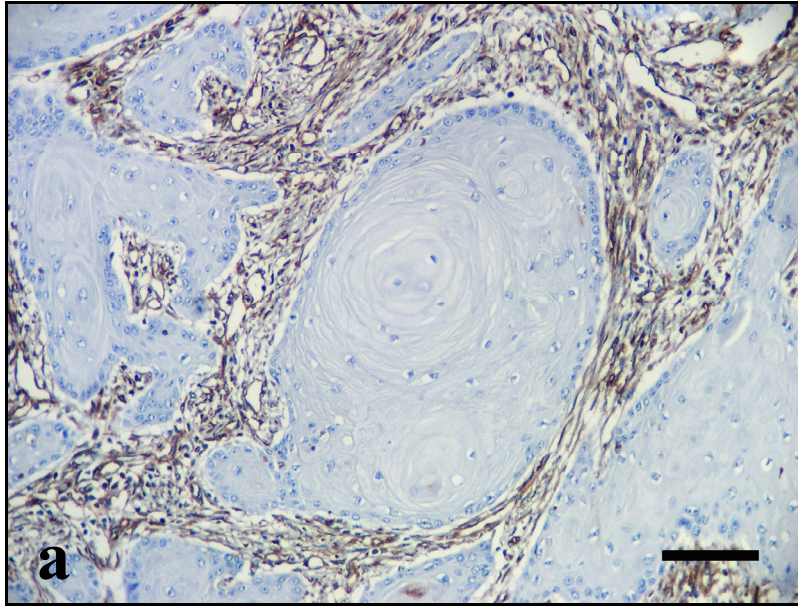


Figura 35 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 40. Presença de êmbolo de queratinócitos neoplásicos e células individuais no interior de vaso linfático. Hematoxilina-eosina, barra: 50 μ m.

Figura 36 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 40. Intravasão de queratinócitos neoplásicos em vaso linfático. Observe a contígua relação e a proximidade de agregados de células neoplásicas com a parede dos vasos (canto superior esquerdo). Hematoxilina-eosina, barra: 50 μ m.

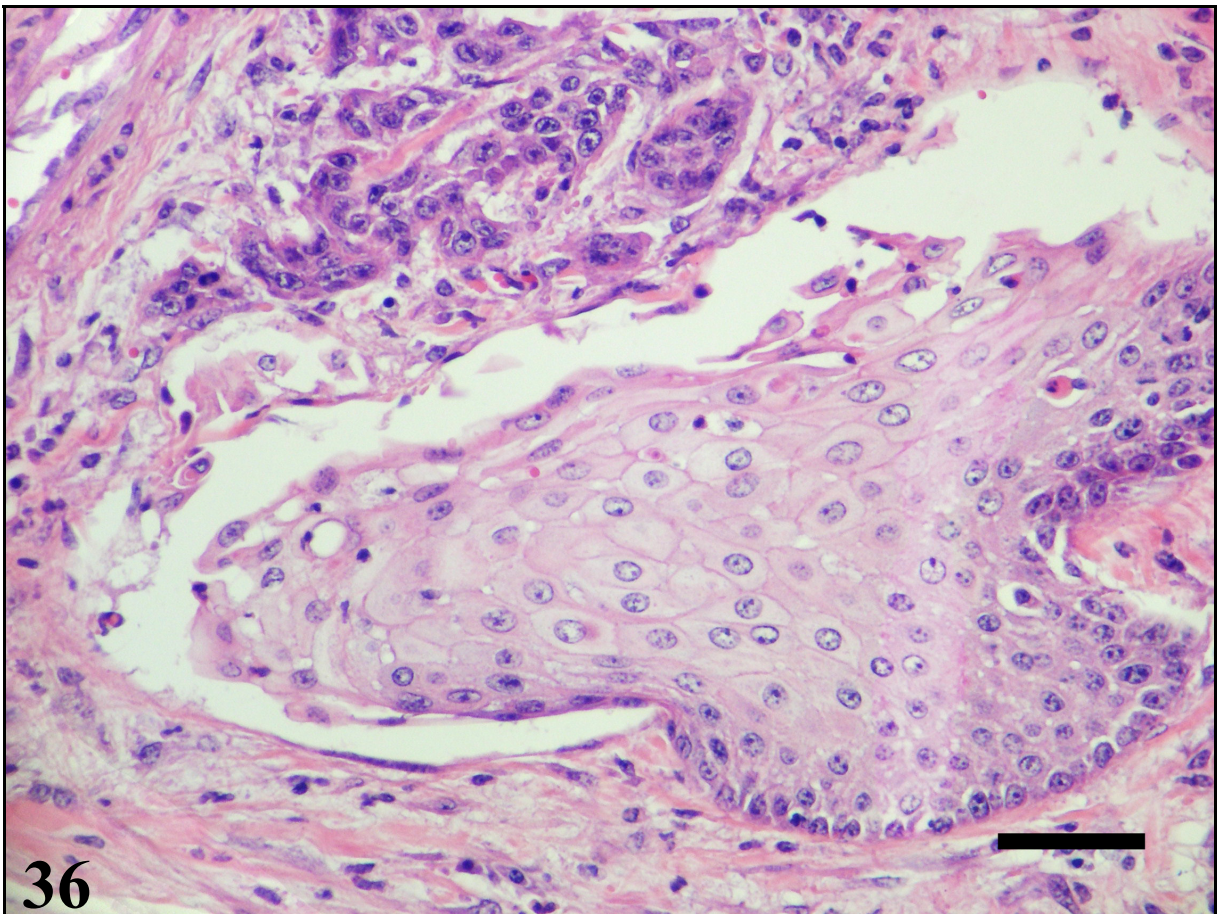
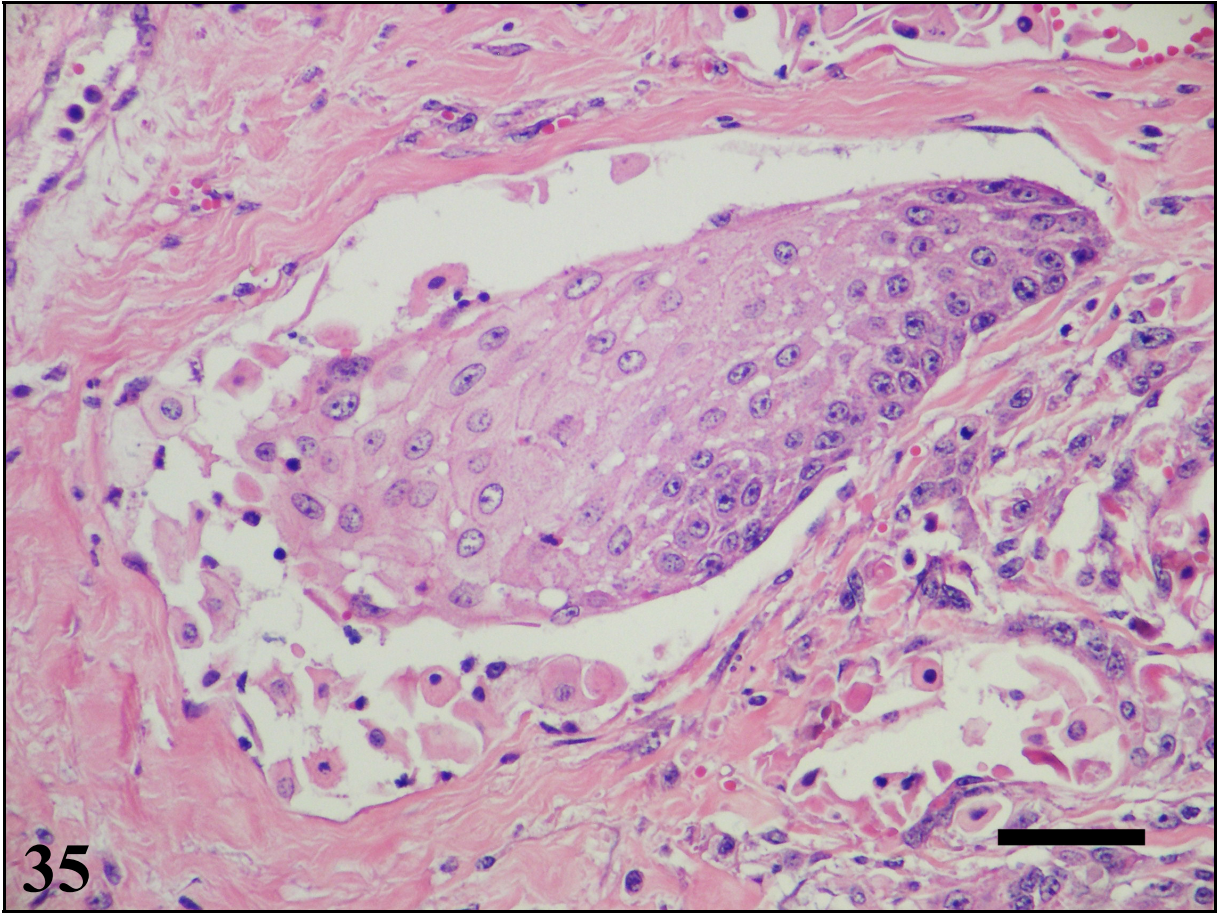


Figura 37 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 40. Presença de queratinócitos neoplásicos fortemente marcados no interior de vaso linfático dilatado. A imunistoquímica para citoqueratina, em contraste com a vimentina (Figura 38), evidenciou a presença da invasão vascular. Imunistoquímica para citoqueratina, método estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μm .

Figura 38 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 40. A acentuada reação desmoplásica e as paredes vasculares estão marcadas para vimentina, em contraste com os queratinócitos neoplásicos negativos para essa imunomarcação. Imunistoquímica para vimentina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μm .

