

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

**MORFOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA DOS  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
ALIMENTARES ASSOCIADOS AO CONSUMO DE  
*Pteridium aquilinum* EM BOVINOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Eduardo Kenji Masuda**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**Morfologia e imunoistoquímica dos carcinomas de células  
escamosas alimentares associados ao consumo de *Pteridium  
aquilinum* em bovinos**

**por**

**Eduardo Kenji Masuda**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Glaucia Denise Kommers**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

M413m	Masuda, Eduardo Kenji, 1982- Morfologia e imunoistoquímica dos carcinomas de células escamosas alimentares associados ao consumo de Pteridium aquilinum em bovinos / por Eduardo Kenji Masuda ; orientador Glaucia Denise Kommers. – Santa Maria, 2007. 126 f. : il.  Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2007.  1. Medicina veterinária 2. Plantas tóxicas 3. Pteridium aquilinum 4. Carcinoma de células escamosas 5. Neoplasma alimentar 6. AgNOR 7. Imunoistoquímica 8. Doença de bovinos 9. Patologia I. Kommers, Glaucia Denise, orient. II. Título  CDU: 619:636.2
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por  
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

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

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

**MORFOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA DOS CARCINOMAS DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS ALIMENTARES ASSOCIADOS AO  
CONSUMO DE *Pteridium aquilinum* EM BOVINOS**

elaborada por  
**Eduardo Kenji Masuda**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Glaucia Denise Kommers, PhD**  
(Presidente/ Orientadora)

**Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD (UFSM)**

**Ana Lucia Schild, Dra (UFPel)**

Santa Maria, 9 de fevereiro de 2007.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe por sempre estar perto de mim em todos os momentos da vida. Sou grato pela educação, carinho, apoio e dedicação que fazem dela a pessoa mais importante que existe. Ao meu pai, agradeço por todos os ensinamentos que sempre orientaram minha vida, seu apoio incondicional, sua dedicação aos filhos e seu amor. Amo vocês mais do que tudo.

Agradeço a minha orientadora, mãe patológica, conselheira e amiga, prof<sup>a</sup>. Glaucia, que sempre esteve presente guiando e iluminando meu caminho. Palavras são incapazes de expressar minha gratidão por ti. Sou eternamente grato por você fazer parte de minha vida.

Agradeço ao meu melhor amigo Luciano por sua paciência nos meus dias de mau humor, seu respeito e companheirismo, deixando sempre a vida muito mais animada e completa.

A Lizana, pelo amor, carinho, compreensão e pelos melhores momentos que passei em Santa Maria.

Ao meus amigos do LPV, Adriano, Brenda, Tessie, Andy, Marione e Aline V., que sempre me deram força e me ajudaram na realização deste trabalho. Devo tudo a vocês, meus amigos. Sem vocês, eu e esse trabalho não existiriam. Agradeço também aos amigos Daniel, Dani e Mari pela amizade e pelas risadas entre um mate e outro no parque.

Agradeço a todos os professores do LPV (Claudio, Domi e Chico) que, apesar de todas as diferenças, são elas que os une e que mantêm o alto nível de excelência em todos os aspectos. Agradeço por todos os ensinamentos, carinho e confiança. Agradeço também aos colegas Raquel, Ricardo, Fighera, Tati, Marcia, Aline R. e Serginho que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento profissional.

Agradeço todos os dias a Deus por fazer existir e colocar no meu caminho todas essas maravilhosas pessoas que eu amo.

## RESUMO

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

### MORFOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ALIMENTARES ASSOCIADOS AO CONSUMO DE *Pteridium aquilinum* EM BOVINOS

AUTOR: EDUARDO KENJI MASUDA  
ORIENTADORA: GLAUCIA DENISE KOMMERS  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 9 de fevereiro de 2007.