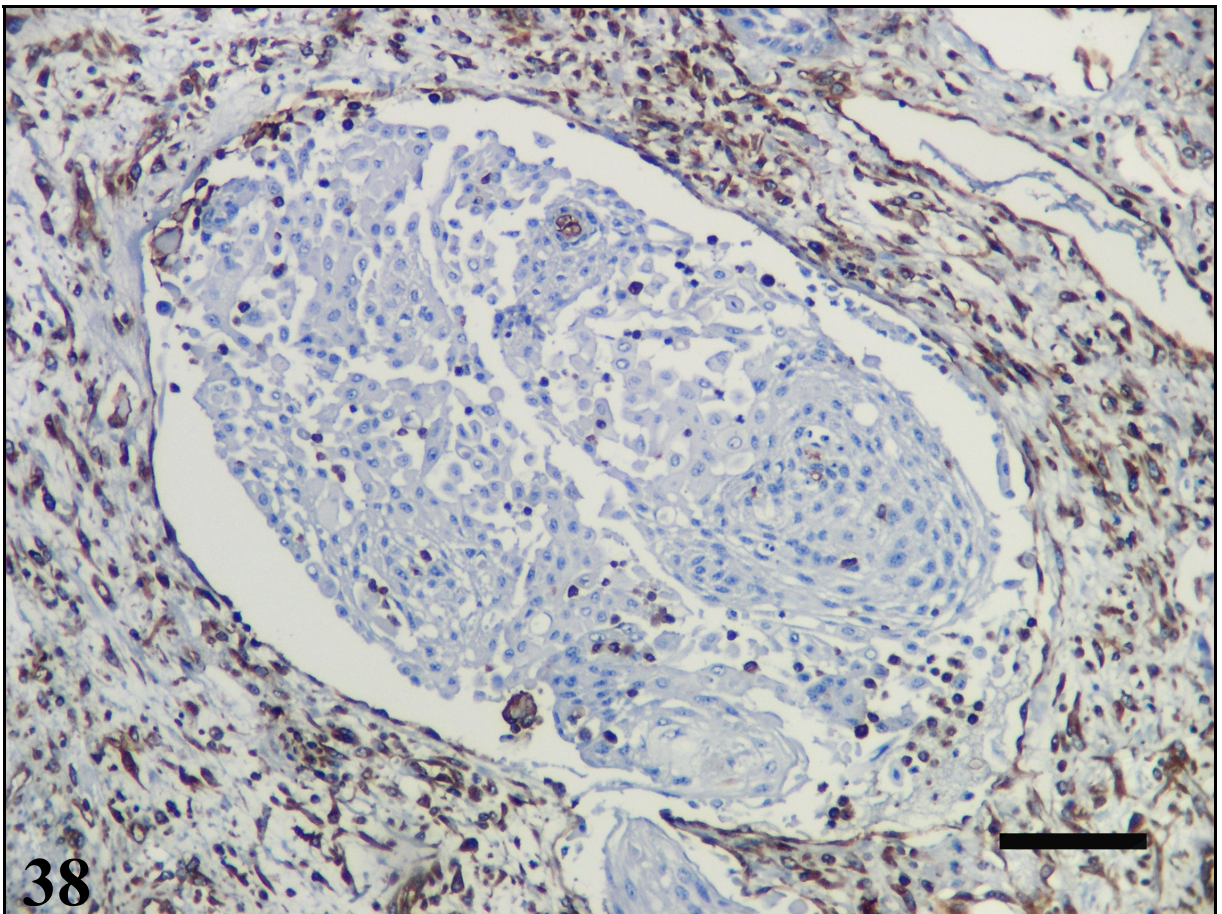
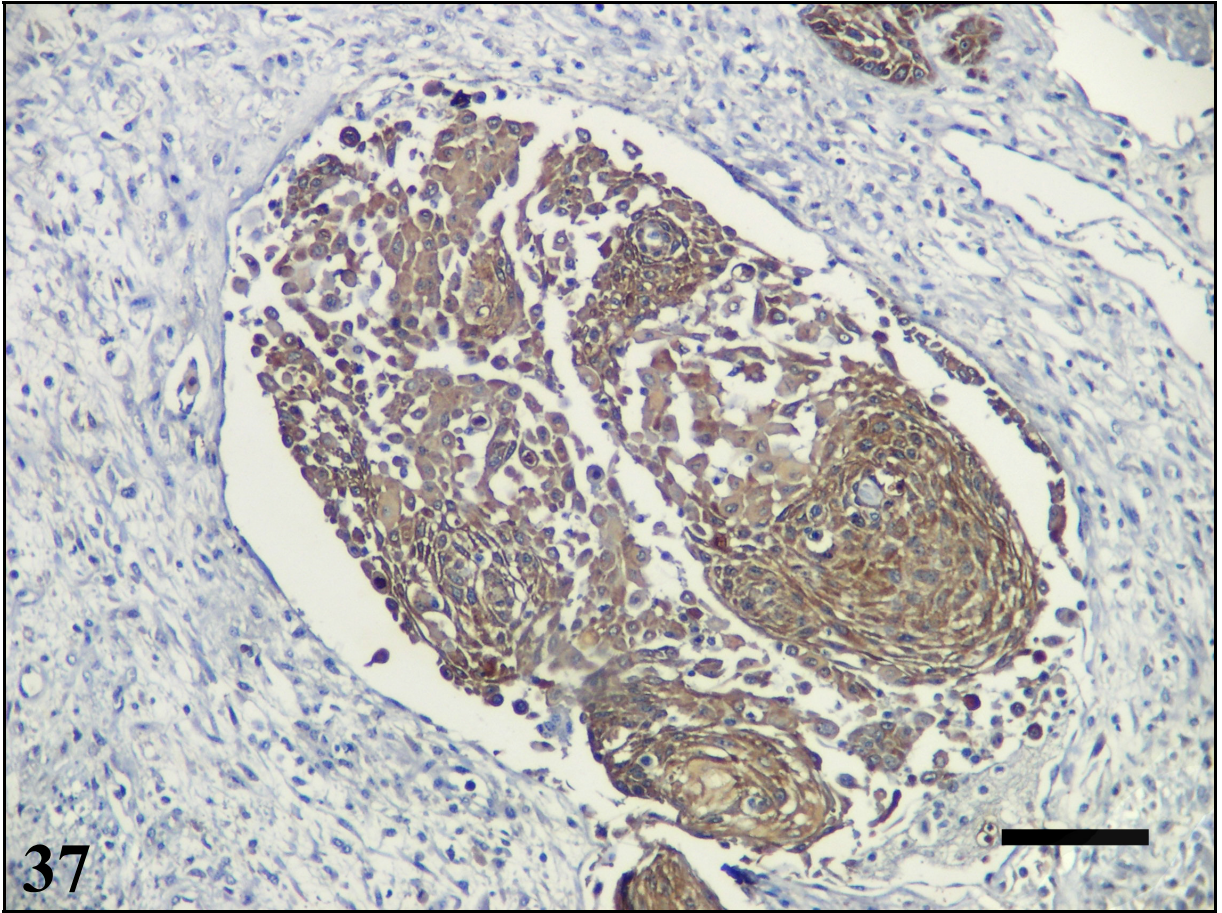


Figura 39 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, epiglote, Bovino 10. Intravasão de queratinócitos neoplásicos marcados para citoqueratina. Observe a proximidade das células neoplásicas à parede do vaso linfático dilatado. Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 μ m.

Figura 40 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, epiglote, Bovino 10. Magnificação da intravasão de queratinócitos neoplásicos marcados para citoqueratina. As células neoplásicas estão penetrando no vaso linfático através de uma brecha do endotélio vascular, formando uma região de estrangulamento (seta). Imunoistoquímica para citoqueratina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 50 μ m.

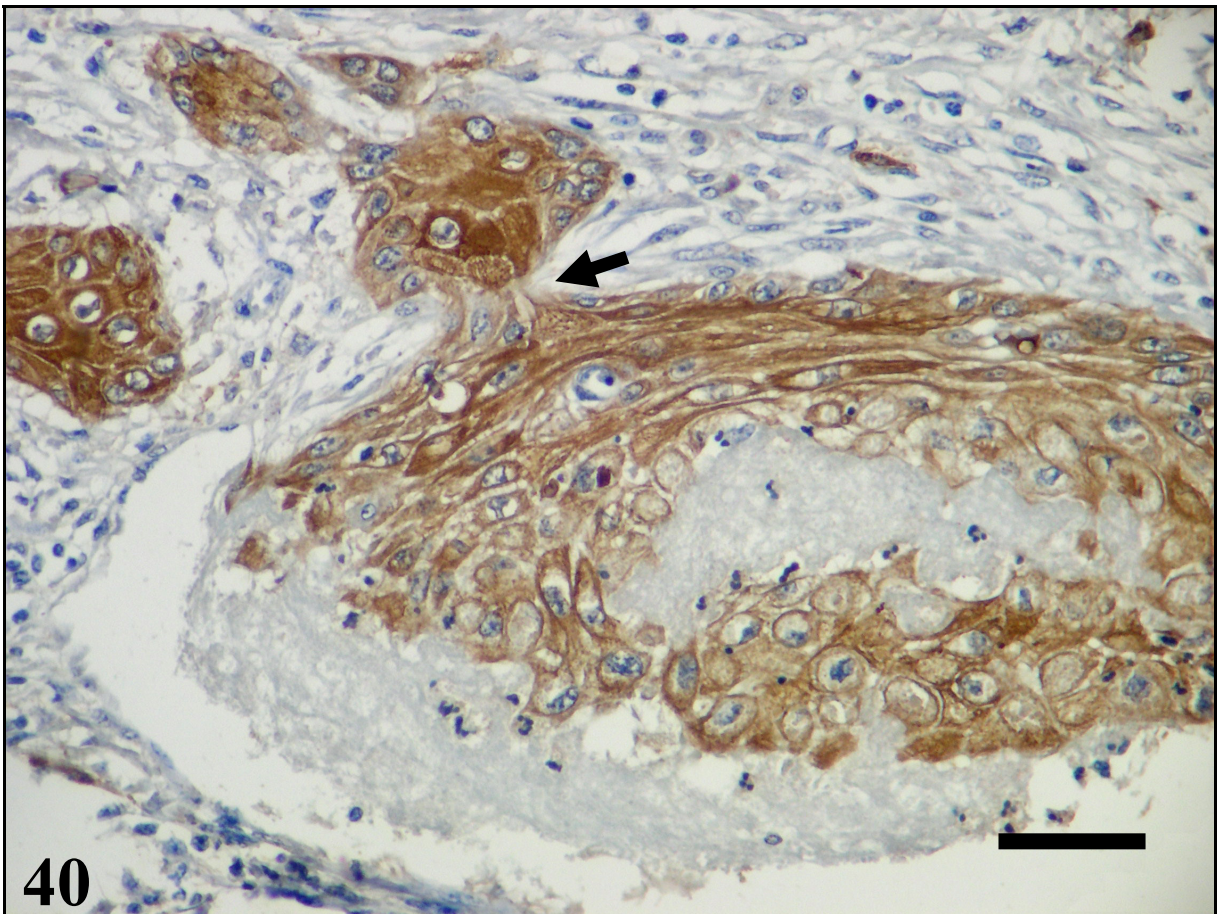
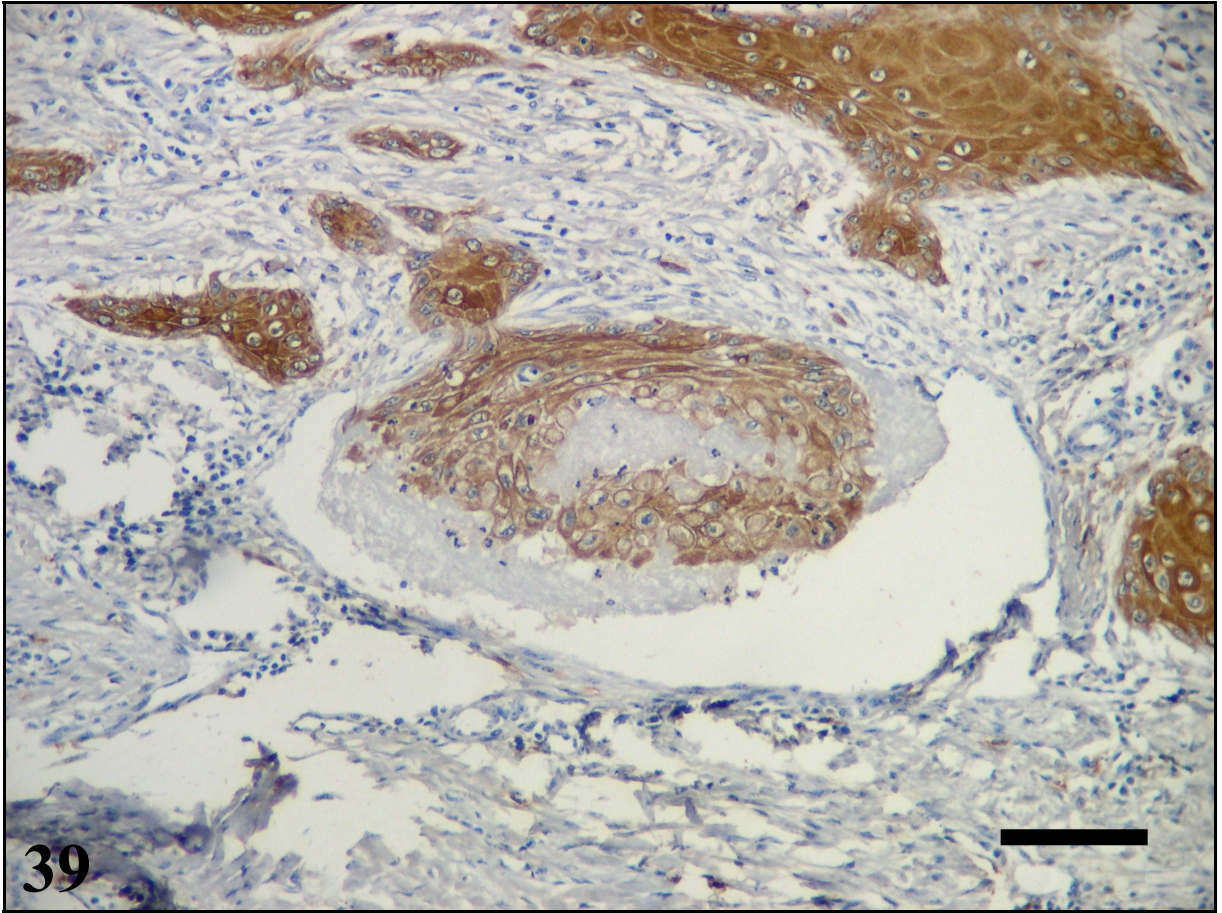


Figura 41 – Metástase de carcinoma de células escamosas bem diferenciado, linfonodo (superfície de corte), Bovino 26. Tecido brancacento com pontos amarelos obliterando a arquitetura do linfonodo. Há também extensa área central de consistência mole e coloração branco-amarelada (necrose).