Aspectos morfológicos, incluindo proliferação celular, e imunoistoquímicos de 40 carcinomas de células escamosas (CCEs) do trato alimentar superior de bovinos que consumiram samambaia (*Pteridium aquilinum*) espontaneamente foram estudados, visando principalmente determinar os fatores que influenciam o comportamento biológico destes neoplasmas. Os aspectos analisados incluíram localização anatômica dos CCEs, grau de diferenciação celular, ocorrência e distribuição de metástases, padrões de migração e invasão, intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP), da reação desmoplásica e da eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE), e o índice de proliferação celular avaliado através da contagem das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs). Quanto a localização anatômica, 42% dos CCEs localizaram-se na região cranial, 12,5% na média e 45% na caudal do trato alimentar superior (TAS). Os CCEs foram classificados quanto ao grau de diferenciação celular em bem (CCE-BD [67,5%]), moderadamente (CCE-MD [20%]) ou pouco diferenciados (CCE-PD [12,5%]). Quando relacionado o grau de diferenciação celular com a localização no TAS, verificou-se que na região cranial 88,2% eram CCEs-BD e 11,8% eram MD; na região média, 60% eram BD, 20% eram MD e 20% eram PD; na região caudal, 50% eram BD, 27,8% MD e 22,2% PD. Metástases ocorreram em 57,75% dos casos, principalmente para linfonodos regionais, e foram observadas em 58,82% dos CCEs na região cranial, em 40% dos da região média e em 61,11% dos da região caudal. Metástases para linfonodos regionais e/ou órgãos distantes foram encontradas em 44,44% dos CCEs-BD, em 75% dos MD e em 100% os PD. Foram analisados os padrões de migração e invasão com o auxílio da técnica de imunoistoquímica para citoqueratina. Nos CCEs-BD predominaram os padrões em ilhas e fitas de queratinócitos neoplásicos; nos MD os padrões variaram muito porém predominaram os agregados pequenos, fitas e cordões; nos PD predominaram os agregados e as células individuais. Invasão vascular linfática e/ou sangüinea foram observadas em 11/40 CCEs. Foram observados CCEs originando-se do epitélio dos ductos das glândulas salivares, aspecto este que não havia sido relatado anteriormente. Observou-se que a intensidade do IILP era muito mais acentuada nos CCEs-BD que nos MD e PD. A intensidade da reação desmoplásica foi quantificada através da imunoistoquímica para vimentina e foi muito mais acentuada nos CCEs-PD. A TATE foi medida nos CCEs quanto à intensidade em leve, moderada ou acentuada. A única associação positiva estatisticamente significativa foi estabelecida entre a intensidade da TATE e a do IILP. A proliferação celular foi avaliada quantitativamente através da contagem das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) nos queratinócitos neoplásicos. A média e o desvio padrão ( $\pm$ DP) de AgNORs nos CCEs BD foi de 1,65 ( $\pm$ 0,23), nos MD de 1,88 ( $\pm$ 0,31) e nos PD foi de 2,39 ( $\pm$ 0,26). A correlação entre o índice de AgNOR e cada grau de diferenciação celular foi estatisticamente significativa. Concluiu-se que os fatores que influenciaram no comportamento biológico dos CCEs foram o grau de diferenciação celular, os padrões de migração e invasão, a IILP, a TATE e da reação desmoplásica e o índice de proliferação celular avaliado através da contagem das AgNORs.

Palavras-Chave: plantas tóxicas, *Pteridium aquilinum*, carcinomas de células escamosas, neoplasmas alimentares, AgNOR, imunoistoquímica, doenças de bovinos, patologia.

## ABSTRACT

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

### MORPHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF ALIMENTARY SQUAMOUS CELL CARCINOMA ASSOCIATED WITH *Pteridium aquilinum* IN CATTLE

AUTHOR: EDUARDO KENJI MASUDA  
ADVISER: GLAUCIA DENISE KOMMERS  
Santa Maria, February 9th, 2007.

To determine the main factors influencing the biological behavior of 40 squamous cell carcinomas (SCC) of the upper digestive tract (UDT) of cattle associated with spontaneous ingestion of bracken fern (*Pteridium aquilinum*), morphological, including cell proliferation, and immunohistochemical aspects were studied. The aspects analyzed included anatomical localization of SCCs, degree of differentiation, occurrence and distribution of metastasis, intensity of the lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate (LPII), of the desmoplastic reaction, tumor-associated tissue eosinophilia, and the cell proliferation index evaluated through quantification of the argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs). Forty two percent of SCCs were in the cranial region, 12.5% in the middle, and 45% in the caudal region of the UDT. The neoplasms were classified as well differentiated (WD-SCC; 67.5%), moderately differentiated (MD-SCC; 20%), or poorly differentiated (PD-SCC; 12.5%). When the degree of differentiation was correlated to the anatomical localization, it was observed in the cranial region that 88.2% were WD-SCC and 11.8% were MD-SCC. In the middle region, 60% were WD-SCC, 20% were MD-SCC, and 20% were PD-SCC. In the caudal region, 50% were WD-SCC, 27.8% were MD-SCC, and 22.2% were PD-SCC. Metastasis occurred in 57.75% of the cases, mostly to regional lymph nodes, and were observed in 58.82% of the cases with SCCs of the cranial region; in 40% of the middle region, and in 61.11% of the caudal region. Metastasis to regional lymph nodes and/or to distant organs were found in 44.44% of WD-SCC, 75% of MD-SCC, and 100% of PD-SCC. Migration and invasion patterns were analyzed through the immunohistochemistry technique for cytokeratin. Islands and ribbons of neoplastic keratinocytes predominated in the WD-SCCs. The patterns varied greatly in the MD-SCCs, although small aggregates, ribbons, and cords predominated. PD-SCCs were characterized by small aggregates and individual cells. Lymphatic or hematogenous invasion were detected in 11/40 SCCs. There were SCCs originating from the ductal epithelium of the salivary glands. This finding was not previously reported. The intensity of the LPII was more accentuated in the WD-SCCs than in the MDs or PDs. The intensity of the desmoplastic reaction was quantified through the immunohistochemistry technique for vimentin, and was more severe in the PD-SCCs. The tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) was measured in the SCCs and classified as mild, moderate, or severe. The only positive statistically significant association was established between TATE and LPII intensities. Cell proliferation was evaluated through quantification of the argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) on the neoplastic keratinocytes. AgNOR mean value and standard deviation ( $\pm$ sd) for WD-SCCs were 1.65 ( $\pm$ 0.23), for MD-SCCs were 1.88 ( $\pm$ 0.31), and for PD-SCCs were 2.39 ( $\pm$ 0.26). The correlation between the AgNOR index and each histopathological grade was statistically significant. In conclusion, the factors which influenced the biological behavior of SCCs were the degree of cell differentiation, the patterns of migration and invasion, the intensity of LPII, TATE and desmoplastic reaction, and the cell proliferation index measured through quantification of the AgNORs.

Key Words: poisonous plants, *Pteridium aquilinum*, squamous cell carcinoma, alimentary neoplasms, AgNOR, immunohistochemistry, cattle diseases, pathology.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos pelos quais as células imunes regulam o desenvolvimento dos neoplasmas. Fonte: tabela adaptada de VISSER et al., 2006. ....	45
Tabela 2 – Lista de publicações relacionando a TATE e os diferentes fatores prognósticos em humanos. A metodologia utilizada em cada estudo também está apresentada. ....	52
Tabela 3 – Distribuição dos resultados gerais da idade e dos parâmetros histomorfológicos dos 40 bovinos analisados. ....	62
Tabela 4 – Relação entre a intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral e o grau de diferenciação dos CCEs no TAS. ....	68
Tabela 5 – Padrões morfológicos de migração e invasão, distribuídos quanto à presença e intensidade dentro dos graus de diferenciação dos CCEs. ....	70
Tabela 6 – Distribuição das metástases de acordo com a localização anatômica do CCE no TAS. ....	73
Tabela 7 – Relação entre a intensidade da eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE) e a intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP). ....	76

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Evolução clonal e a geração da heterogeneidade tumoral. Novos subclones originam-se da célula transformada original. Com o crescimento progressivo, a massa tumoral torna-se enriquecida dessas variantes que estão mais aptas à evasão do sistema imune do hospedeiro e com mais características de malignidade. Fonte: esquema adaptado de MISDORP et al. (2002) e CONTRAN et al., (2000). ..... 32

Esquema 2 – Mecanismos de invasão e migração das células tumorais. 1. Os queratinócitos neoplásicos estão aderidos uns aos outros por moléculas de adesão (E-Cads). A alteração genética e a expressão alterada dessas moléculas leva as células ao desenvolvimento de um fenótipo maligno (carcinoma “*in situ*”). Nesse estágio, as células ainda estão ligadas à membrana basal por intermédio de integrinas. 2. A invasão se inicia após a quebra da membrana basal e da matriz extracelular (ECM) por proteases (MMPs) provenientes dos queratinócitos neoplásicos ou dos fibroblastos em resposta à citocinas produzidas pelas células tumorais. A expressão de moléculas e receptores na superfície das células neoplásicas permite sua interação com a ECM, alterando a morfologia celular e permitindo um comportamento maligno. 3. A interação das integrinas com a ECM adjacente, através da formação de protrusões celulares (“*invadópodes*”), induz a proliferação celular, produção de MMPs e a movimentação progressiva. O corpo celular avança pelo espaço deixado pela ECM degradada através da contração dos filamentos de actomiosina presentes no citoesqueleto. Essa contração promove o encurtamento do comprimento celular e gera tensão suficiente no pólo anterior, promovendo o movimento celular. Esse movimento migratório-invasivo permite aos queratinócitos neoplásicos a expansão dos limites teciduais, a interação com o endotélio vascular e a promoção de metástases..... 34