Figura 42 – Metástase de carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, linfonodo, Bovino 40. Os seios subcapsular estão preenchidos por grande quantidade de queratinócitos neoplásicos. Esse achado foi observado na grande maioria das metástases para os linfonodos. Hematoxilina-eosina, barra: 250 µm.

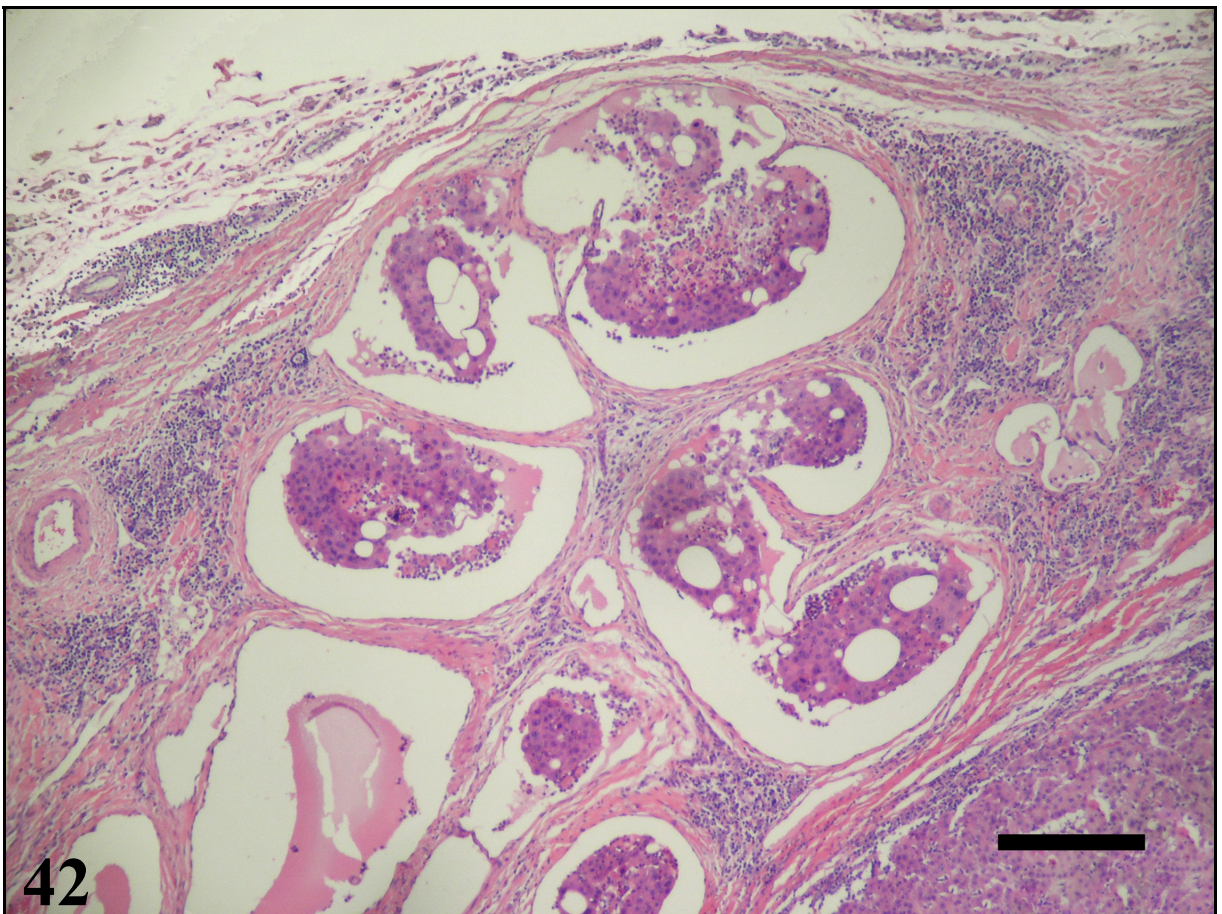
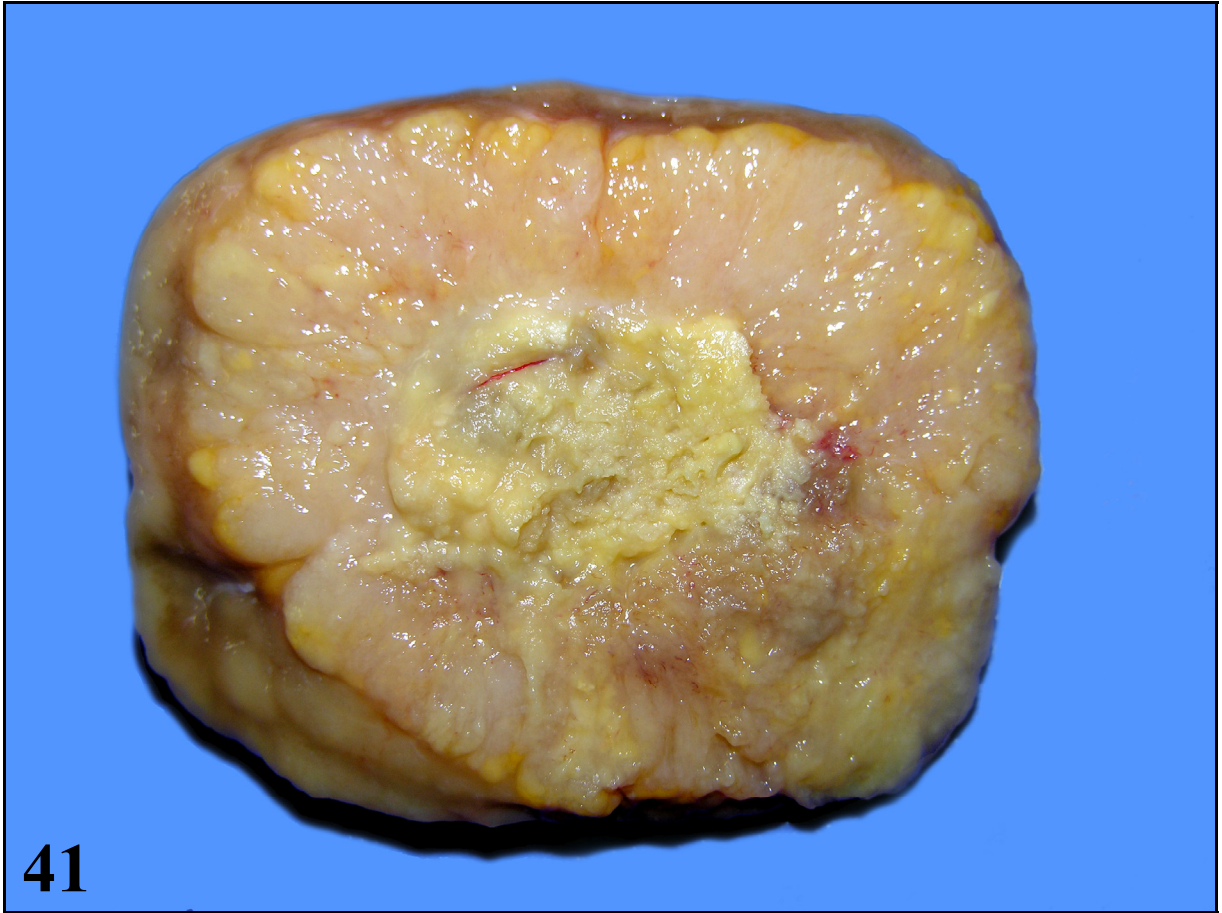


Figura 43 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, epiglote, Bovino 10. Acentuado infiltrado de eosinófilos (eosinofilia tecidual associada a tumores – TATE) ao redor de ilhas e agregados de células neoplásicas. A TATE está acompanhada de infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) peritumoral. Hematoxilina-eosina, barra: 100 μ m.

Figura 44 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, epiglote, Bovino 28. Numerosos eosinófilos circundando queratinócitos neoplásicos (seta). Hematoxilina-eosina, barra: 25 μ m.

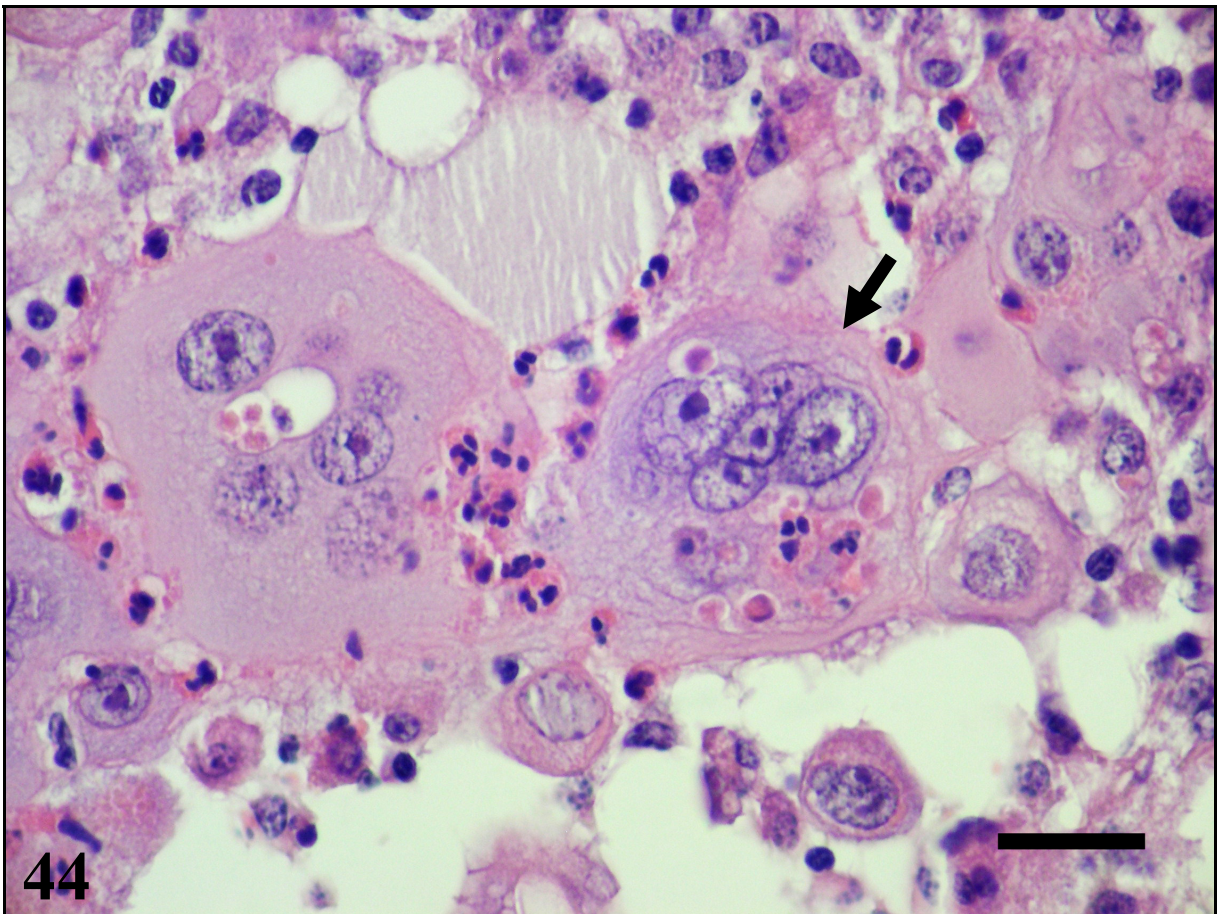
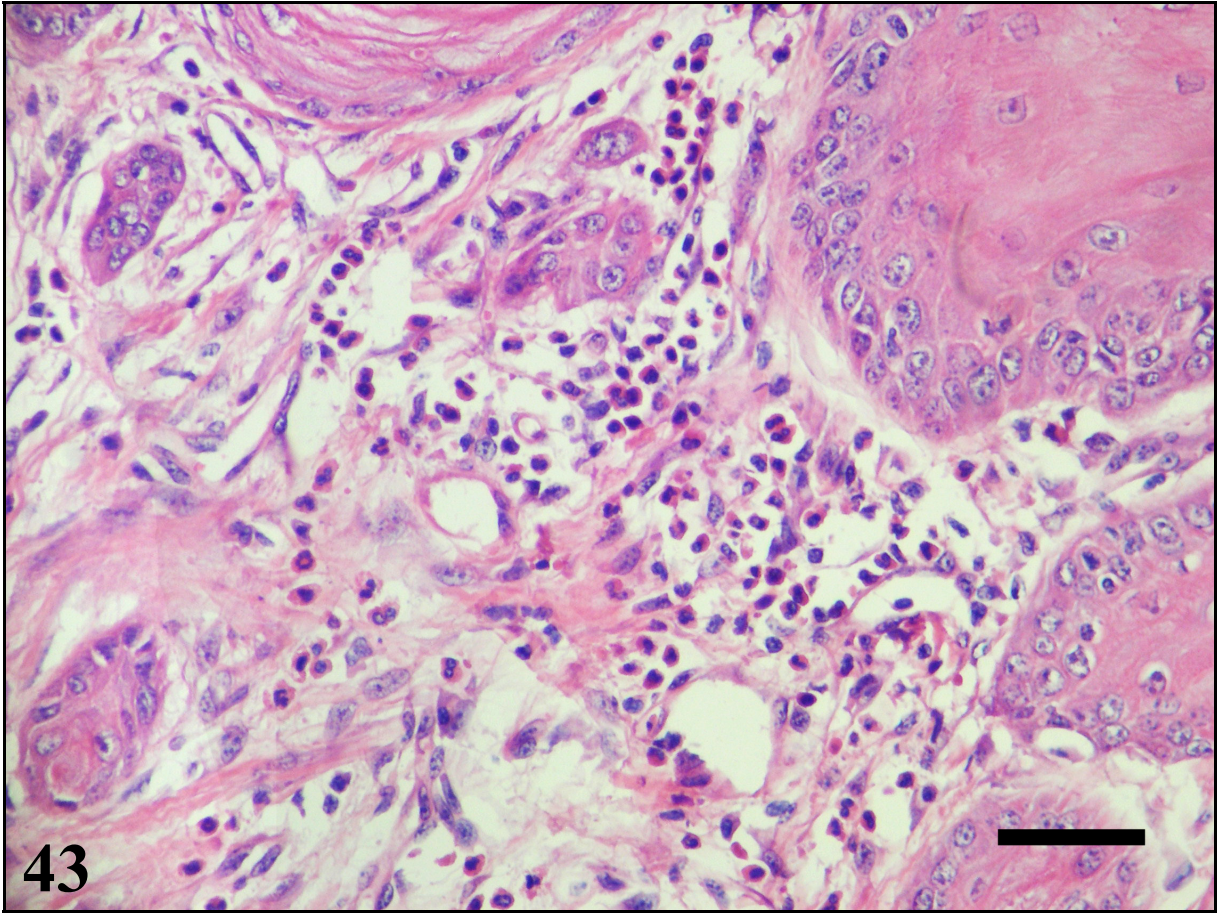
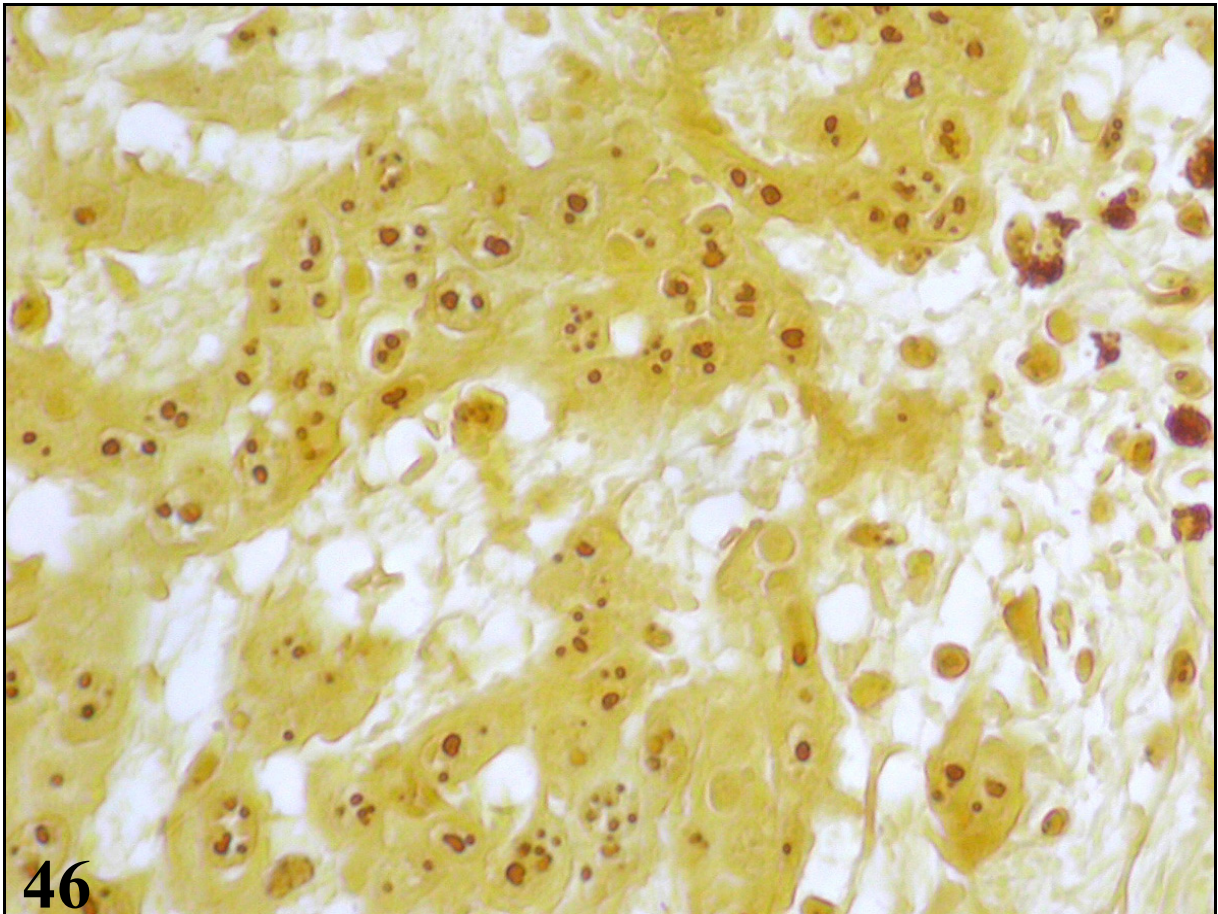
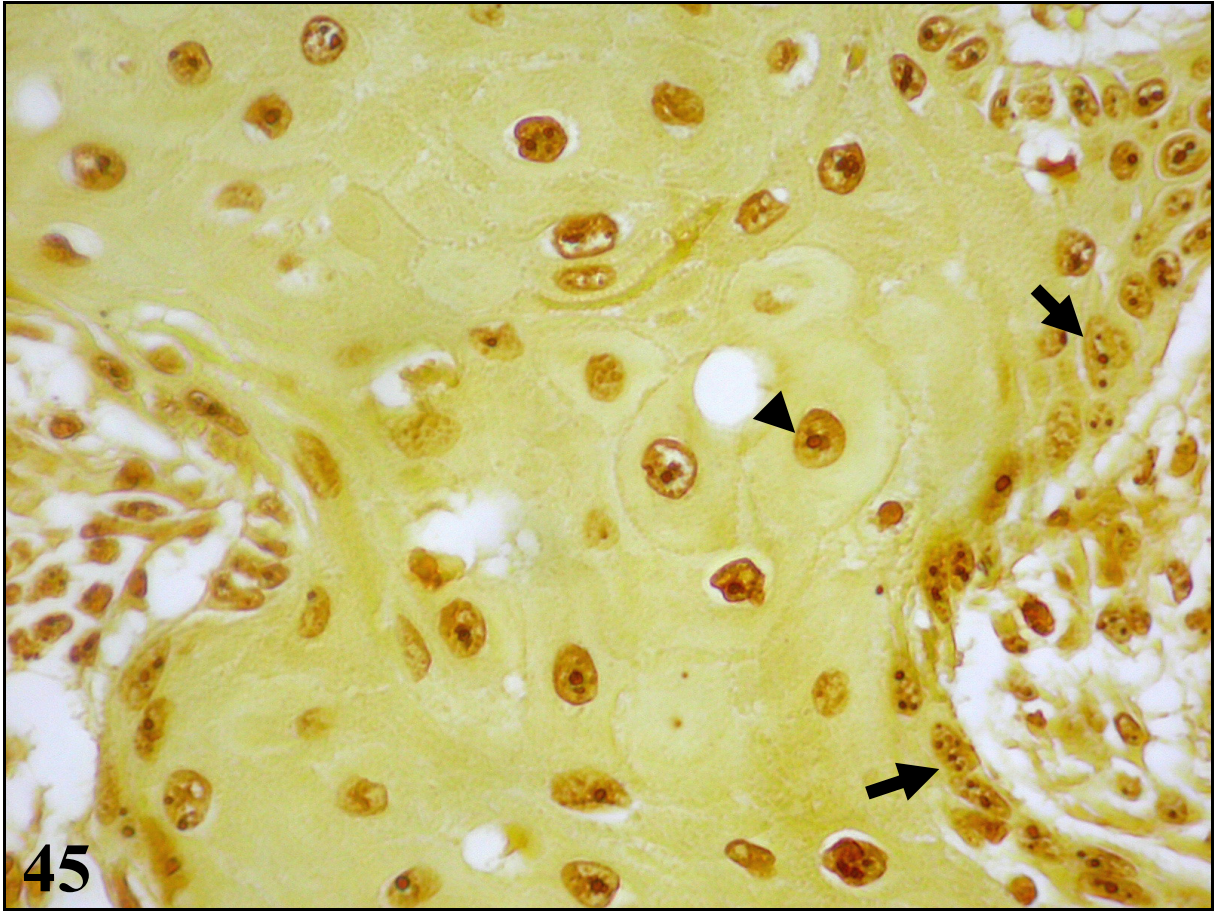


Figura 45 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 2. Poucos pontos marrom-escuros podem ser observados no interior do núcleo dos queratinócitos neoplásicos, representando as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs). A camada de células semelhantes às células basais do epitélio possuem mais de um AgNOR por núcleo (seta), em contraste com os queratinócitos neoplásicos bem diferenciados (cabeça de seta). Neste caso, o número de AgNOR foi de 1,74. Coloração de AgNOR, contra-coloração com amarelo de metanila. Objetiva de 20X.

Figura 46 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, esôfago (caudal), Bovino 28. Os queratinócitos neoplásicos têm múltiplos AgNORs por núcleo. As AgNORs têm acentuada variação de tamanho e, muitas vezes, apresentam-se agregadas. Neste caso, o número de AgNOR foi de 2,39. Coloração de AgNOR, contra-coloração com amarelo de metanila. Objetiva de 20X.



5 DISCUSSÃO

A intoxicação crônica por samambaia (*Pteridium aquilinum*) sob a forma de carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) tem sido descrita em bovinos que pastoreiam em áreas altamente infestadas por essa planta (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; JARRET, 1978; JARRET et al., 1978; POLACK, 1990; GAVA et al., 2002; MOREIRA SOUTO et al., 2006). Não há aparente predisposição por sexo ou raça. No entanto, os bovinos afetados geralmente têm idade mais avançada, provavelmente devido à necessidade do consumo da planta por meses a anos para o desenvolvimento dos tumores (TOKARNIA et al., 1979; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000; MOREIRA SOUTO et al., 2006). Nos 40 casos aqui estudados, a idade acometida ficou entre 3 e 13 anos, sendo mais afetados bovinos entre 6,5 e 9 anos, com pico aos 8 anos.

Não tem sido possível estabelecer o curso clínico exato dessa doença. Na maioria dos casos, os sinais clínicos se manifestam muito tardiamente. Ao morrerem ou serem submetidos à eutanásia devido ao mau prognóstico, os bovinos afetados geralmente apresentam um CCE bem desenvolvido no TAS. Em muitos casos, há também múltiplos CCEs menores em outras localizações ao longo do TAS (MOREIRA SOUTO et al., 2006).