Esquema 3 – Padrões morfológicos de migração e invasão. As estratégias de migração individual ou coletiva são determinadas pela presença de diferentes moléculas (triângulos

invertidos). Do padrão coletivo ao individual, o controle das interações célula-ECM é dada por integrinas e proteases. A adesão célula-célula é feita através das caderinas e outros receptores de adesão, e são características específicas do movimento coletivo. Fonte: esquema adaptado de FRIEDL & WOLF (2003)..... 37

Esquema 4 – Cordão de células neoplásicas. Neste tipo de migração, a primeira célula invasora é denominada “célula-guerrilha”, que é a responsável pela formação do trajeto na ECM através da liberação de proteases (MMPs). As células neoplásicas estão em contato próximo (“*tip-like junctions*”), formando uma cadeia celular tipo “fila indiana” através do trajeto de ECM remodelada..... 39

Esquema 5 – Ilha de células neoplásicas. Neste tipo de migração, um subtipo de células, denominado de “células geradoras de caminho”, produz proteases (MMPs) e gera tração migratória através da formação de “invadópodes”. A ilha movimenta-se como um corpo único através da ECM remodelada..... 40

Esquema 6 – Funções dos fibroblastos ativados (CAF) no estroma tumoral. Os fibroblastos comunicam-se com as células neoplásicas, inflamatórias, endoteliais, células epiteliais residentes e pericitos através da secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Através da deposição aumentada de colágeno I e III, além da produção de tenascina C, os fibroblastos induzem uma alteração no microambiente da ECM, o que potencializa os sinais oncogênicos, acelerando a progressão tumoral. Os fibroblastos medeiam a reação inflamatória pela secreção de quimiocinas, tal como a IL-1. Os fibroblastos também interagem com a microvasculatura através da secreção de MMPs e VEGF. Eles também produzem sinais potencialmente oncogênicos, como o TGF- $\beta$ , ao epitélio residente, estimulando diretamente a proliferação e a invasão neoplásica. Fonte: esquema adaptado de KALLURI & ZEISBERG (2006). ..... 47

Esquema 7 – A interação dos eosinófilos com fibroblastos e células endoteliais influencia diversos processos fisiológicos e patológicos. Nos tumores, seu papel na angiogênese está baseado na secreção de VEGF. O TGF- $\beta$  produzido pelos eosinófilos induz a proliferação e migração dos fibroblastos. Além disso, induz a produção e o remodelamento da ECM e a aquisição de um fenótipo contrátil, através da expressão de SMA. Os fibroblastos, por sua vez, estimulam a proliferação de mais eosinófilos e células inflamatórias, perpetuando o ciclo. Fonte: adaptado de MUNITZ & LEVI-SCHAFFER (2004)..... 50

Esquema 8 – Figura esquemática de bovino com as regiões do TAS e a distribuição percentual dos 40 CCEs de acordo com sua localização. .... 64

Esquema 9 – Figura esquemática de bovino com a distribuição numérica e percentual das metástases dos CCEs para linfonodos. n: número de casos com metástases de acordo com a região anatômica. LN: Linfonodos. LN1: retrofaríngeos; LN2: mediastínicos; LN3: ruminais; LN4: hepáticos; LN5: paravertebrais; LN6: mesentéricos; LN7: retroesofágicos..... 74

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Gráfico da distribuição de freqüência das idades dos 40 bovinos. A idade média é de 8 anos, variando de 6,5 a 9 anos (região entre as linhas pontilhadas). ..... 61
- Gráfico 2 – Gráfico da percentagem dos CCEs com relação ao seu grau de diferenciação. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado. .... 66
- Gráfico 3 – Gráfico da percentagem do número de casos em que os diferentes graus de diferenciação estiveram presentes nas três regiões do TAS. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado..... 67
- Gráfico 4 – Gráfico da percentagem das intensidades da reação desmoplásica nos diferentes graus de diferenciação dos CCEs do TAS. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado. .... 71
- Gráfico 5 – Estabelecimento do número de eos/cga limite, semelhante à metodologia utilizada por DORTA (2000). n: número de bovinos em cada grupo. eos/cga: eosinófilos por campo de grande aumento (400X) ..... 75
- Gráfico 6 – Relação entre o grau de diferenciação celular e o número de AgNORs através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação dos pares (método de Holm-Sidak), estabelecendo intervalo de confiança de 95%. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado. .... 77