Apesar da origem dos CCEs poder ser única ou múltipla (TOKARNIA et al., 2000; MOREIRA SOUTO et al., 2006), os sinais clínicos e, muitas vezes, a morte dos bovinos, são dependentes da localização anatômica do CCE no TAS, principalmente devido aos distúrbios mecânicos causados à digestão e ruminação dos alimentos (TOKARNIA et al., 2000). Adicionalmente, tem sido observada uma forte associação entre os sinais clínicos e os CCEs de maior tamanho nos TAS (MOREIRA SOUTO, 2005). Vale ainda relembrar que 30 dos 40 bovinos aqui estudados também fizeram parte do estudo de MOREIRA SOUTO (2005).

Somente os fatores citados acima já seriam suficientes para justificar um estudo mais aprofundado da distribuição e da histomorfologia destes neoplasmas que, quando evoluem, levam à 100% de letalidade nos bovinos acometidos (TOKARNIA et al., 2000). A escolha do neoplasma de maior tamanho para uma criteriosa avaliação morfológica em cada bovino estudado também se justifica pelo fato de que, de maneira geral, quanto mais agressivo, de crescimento mais rápido e de maior tamanho for o neoplasma primário, maior a probabilidade de já apresentar metástases (CONTRAN et al., 2000).

Quanto à distribuição dos CCEs no TAS neste estudo, as regiões cranial (42,5%) e caudal (45%) foram as mais atingidas, sendo a região média (esofágica) a menos afetada

(12,5%). Este resultado assemelha-se aos achados dos 81 bovinos estudados por GAVA et al. (2002), que observaram porcentagens de 42% (cranial), 25% (média) e 33% (caudal). Porém, ambos estudos diferem dos dados de 80 bovinos afetados por CCE na Escócia (JARRET, 1978; JARRET et al., 1978), em que as porcentagens observadas foram respectivamente de 19%, 51% e 30% nas mesmas regiões. Ainda não foi possível elucidar quais são os fatores que determinam as diferenças na frequência de aparecimento dos CCEs ao longo do TAS nesses bovinos.

Uma das correlações mais interessantes que pôde ser estabelecida neste estudo se deu entre a distribuição dos CCEs no TAS e o grau de diferenciação celular. A grande maioria dos CCEs da região cranial foram bem diferenciados (BD) e não foram observados CCEs pouco diferenciados (PD) naquela localização. Os CCEs-BD também foram os mais prevalentes nas regiões média e caudal. No entanto, a porcentagem de CCEs moderadamente diferenciados (MD) e PD foi mais expressiva nessas regiões. Particularmente na região caudal, os neoplasmas atingiram maior tamanho em centímetros, quando comparados com os CCEs de outras localizações no TAS. Este fato pode estar relacionado ao maior tempo entre o aparecimento do tumor e o diagnóstico clínico, principalmente no caso dos CCEs ruminais. Até o presente momento, não existem outros estudos abordando a relação entre a localização e o grau de diferenciação dos CCEs em bovinos para fins comparativos nesta discussão.

Considerando-se que o grau de diferenciação celular dado pela histopatologia é o principal parâmetro de avaliação do comportamento biológico dos CCEs (JANES & WATT, 2006), a correlação entre o grau de diferenciação, a localização do neoplasma e a ocorrência de metástases contribuiu muito para o estabelecimento de parâmetros adicionais da morfologia e da patogenia da doença. Neste estudo, observou-se que os CCEs da região cranial são, na grande maioria, BD e metastatizam menos em relação aos da região caudal, onde mais da metade dos CCEs são menos diferenciados (MD e PD).

Apesar das metástases dos CCEs serem consideradas pouco frequentes (TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 2000), elas ocorreram em quase 58% dos casos neste estudo, ultrapassando os índices de 20-40% relatados por outros autores (JARRET, 1978; HEAD et al., 2002). Comparando-se as Tabelas 5 e 6, observou-se que, dos 23 CCEs que metastatizaram, a invasão vascular linfática e/ou sangüínea somente pôde ser observada em oito secções dos CCEs primários analisados. A não observação de invasão vascular em todas as secções analisadas dos CCEs com metástases, não descarta a possibilidade de sua existência em outras áreas do tumor. As metástases por implantação das células tumorais ocorreram em quatro casos, sendo todos originados de CCEs ruminais. Nesses casos, a

invasão da camada serosa permitiu a liberação e o crescimento contíguo das células neoplásicas para o interior da cavidade abdominal.

A distribuição das metástases neste estudo esteve relacionada, na maioria das vezes, com as vias de drenagem linfática ou com a irrigação sanguínea normal. Nos CCEs da região cranial, a presença marcada de metástase em linfonodos retrofaríngeos pode ser simplesmente explicada por ele estar na região de drenagem linfática mais próxima (CONTRAN et al., 2000). A presença de êmbolos neoplásicos no interior dos seios subcapsulares da região cortical dos linfonodos retrofaríngeos deste estudo corroboram com esta observação.

As metástases dos CCEs localizados na região média também obedeceram ao padrão natural de drenagem linfática, ocorrendo para os linfonodos retro-esofágicos. No entanto, nos CCEs da região caudal, as metástases para linfonodos e para outros órgãos tiveram uma distribuição mais variada. Metástases para os linfonodos ocorreram para os de localização regional e extra-regional. Em dois casos, foi observado o envolvimento de linfonodos retrofaríngeos em bovinos com CCEs localizados apenas na entrada do rúmen (Bovinos 16 e 29).

Foram observados somente dois casos com metástase para o pulmão (Bovino 1, com CCE na entrada do rúmen e Bovino 18, com CCE na parede do rúmen). Possivelmente, estas metástases ocorreram pelas rotas hematogena ou linfo-hematogena, pois estas são as principais vias de acesso à circulação pulmonar (HEAD et al., 2002). Metástases para o fígado foram originadas apenas de CCEs localizados na região caudal (dois na entrada do rúmen e dois no rúmen). A invasão vascular venosa tem sido implicada como principal via de disseminação de metástases hepáticas, pois toda drenagem da área portal flui diretamente para o fígado (CONTRAN et al., 2000; HEAD et al., 2002).

Para poder alcançar o potencial metastático, as células neoplásicas devem primeiramente adquirir características migratórias e invasivas, que constituem a segunda maior evidência morfológica de malignidade (CONTRAN et al., 2000). A invasão até os limites vasculares permite às células neoplásicas um maior contato com o endotélio vascular e, conseqüentemente, auxilia na ocorrência de metástases (FRIEDL & WOLF, 2003). No caso dos CCEs, após a transformação dos queratinócitos normais em queratinócitos neoplásicos, o rompimento das junções intercelulares e a quebra da membrana basal dão início ao processo invasivo e migratório (CONTRAN et al., 2000; FRIEDL & WOLF, 2003; JANES & WATT, 2006). A formação de diferentes padrões morfológicos de migração e invasão é dada pela variação do repertório molecular presente nessas células (FRIEDL & WOLF, 2003). A movimentação pelo tecido do hospedeiro pode ser realizada através de movimentos coletivos

ou individuais, dependendo da expressão de moléculas de adesão (p.ex. caderinas e integrinas) e de proteases (p.ex. metalomatrix proteinases). A expressão dessas moléculas é dependente do grau de diferenciação celular que, como mencionado anteriormente, é o principal parâmetro de avaliação do comportamento biológico dos CCEs (JANES & WATT, 2006).

Neste estudo, a avaliação histomorfológica com o auxílio da técnica de imunistoquímica para citoqueratina e vimentina foi importante na graduação histológica, na avaliação dos padrões morfológicos de migração e invasão e na quantificação da reação desmoplásica, fatores esses implicados no comportamento biológico dos CCEs, como será discutido a seguir.

Como os queratinócitos normais estão ligados entre si e à membrana basal por moléculas de adesão (JANES & WATT, 2006), nos CCEs-BD essas moléculas provavelmente ainda são expressadas, permitindo que grupos de células neoplásicas ainda permaneçam juntas. A observação do predomínio do movimento coletivo nos CCEs-BD estudados sugere que cada ilha ou fita de queratinócitos neoplásicos aja como uma unidade funcional, através da produção autócrina e conjunta de fatores pró-migratórios (FRIEDL & WOLF, 2003). Nesse estudo, é proposto que o movimento coletivo nos tumores bem diferenciados seja o principal mecanismo de invasão e formação de metástases. Esta hipótese pôde ser comprovada nos CCEs-BD pela presença de um percentual metastático relativamente alto (44,44%) e pela presença de grandes ilhas neoplásicas no interior de vasos linfáticos e nas metástases para os linfonodos. Apesar de agregados pequenos e células individuais também estarem presentes em diversas secções dos CCEs-BD analisados, tem-se demonstrado que a infiltração de células individuais é raramente detectada (ou ausente) em tumores epiteliais bem diferenciados (FRIEDL & WOLF, 2003)

Como a diferenciação progressiva dos queratinócitos culmina na morte celular e na formação de um envelope insolúvel de queratina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; JANES & WATT, 2006), a presença de ilhas intensamente queratinizadas é o constituinte mais marcante dos CCEs-BD. No entanto, apesar da diferenciação terminal das células do epitélio esofágico acumular mais glicogênio quanto mais diferenciadas (JANES & WATT, 2006), ainda assim, ilhas neoplásicas bem queratinizadas estiveram presentes na maioria dos casos. Interessantemente, em alguns CCEs-MD do esôfago, a maioria das células neoplásicas eram intensamente vacuolizadas, o que possivelmente pode refletir o acentuado acúmulo de glicogênio em seu citoplasma.

Nos CCEs-MD, o padrão de migração e invasão foi bastante variado. A quantidade de ilhas moderadamente queratinizadas foi menor e houve um aumento na porcentagem de fitas, cordões e agregados, em relação aos CCEs-BD. Baseado no alto percentual de metástases dos CCEs-MD (75%), certamente a diversidade de padrões morfológicos de migração e invasão influenciou na sua característica invasiva e metastática.

A presença de agregados pequenos (até 5 células) e de células individuais em meio ao estroma tumoral foi a característica mais marcante dos CCEs-PD deste estudo. Este tipo de padrão morfológico segue o processo de desdiferenciação e por isso está sempre relacionado com um pior prognóstico (FRIEDL & WOLF, 2003). Vale salientar que a identificação precisa das células neoplásicas individuais, tanto com seus formatos redondos (amebóides) e alongados (fusiformes), nos CCEs deste estudo, só foi possível através do uso da técnica de imunoistoquímica para citoqueratina. A observação de grande quantidade de células individuais nos CCEs-PD é provavelmente um indicativo de pior prognóstico, uma vez que todos CCEs-PD metastatizaram.

O padrão alongado de migração individual foi principalmente observado nos CCEs-PD. A pouca diferenciação das células neoplásicas permite a expressão de integrinas apenas nas regiões apicais do citoplasma (FRIEDL & WOLF, 2003; JANES & WATT, 2006). Os invadópodes, por sua vez, movimentam-se progressivamente, deixando a célula com a aparência de célula fusiforme (FRIEDL & WOLF, 2003). Células epiteliais neoplásicas com esta morfologia dificilmente são detectadas em secções coradas pela hematoxilina-eosina, pois facilmente se confundem com os fibroblastos estromais. A utilização da imunoistoquímica para citoqueratina foi crucial para a sua individualização, quantificação e também para o reconhecimento de sua origem epitelial.

A transição epitelial a mesenquimal (EMT) consiste no processo de desdiferenciação, em que as células epiteliais neoplásicas regridem em seu grau de diferenciação e adquirem a capacidade de se transformar em células com fenótipo mesenquimal capazes até de produzir vimentina *de novo* (THIERY, 2002). A imunomarcção para vimentina nos CCEs deste estudo não poderia contribuir para confirmar uma possível expressão de vimentina pelas células epiteliais neoplásicas fusiformes, pois não haveria como diferenciá-las visualmente dos fibroblatos estromais fortemente imunomarcados para vimentina. No entanto, nos tumores epiteliais altamente desmoplásicos, como os CCEs-PD presentes neste estudo, acredita-se que parte da reação desmoplásica seja constituída de células fusiformes que seguiram o processo de EMT (THIERY, 2002; FRIEDL & WOLF, 2003). Uma vez que o tumor tenha atingido o

estágio de células individuais e de desdiferenciação, o potencial metastático é sempre aumentado, resultando em um pior prognóstico (FRIEDL & WOLF, 2003).

De acordo com a literatura consultada, a presença de CCEs formando-se a partir do epitélio ductal de glândulas salivares nunca havia sido relatada nos casos de intoxicação crônica por samambaia. Isto sugere a ação direta dos princípios tóxicos da planta, sem a aparente transição de queratinócitos em proliferação benigna (papilomas induzidos pelo papilomavírus bovino tipo 4 – BPV-4) para proliferação maligna (papilomas em transformação para CCE), como evidenciado morfológicamente no TAS por outros autores (JARRET, 1978; JARRET et al., 1978; MOREIRA SOUTO et al., 2006). Este achado suporta a teoria sugerida por FENWICK (1988) de que a ativação do ptaquilosídeo norsesquiterpeno a um princípio carcinógeno-mutágeno (dienona instável) é realizada através da presença de pH alcalino, como o presente na saliva.

Somando-se às evidências morfológicas relatadas por MOREIRA SOUTO et al. (2006), em que a origem de queratinócitos neoplásicos malignos foi tanto de papilomas em transformação para CCEs, quanto a partir do epitélio de revestimento do TAS (independente da presença local de papilomas), o achado de queratinócitos neoplásicos malignos originando-se do epitélio ductal salivar (talvez passando por um estágio prévio de metaplasia escamosa) poderia constituir uma terceira fonte de células neoplásicas malignas para a formação dos CCEs da região cranial do TAS. Cabe salientar que estas evidências morfológicas de transformação maligna do epitélio ductal foram observadas em apenas um CCE-BD (Bovino 10 com CCE na epiglote) e em um MD (Bovino 5 com CCE na faringe/orofaringe).

A avaliação imunoistoquímica para diferentes tipos específicos de citoqueratinas, por exemplo o uso das citoqueratinas 8/18, que são específicas de epitélios glandulares/ductais e incomuns (ou raras) no epitélio estratificado maduro (FILLIES et al., 2006), poderia ser uma ferramenta útil na distinção da origem dos CCEs nestes casos. Recentemente, FILLIES et al. (2006) observaram que a expressão das citoqueratinas 8/18 nos queratinócitos neoplásicos está correlacionada com um pior prognóstico em CCEs de cavidade oral em humanos.

A presença de necrose tumoral e de queratina livre no estroma foi uma importante característica dos CCEs-BD. Reação granulomatosa a essa queratina se fez presente na maioria dos casos estudados. Entretanto, em alguns CCEs-BD ou MD, células gigantes do tipo corpo estranho estavam presentes no interior das ilhas, sem aparente ocorrência de necrose epitelial e queratina livre nas seções analisadas. É possível que a necrose estivesse presente em áreas contíguas, porém, fora do campo de observação. No entanto, a presença de

histiócitos e de células gigantes por entre as camadas de células neoplásicas sugerem a possibilidade de exocitose celular para o interior dessas ilhas queratinizadas.

O microambiente tumoral é constituído pelas células e moléculas presentes no estroma dos tumores (DVORAK, 1986; BISSELL & RADISKY, 2001; COUSSENS & WERB, 2002). Infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) no estroma estava presente em todos os CCEs analisados no presente estudo. A observação de que o IILP associado aos tumores foi mais acentuado nos CCEs-BD do que nos MD e PD, sugere diversos mecanismos interligados responsáveis por sua formação. A vigilância imunológica e a tentativa do organismo de conter o crescimento neoplásico (TIZARD, 2004a) poderiam explicar, em parte, a formação desses extensos infiltrados peritumorais nos CCE-BD. Similarmente, a presença de extensos infiltrados inflamatórios (principalmente de linfócitos, plasmócitos e macrófagos) em carcinomas de mama e em carcinomas gástricos e colorretais em humanos estão associadas a um melhor prognóstico (MISDORP, 2002; DE VISSER et al., 2006). No presente estudo, o grande número de CCEs-PD contendo infiltrado inflamatório leve poderia sugerir que estes neoplasmas possam ser constituídos por uma subpopulação de células com menor antigenicidade aparente.

No entanto, somente os mecanismos de defesa não explicam por completo a variação de intensidade da inflamação em cada grau de diferenciação. Nos CCEs, o papel das integrinas e sua ação no microambiente foi proposto para explicar a variação da intensidade do infiltrado inflamatório nos diferentes graus de diferenciação (JANES & WATT, 2006). Em um epitélio normal, a expressão de integrinas é confinada à camada de células basais. Entretanto, quando o epitélio se torna hiperproliferativo (como nos neoplasmas e na cicatrização), as integrinas também são expressadas em células das camadas suprabasais. Essa expressão aumentada também induz uma produção aumentada de interleucina-1 α (IL-1 α) pela própria célula que, além de estimular a proliferação autócrina das células neoplásicas, promovem a quimiotaxia de linfócitos T, células dendríticas e neutrófilos (COUSSENS & WERB, 2002; JANES & WATT, 2006).

Se existem mecanismos de defesa criados para erradicar as células neoplásicas, por que elas mesmas estariam recrutando as células do sistema imune? Uma explicação plausível para que as células neoplásicas escapem do mecanismo de vigilância imunológica é que o microambiente neoplásico deva favorecer um estado inflamatório pró-tumorigênico crônico, ao contrário daquele que representa uma resposta anti-tumoral aguda (DE VISSER et al., 2006). Apesar de parecer contraditório, diversos estudos têm apontado a inflamação como um importante componente na progressão tumoral. Recentes estudos *in vitro*, em combinação

com uma vasta quantidade de estudos *in vivo*, suportam a teoria de que o desenvolvimento dos tumores depende da habilidade das células neoplásicas de seqüestrar e explorar os recursos dos processos fisiológicos do hospedeiro (KALLURI & ZEISBERG, 2006; DE VISSER et al., 2006).

O recrutamento do sistema imune através da liberação de citocinas e quimiocinas pode ser o mecanismo encontrado pelos queratinócitos neoplásicos na progressão tumoral, principalmente nos CCEs-BD. A secreção de enzimas proteolíticas e de fatores de crescimento pelas células inflamatórias auxiliaria na proliferação e na invasão tumoral, uma vez que as células neoplásicas malignas bem diferenciadas ainda não teriam dano genético suficiente para desenvolver um fenótipo tão invasivo-metastático, como teriam as dos CCEs-PD. Além disso, os estímulos à angiogênese e à linfangiogênese produzidos pelas células inflamatórias são importantes fatores para nutrição do neoplasma e para o desenvolvimento de metástases (DE VISSER et al., 2006).

Um outro componente celular, a eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE), presente no microambiente tumoral dos CCEs tem sido implicado como fator prognóstico em diversos estudos em humanos (DORTA, 2000; DORTA et al., 2002; SAID et al., 2005). Os eosinófilos nos CCEs deste estudo foram encontrados sempre em associação ao IILP peritumoral, e esta associação foi estatisticamente significativa. Todas as demais associações testadas, incluindo localização do CCE, idade dos bovinos, grau de diferenciação celular, ocorrência de metástases, presença de necrose e de queratina livre intratumoral e intensidade da desmoplasia não foram estatisticamente significativas. A relação positiva da intensidade da TATE com a intensidade do IILP, como vista neste estudo, também foi observada por SASSLER, et al. (1995) e DORTA (2000). Nestes estudos, a associação entre os dois infiltrados foi explicada pelos mecanismos quimiotáticos produzidos pelos linfócitos T. A produção de diversos fatores, como as interleucinas (IL) 2, 5, 6 e o fator estimulador de colônia granulocítico-monocítico, fazem parte dos diversos mecanismos de atração de eosinófilos. No entanto, a IL-5, produzida especificamente pelos linfócitos T auxiliares, é a principal quimiocina envolvida na quimiotaxia de eosinófilos. Além disso, a IL-4, que também é produzida pelos linfócitos T, parece regular a expressão da molécula de adesão celular-vascular -1 (*vascular-cell adhesion molecule 1* – VCAM-1), aumentando a transmigração de eosinófilos, linfócitos e monócitos.

Diversos outros parâmetros morfológicos e epidemiológicos têm sido associados à presença da TATE e ao prognóstico dos pacientes (conforme a Tabela 2, da Revisão de Literatura). Adicionalmente, MURPHY et al. (1993) sugeriram que a presença da TATE nos

CCEs fosse em decorrência da presença de queratina livre no estroma tumoral. No entanto, nenhuma outra publicação revisada mencionou com esta hipótese.

No caso do microambiente tumoral, acredita-se que a produção de fatores quimiotáticos para eosinófilos possa ser produzida também pelas células neoplásicas. O papel dos eosinófilos no processo patológico vai além da sua função moduladora e citolítica. Os eosinófilos estão envolvidos em diversas doenças que levam a um quadro crônico de fibrose (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004). É sugerida que a interação dos eosinófilos com os fibroblastos e com as células endoteliais também seja a responsável pela angiogênese e progressão tumoral (WARDLAW, 1994; DORTA, 2000).

Os fibroblastos associados aos carcinomas (*carcinoma associated fibroblasts* – CAF) também fazem parte do microambiente tumoral (DVORAK, 1986; KALLURI & ZEISBERG, 2006). Nos carcinomas invasivos, como os CCEs deste estudo, a proliferação neoplásica estava frequentemente associada à expansão do estroma tumoral, através do aumento do número de fibroblastos e da deposição de matriz extracelular (*extracellular matrix* – ECM), fenômeno denominado de reação desmoplásica.

Após a ativação dos fibroblastos pelas células neoplásicas e inflamatórias, um maior influxo de CAFs se faz presente no estroma (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Essa resposta aumentada de CAFs pode compreender a maior parte da massa tumoral de muitos carcinomas, como foi observado nos CCEs-PD deste estudo. O papel dos CAFs nos CCEs é amplo e provavelmente deve estar relacionado com a comunicação entre as células neoplásicas e o estroma tumoral (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Após a deposição alterada de proteínas no estroma pelos CAFs, a alteração no microambiente da ECM potencializa ainda mais os sinais pró-oncogênicos, o que acelera a progressão tumoral (COUSSENS & WERB, 2002). Os fibroblastos medeiam a resposta inflamatória pela secreção de citocinas, proteases e fatores de crescimento que diretamente estimulam a invasão e a proliferação das células neoplásicas (COUSSENS & WERB, 2002; KALLURI & ZEISBERG, 2006). No presente estudo, a reação desmoplásica foi mais acentuada nos CCEs-PD, quando comparados com os CCEs-BD e MD. Esse fator pode constituir-se indiretamente, portanto, em um fator indicativo de pior prognóstico nos CCEs.

As variações morfológicas encontradas nos CCEs são reflexos das alterações genotípicas juntamente com a influência do microambiente. Além das alterações na expressão e produção de proteínas, o dano permanente e hereditário no DNA influencia também a taxa de proliferação das células (CONTRAN et al., 2000; CULLEN et al., 2002). No nível

molecular, o dano genético aliado à instabilidade cromossômica e à velocidade de replicação clonal são as bases da heterogeneidade e da progressão tumoral (CONTRAN et al., 2000).

Nos CCEs deste estudo, a taxa de proliferação celular foi medida através da impregnação por prata das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (*argyrophilic nucleolar organizer regions* – AgNORs). Como as AgNORs estão relacionadas com a síntese de DNA ribossomal (rDNA) e com as atividades metabólicas, seu tamanho e número são utilizados para refletir a atividade nuclear, sendo valiosos indicativos de prognóstico (MADEWELL, 2001; OLIVEIRA et al., 2005). A contagem média (mAgNOR) ainda é o melhor método de mensuração das AgNORs e tem sido utilizada como fator prognóstico em diversos estudos em animais e humanos (XIE et al., 1999; MADEWELL, 2001; OLIVEIRA et al., 2005). A contagem de mAgNORs nos CCEs de bovinos intoxicados por samambaia não havia sido relatada até o presente momento. A mAgNOR alta dos CCEs-PD, aliada a alta significância estatística dos resultados, reflete sua maior taxa proliferativa em relação às mAgNORs dos CCEs-BD e MD. Conseqüentemente, como o grau de diferenciação está relacionado com o prognóstico, pode-se afirmar que o número de AgNORs também é um fator prognóstico para os CCEs deste estudo.

Nos CCEs-BD, observou-se uma alta variação entre o número mínimo e máximo de AgNORs. Essa variação ocorreu porque, em dois casos (Bovinos 23 e 37), as ilhas típicas de CCEs-BD tinham poucas camadas de células circundando extensas lamelas de queratina. Essas células tinham morfologia semelhante à das células basais do epitélio estratificado. Como a camada basal é a única que mantém as características proliferativas em um epitélio normal, seu número de AgNORs normalmente é maior. Portanto, a contagem de AgNORs nesses dois bovinos deu um número de AgNORs alto, aumentando assim o limite máximo e o número médio de AgNORs. Apesar desta variação, a comparação entre as mAgNORs dos CCEs de diferentes graus de diferenciação foi estatisticamente significativa.

Em humanos, esse mesmo padrão de correlação tem sido observado nos CCEs de cabeça e pescoço (XIE et al., 1999; MADEWELL, 2001; ROMÃO-CORRÊA et al., 2005). OLIVEIRA et al. (2005) encontraram números médios de AgNORs superiores aos encontrados neste estudo. A diferença entre as espécies animais e na metodologia de contagem das AgNORs possivelmente influenciaram na diferença entre os resultados numéricos. A presença de NORs de tamanhos e formatos variados, a ausência de um critério pré-estabelecido na avaliação e a subjetividade da graduação histológica também parecem influenciar no resultado final, tanto nos CCEs de animais quanto de humanos (PLOTON et al., 1986; MADEWELL, 2001; OLIVEIRA et al., 2005). A contagem através da análise

computadorizada de imagem e/ou o uso concomitante da imunohistoquímica com marcadores de proliferação celular, tais como o PCNA e o Ki-67, poderão auxiliar na determinação da taxa de proliferação celular dos CCEs do TAS de bovinos intoxicados cronicamente por samambaia.

6 CONCLUSÃO

1. Os carcinomas de células escamosas (CCEs) do trato alimentar superior (TAS) de bovinos intoxicados espontaneamente por *Pteridium aquilinum* são proporcionalmente mais bem diferenciados na região cranial, quando comparados com as regiões média e caudal.
2. O grau de diferenciação é o principal parâmetro de avaliação do comportamento biológico dos CCEs no TAS, visto que o percentual de metástases foi maior nos carcinomas menos diferenciados.
3. As metástases dos CCEs localizados na região cranial e média foram para linfonodos regionais, enquanto que as da região caudal foram mais variáveis quanto a sua distribuição.
4. A invasão é uma das características histomorfológicas mais marcantes dos CCEs do TAS e os padrões morfológicos de migração e invasão estão relacionados com o grau de diferenciação celular.
5. Os CCEs bem diferenciados (CCEs-BD) caracterizam-se pelos padrões de migração/invasão coletivos, enquanto que os CCEs menos diferenciados utilizam principalmente o padrão individual.
6. O infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) peritumoral e a reação desmoplásica são componentes constantes dos CCEs.
7. A intensidade da desmoplasia também é relacionada com o grau de diferenciação celular e é mais acentuada nos CCEs pouco diferenciados.
8. A intensidade da eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE) está altamente relacionada com a intensidade do IILP, e ambas são mais acentuadas nos CCEs-BD.
9. O número de AgNORs foi estatisticamente correlacionado com o grau de diferenciação celular, constituindo-se num parâmetro adicional na graduação histológica de CCEs de bovinos intoxicados por *Pteridium aquilinum*.

7 REFERÊNCIAS

BARCELLOS-HOFF, M.H.; PARK, C.; WRIGHT, E.G. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat.Rev.Cancer*, v.5, n.11, p.867-875, 2005.

BENISTON, R.G.; CAMPO, M.S. Quercetin elevates p27(Kip1) and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. *Oncogene*, v.22, n.35, p.5504-5514, 2003.

BENISTON, R.G. et al. Synergism between papillomavirus and quercetin significance of quercetin-induced C1 arrest for cellular transformation. In: PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. 1999, Manchester. **Anais...** International Bracken Group, 1999. p. 123-127.

BENISTON, R.G. et al. Quercetin, E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. *Carcinogenesis*, v.22, n.7, p.1069-1076, 2001.

BIERIE, B.; MOSES, H.L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat.Rev.Cancer*, v.6, n.7, p.506-520, 2006.

BISSELL, M.J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. *Nat.Rev.Cancer*, v.1, n.46-54, 2001.

BOSTOCK, D.E. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br.J.Cancer*, v.59, n.6, p.915-918, 1989.

BRABLETZ, T. et al. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat.Rev.Cancer*, v.5, n.9, p.744-749, 2005.

BRATULIC, M. et al. Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus--prognostic value in canine mammary tumors. *Vet.Pathol.*, v.33, n.5, p.527-532, 1996.

CAIRNEY, M.; CAMPO, M.S. The synergism between bovine papillomavirus type 4 and quercetin is dependent on the timing of exposure. *Carcinogenesis*, v.16, n.8, p.1997-2001, 1995.

CAMPO, M.S. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In:

PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL.1999, Manchester. **Anais...** International Bracken Group, 1999. p. 116-122.

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

CONNOLLY, J.A. et al. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. *Oncogene*, v.16, n.21, p.2739-2746, 1998.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: **Robbins: patologia estrutural e funcional**. Sexta ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, 2000. cap. 8, p. 233-295.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v.420, n.6917, p.860-867, 2002.

CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. In: MEUTEN, D.J. **Tumours in domestic animals**. 4th ed. Iowa, USA: Iowa State Press, 2002. cap. 1, p. 3-44.

DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat.Rev.Cancer*, v.6, n.1, p.24-37, 2006.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesq.Agropec.Bras.*, v.2, n.489-504, 1967.

DOLBERG, D.S.; BISSELL, M.J. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature*, v.309, n.5968, p.552-556, 1984.

DOLBERG, D.S. et al. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science*, v.230, n.4726, p.676-678, 1985.

DORTA, R.G. **Eosinofilia tecidual como fator de prognóstico em carcinomas espinocelulares de boca**.2000. 110f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2000.

DORTA, R.G. et al. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology*, v.41, n.2, p.152-157, 2002.

DVORAK, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N.Engl.J.Med.*, v.315, n.26, p.1650-1659, 1986.

ERCAN, I. et al. Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in cancer of the larynx. *Otolaryngol.Head Neck Surg.*, v.132, n.6, p.869-873, 2005.

EVANS, I.A. The radiomimetic nature of bracken toxin. *Cancer Res.*, v.28, n.11, p.2252-2261, 1968.

EVANS, I.A. Bracken carcinogenicity. *Res.Vet.Sci.*, v.26, n.3, p.339-348, 1979.

FENWICK, G.R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) toxic effects and toxic constituents. *Journal Science Food and Agriculture*, v.46, n.147-173, 1988.

FILLIES, T. et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer*, v.6, n.1, p.10-2006.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat.Rev.Cancer*, v.3, n.5, p.362-374, 2003.

GAVA, A. Intoxicação por *Pteridium aquilinum*. In: RIET-CORRÊA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. **Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos**. 2 ed. Pelotas, RS: Editora Hemisfério Sul, 1993. p. 247-258.

GAVA, A. et al. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in southern Brazil. *Vet.Hum.Toxicol.*, v.44, n.6, p.362-365, 2002.

GULER, N. et al. Expression of Fas and Fas-ligand and analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions in squamous cell carcinoma: relationships with tumor stage and grade, and apoptosis. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.*, v.34, n.8, p.900-906, 2005.

HEAD, K.W.; ELSE, R.W.; DUBIELZIG, R.R. Tumours of the alimentary tract. In: MEUTEN, D.J. **Tumours in domestic animals**. 4th ed. Iowa, USA: Iowa State Press, 2002. cap. 8, p. 401-482.

JACKSON, M.E. et al. The B subgroup bovine papillomaviruses lack an identifiable E6 open reading frame. *Mol.Carcinog.*, v.4, n.5, p.382-387, 1991.

JAGGAR, R.T. et al. Cooperation between bovine papillomavirus type 4 and ras in the morphological transformation of primary bovine fibroblasts. *J.Gen.Virol.*, v.71 (Pt 12), n.3041-3046, 1990.

JANES, S.M.; WATT, F.M. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat.Rev.Cancer*, v.6, n.3, p.175-183, 2006.

JARRET, W.F. Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma of cattle. *Bulletin of Cancer*, v.65, n.2, p.191-194, 1978.

JARRET, W.F. et al. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. *Nature*, v.274, n.215-217, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Células do sangue. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Nona ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 12, p. 192-220.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. *Nat.Rev.Cancer*, v.6, n.5, p.392-401, 2006.

KRAVIS, L.D. et al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, v.209, n.8, p.1418-1420, 1996.

LIOTTA, L.A.; KOHN, E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, v.411, n.6835, p.375-379, 2001.

LOHR, C.V. et al. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet.Pathol.*, v.34, n.3, p.212-221, 1997.

MADEWELL, B.R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J.Vet.Intern.Med.*, v.15, n.4, p.334-340, 2001.

MCKEE, P.H. Malignant epidermal tumors. In: **Essential skin pathology**. London: Mosby International Ltd., 1999. cap. 16, p. 141-152.

MERLO, L.M. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat.Rev.Cancer*, v.2006.

MINTZ, B.; ILLMENSEE, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v.72, n.9, p.3585-3589, 1975.

MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, 2002. cap. 12, p. 575-606.

MONTOYA, L.C.C. et al. Análisis del marcador tisular AgNOR en leucoplasia y carcinoma escamocelular oral. *Medicina Oral*, v.7, n.1, p.17-25, 2001.

MOREIRA SOUTO, M.A. **Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*)**2005. 139f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.

MOREIRA SOUTO, M.A. et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). *Pesq.Vet.Bras.*, v.26, n.2, p.112-122, 2006.

MUNITZ, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy*, v.59, n.3, p.268-275, 2004.

MURPHY, W.M.; GRIGNON, D.J.; PERLMAN, E.J. **Tumours of the kidney, bladder, and related urinary structures (AFIP Atlas of Tumor Pathology)**: Philadelphia, PA: Armed Forces Institute of Pathology. 4th ed., 2004, 394p.

MUSONDA, C.A.; CHIPMAN, J.K. Carcinogenic and anti-carcinogenic potential of quercetin. In: PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL.1999, Manchester. **Anais...** International Bracken Group, 1999. p. 106-115.

OLIVEIRA, M.G. et al. Tongue squamous cell carcinoma: relationship between argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORS) and histopathologic grading. *Applied Cancer Research*, v.25, n.1, p.20-24, 2005.

OVERALL, C.M.; KLEIFELD, O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer*, v.6, n.3, p.227-239, 2006.

OZAKI, K. et al. T-cell lymphoma with eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs. *Vet.Pathol.*, v.43, n.3, p.339-344, 2006.

PAMUKCU, A.M. et al. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.*, v.40, n.10, p.3468-3472, 1980.

PEIXOTO, P.V. et al. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. *Pesq.Vet.Bras.*, v.23, n.2, p.65-81, 2003.

PENNIE, W.D.; CAMPO, M.S. Synergism between bovine papillomavirus type 4 and the flavonoid quercetin in cell transformation in vitro. *Virology*, v.190, n.2, p.861-865, 1992.

PENNIE, W.D. et al. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology*, v.193, n.2, p.614-620, 1993.

PILLAI, K.R. et al. Significance of silver-stained nucleolar organizer regions in early diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *In Vivo*, v.19, n.4, p.807-812, 2005.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem.J.*, v.18, n.1, p.5-14, 1986.

POLACK, E.W. **Toxicidade da *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn no Estado do Paraná: estudo epidemiológico e anátomo-patológico e utilização da técnica de peroxidase-antiperoxidase na pesquisa do papilomavírus em lesões atribuídas à ingestão da planta em bovinos.**1990. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1990.

POTTER, D.M. The *Pterodaceae* as a source of compounds with pharmaceutical activity. In: PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL.1999, Manchester. **Anais...** International Bracken Group, 1999. p. 60-67.

PRICE, J.T.; BONOVICH, M.T.; KOHN, E.C. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.*, v.32, n.3, p.175-253, 1997.

RECH, R.R. **Mastócitos em condições normais e patológicas com ênfase em mastocitomas de cães**2003. 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2003.

ROMÃO-CORRÊA, R.F. et al. Nucleolar organizer region staining patterns in paraffin-embedded tissue cells from human skin cancers. *J.Cutan.Pathol.*, v.32, n.323-328, 2005.

SAID, M. et al. Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. *BMC.Clin.Pathol.*, v.5, n.1, p.1-2005.

SIMOES, J.P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet.Pathol.*, v.31, n.6, p.637-647, 1994.

SMITH, B.L.; LAUREN, D.R.; PRAKASH, A.S. Bracken fern (*Pteridium*): Toxicity in animal and human health. In: PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. 1999, Manchester. **Anais...** International Bracken Group, 1999. p. 76-85.

STACKER, S.A. et al. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat.Rev.Cancer*, v.2, n.8, p.573-583, 2002.

STEEG, P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat.Med.*, v.12, n.8, p.895-904, 2006.

THIERY, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat.Rev.Cancer*, v.2, n.6, p.442-454, 2002.

TIZARD, I.R. Resistance to tumours. In: TIZARD, I.R. **Veterinary immunology: an introduction**. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2004a. cap. 31, p. 364-377.

TIZARD, I.R. Type I hypersensitivity. In: TIZARD, I.R. **Veterinary immunology: an introduction**. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2004b. cap. 26, p. 308-323.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C.F.C. Ocorrência de hematúria enzoótica e carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. II. Estudos complementares. *Pesq.Agropec.Bras.*, v.4, n.209-224, 1969.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; DA SILVA, M.F. Plantas tóxicas conhecidas em outras regiões do Brasil, e que ocorre também na região amazônica, onde, porém, são de menor importância: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. In: **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus, AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1979. p. 49-58.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Plantas de ação radiomimética. In: **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Helianthus, 2000. cap. Iia, p. 178-187.

WARDLAW, A.J. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad.Med.J.*, v.70, n.826, p.536-552, 1994.

WOLF, K. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J.Cell Biol.*, v.160, n.2, p.267-277, 2003.

WYNN, T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat.Rev.Immunol.*, v.4, n.8, p.583-594, 2004.

XIE, X. et al. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.*, v.35, n.5, p.502-509, 1999.

ZENG, Q. et al. Hepatocyte Growth Factor Inhibits Anoikis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells by Activation of ERK and Akt Signaling Independent of NFkappa B. *Journal of Biological Chemistry*, v.277, n.28, p.25203-25208, 2002.

APÊNDICE A – DADOS DE RESENHA DOS 40 BOVINOS

Bovino nº (protocolo)	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tipo e data da morte	Propriedade de origem	Procedência
01 (Vn-263-03)	4	F	Cruza Holandês	ESP 24/09/2003	A	Chapadão, Jaguari
02 (Vn-264-03)	7	F	Mista	EUT 25/09/2003	B	Fontana Freda, Jaguari
03 (Vn-357-03)	13	F	Mista	EUT 20/11/2003	C	Jaguarzinho Jaguari
04 (Vn-401-03)	7	F	Cruza Charolês	EUT 19/12/2003	D	Panelão, Jaguari
05 (Vn-11-04)	6	F	Mista	EUT 15/01/2004	E	Panelão, Jaguari
06 (Vn-29-04)	8	MC	Mista	EUT 17/02/2004	F*	Linha 15, Jaguari
07 (Vn-30-04)	8	F	Holandês	EUT 17/02/2004	G	Chapadão, Jaguari
08 (V-138-04)	11	F	Mista	EUT 02/03/2004	H*	Fontana Freda, Jaguari
09 (V-165-04)	9	F	Mista	EUT 05/03/2004	I	Boca da Picada, Jaguari
10 (Vn-50-04)	5	F	Mista	EUT 11/03/2004	H*	Fontana Freda, Jaguari
11 (Vn-51-04)	5	F	Mista	EUT 11/03/2004	F*	Linha 15, Jaguari
12 (Vn-78-04)	6	F	Cruza Nelore	EUT 30/03/2004	J	Rincão dos Cadó, Nova Esperança do Sul
13 (Vn-80-04)	8	F	Cruza Nelore	EUT 30/03/2004	K	Santo Antônio, Jaguari
14 (Vn-113-04)	7	MC	Mista	EUT 24/04/2004	L	Marmeleiro, Estrada Fontana, Jaguari
15 (V-495-04)	3	MC	Cruza Nelore	EUT 08/06/2004	M	Jaguarzinho Jaguari

Bovino nº (protocolo)	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tipo e data da morte	Propriedade de origem	Procedência
16 (Vn-185-04)	7	F	Mista	EUT 17/06/2004	N	Linha 6, Jaguari
17 (Vn-221-04)	7	F	Cruza Charolês	EUT 13/07/2004	O	Sanga D'areia, Jaguari
18 (V-637-04)	11	MC	Mista	EUT 26/07/2004	P	Linha 13, Jaguari
19 (Vn-300-04)	7	F	Mista	EUT 08/09/2004	Q	São Miguel, Jaguari
20 (Vn-302-04)	10	F	Mista	EUT 08/09/2004	R	São João, Nova Esperança do Sul
21 (Vn-305-04)	8	F	Mista	EUT 14/09/2004	S	Marmeleiro, Jaguari
22 (Vn-366-04)	10	F	Mista	EUT 04/11/2004	T	São Luiz, Nova Esperança do Sul
23 (Vn-367-04)	8	F	Mista	ESP 05/11/2004	U	Linha 15, Jaguari
24 (Vn-373-04)	9	F	Mista	EUT 08/11/2004	V**	Linha 06, Jaguari
25 (Vn-428-04)	9	F	Mista	EUT 21/12/2004	W	Chapadão, Jaguari
26 (V-431-05)	8	F	Jersey	EUT 04/05/2005	X	Chapãozinho Jaguari
27 (V-475-05)	13	F	Mista	EUT 18/05/2005	H*	Fontana Freda, Jaguari
28 (V-476-05)	8	F	Mista	EUT 16/05/2005	Y	Linha 13, Jaguari
29 (V-507-05)	6	F	Mista	EUT 24/05/2005	Z	Caixa d'Água, Jaguari
30 (V-666-05)	8	F	Mista	EUT 01/08/2005	Z1	Nova Esperança do Sul

Bovino nº (protocolo)	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tipo e data da morte	Propriedade de origem	Procedência
31 (V-738-05)	9	F	Mista	EUT 17/08/2005	Z2	Caixa D'Água, Jaguari
32 (V-882-05)	10	F	Cruza Jersey	EUT 04/10/2005	Z3	Fontana Freda, Jaguari
33 (V-003-06)	9	F	Cruza Nelore	EUT 02/01/2006	Z4	Marmeleiro, Jaguari
34 (V-449-06)	5	F	Mista	EUT 02/05/2006	Z5	Linha 7, Jaguari
35 (V-466-06)	4	F	Cruza Indo- Brasil	EUT 05/05/2006	Z6	Ijucapirama, Jaguari
36 (V-544-06)	8	F	Mista	EUT 27/05/2006	Z7	Jaguarizinho, Jaguari
37 (V-545-06)	8	F	Cruza Nelore	EUT 23/05/2006	Z8	Linha 15, Jaguari
38 (V-590-06)	7	F	Mista	EUT 12/06/2006	Z9	Boca da Picada, Jaguari
39 (V-616-06)	8	F	Mista	EUT 27/06/2006	Z10	Marmeleiro, Jaguari
40 (V-617-06)	6	F	Mista	EUT 27/06/2006	Z11	Linha 20, Jaguari

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA

- 1) Cortes em lâminas silanizadas.
- 2) Desparafinização e hidratação:
 - Xilol (em estufa a 60°C) – 30 min.
 - Xilol (frio) – 5 min.
 - Álcool absoluto – (2X) 1 min.
 - Álcool 96° – 1 min.
 - Álcool 90° – 30 seg.
 - Álcool 80° – 30 seg.
 - Álcool 70° – 1 min.
- 3) Lavar em água corrente – 3 min.
 - Lavar em água destilada – 1 min.
- 4) Bloqueio da peroxidase endógena c/ peróxido de hidrogênio (APÊNDICE C).
 - Tempo: 2x 10 min.
- 5) Lavar em água corrente – 10 min.
 - Lavar em água destilada – 1 min.
- 6) Recuperação antigênica em microondas c/ solução tampão Tris-EDTA em pH 9,0 (APÊNDICE C).
 - Tempo: 4x de 2,5 min em potência máxima.
 - Esfriar em “banho-maria” frio.
- 7) Lavar em água corrente – 5 min.
 - Lavar em água destilada – 1 min.
- 8) Bloqueio de avidina endógena com solução clara de ovo (APÊNDICE C).
 - Tempo: 15 min.
- 9) Lavar em água corrente – 3 min.
 - Lavar em água destilada – 1 min.
- 10) Bloqueio de ligações inespecíficas com solução de leite em pó a 5% em solução PBST (APÊNDICE C).
 - Temp: 30 min.
- 11) Lavar em água corrente – 3 min.
 - Lavar em água destilada – 1 min.
- 12) Solução PBST por 5 min. (no mínimo).

- 13) Anticorpo primário – pingar o anticorpo (Ac) diluído (em diluente de Ac) sobre os cortes (APÊNDICE C). Incubar “overnight” (15-18 horas) a 4° C em câmara úmida ou por 2 horas em estufa a 35°C em câmara úmida.
- 14) Lavar em PBST – 10 min (2x de 5 min).
- 15) LSAB gotas amarelas (Ac secundário + biotina).
Incubar por 30-35 min a 25° C (temperatura ambiente).
- 16) Retirar o excesso com PBST (frasco com bico aplicador).
Lavar em PBS (2x de 5 min, trocando o PBST).
- 17) LSAB gotas vermelhas (Streptavidin_HRP).
Incubar por 30-35 min a 25° C (temperatura ambiente).
- 18) Retirar o excesso com PBST (frasco com bico aplicador).
Lavar em PBST (2x de 5 min; trocando o PBST).
- 19) Solução reveladora DAB (APÊNDICE C).
Preparar em copo plástico descartável (manter no escuro).
Mergulhar por 2 min.
Parar a reação em água (copo plástico descartável).
Lavar em água corrente – no mínimo por 3 min.
- 20) Hematoxilina (recém-filtrada; no copo plástico) – 1 min.
Lavar em água corrente (até azular).
- 21) Desidratação e clarificação:
Álcool absoluto – rápido.
Álcool absoluto – rápido.
Álcool absoluto – rápido.
Xilol (clarificação) – até retirar excesso de álcool.
Xilol (montagem)
- 22) Montagem em meio sintético (Entelan®).

APÊNDICE C – FÓRMULAS DE SOLUÇÕES PARA IMUNOISTOQUÍMICA

1) Peróxido de hidrogênio a 3% (para bloqueio da peroxidase endógena):

- Água oxigenada comercial (10 volumes) – pingar sobre os cortes.

2) Solução tampão Tris-EDTA pH 9,0 (para recuperação antigênica):

- Tris (base) – 1,21g.
- EDTA – 0,37g.
- Água destilada – 1 litro.

3) Solução clara de ovo (para bloquear avidina endógena):

- Água destilada – copo de 200 ml
- 2 claras de ovo.
- Agitar a solução e filtrar o precipitado com gaze.

4) Solução de leite em pó desnatado a 5% em PBST (para bloqueio de ligações inespecíficas):

- 5g de leite em pó desnatado (Molico®)
- PBST – 100 ml.

5) Solução PBST pH7,2 (entre pH 7,0-7,6).

- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Na_2HPO_4) – 1,48g.
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (KH_2PO_4) – 0,43g.
- Cloreto de sódio (NaCl) – 7,2g.
- Água destilada – 1 litro.
- Tween 20 – 50 μl .

6) Solução reveladora (DAB):

- PBST – 120ml.
- DAB – 72 mg.
- Água oxigenada 3% - 1,2 ml.

Obs.: preparar a solução no momento do uso. Após o uso, inativar o DAB com hipoclorito de sódio até a solução ficar bem clara. O DAB deve ser manuseado com luvas.