## LISTA DE FIGURAS

- Figuras 1 e 2 – Samambaia (*Pteridium aquilinum*). Exemplares de samambaia presentes em um propriedade de Jaguari, Rio Grande do Sul. As folhas (frondes) são grandes, bipinadas ou tripinadas, e formam touceiras densas que se estendem ao longo dos rizomas..... 28
- Figura 3 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, cavidade oral, Bovino 06. Massa tumoral exofítica, de aspecto multilobular, superfície irregular e ulcerada em toda extensão da faringe e orofaringe (região cranial). ..... 78
- Figura 4 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, cavidade oral, Bovino 39. O carcinoma é endofítico e se estende da base da língua à faringe/orofaringe (região cranial). A superfície está ulcerada, com bordas elevadas e restos alimentares em seu interior. Há também múltiplos papilomas na orofaringe. .... 78
- Figura 5 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, esôfago, Bovino 32. Massa tumoral na parede interna do esôfago médio, de aspecto nodular, irregular, com superfície ulcerada. Há também múltiplos papilomas e áreas rugosas em toda extensão da mucosa do esôfago..... 79
- Figura 6 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 22. Extensa massa irregular, ulcerada e com restos alimentares na região do cárdia. Na grande maioria dos casos, os CCEs desta região eram comparativamente mais extensos que os da região cranial e média. .... 79
- Figura 7 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, faringe/orofaringe, Bovino 26. As ilhas tumorais se originam do epitélio superficial e invadem a submucosa adjacente. Há também acentuado infiltrado linfoplasmocítico circundando o epitélio e as ilhas de queratinócitos neoplásicos. Hematoxilina-eosina, barra: 100µm..... 80

- Figura 8 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, faringe/orofaringe, Bovino 26. Ilha tumoral bem queratinizada, fitas extensas e cordões celulares podem ser vistos invadindo a submucosa adjacente. Hematoxilina-eosina, barra: 250  $\mu\text{m}$ . ..... 80
- Figura 9 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, epiglote, Bovino 10. Proliferação escamosa maligna na parede ductal salivar. Há pequenas ilhas neoplásicas próximas e moderado infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral. Hematoxilina-eosina, barra: 50  $\mu\text{m}$ . ..... 81
- Figura 10 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, faringe/orofaringe, Bovino 5. Proliferação escamosa maligna de células da parede ductal salivar. Há descamação de queratinócitos neoplásicos para a luz ductal. Observa-se uma pequena ilha neoplásica próxima ao ducto e infiltrado inflamatório linfoplasmocítico. Imunoistoquímica para citoqueratina, método estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100  $\mu\text{m}$ . ..... 81
- Figura 11 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, base da língua, Bovino 35. Ilha de queratinócitos neoplásicos entre ácinos de glândula salivar. Há leve infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral e periacinar. Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu\text{m}$ . ..... 82
- Figura 12 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 40. Queratinócitos neoplásicos arranjados em diversos padrões por entre fibras musculares lisas. Há compressão de miócitos e acentuada reação desmoplásica. Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu\text{m}$ . ..... 82
- Figura 13 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, rúmen, Bovino 15. Acentuado infiltrado inflamatório granulomatoso com grande quantidade de células gigantes multinucleadas ao redor de lamelas de queratina livre no estroma tumoral. Infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocítico também pode ser observado. Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu\text{m}$ . ..... 83
- Figura 14 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, rúmen, Bovino 15. Infiltrado inflamatório granulomatoso com células gigantes multinucleadas contendo fragmentos de queratina mineralizada em seu interior (seta). Hematoxilina-eosina, barra: 50  $\mu\text{m}$ . ..... 83

- Figura 15 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, rúmen, Bovino 37. Extensas ilhas de queratinócitos neoplásicos com grandes formações lamelares concêntricas de queratina (pérolas de queratina). Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu$ m. .... 84
- Figura 16 – Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, base da língua, Bovino 35. Ilha de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados delimitada externamente por uma camada de células com morfologia semelhante as das células basais do epitélio lingual. Hematoxilina-eosina, barra: 50  $\mu$ m. .... 84
- Figura 17 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 14. Neoplasma constituído principalmente por fitas, ilhas e agregados de queratinócitos neoplásicos com pouca queratinização. No centro da foto, há ilha de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados. Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu$ m. .... 85
- Figura 18 – Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, entrada do rúmen, Bovino 22. Formação de fitas, ilhas e agregados de queratinócitos neoplásicos com pouca queratinização. Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu$ m. .... 85
- Figura 19 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, esôfago (caudal), Bovino 28. Formação de pequenos agregados e cordões de queratinócitos neoplásicos pleomórficos em meio ao estroma tumoral e ao infiltrado inflamatório linfoplasmocítico. Hematoxilina-eosina, barra: 100  $\mu$ m. .... 86
- Figura 20 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, esôfago (caudal), Bovino 28. As células neoplásicas possuem acentuado pleomorfismo nuclear e celular, com um a quatro nucléolos conspícuos e bizarros. Hematoxilina-eosina, barra: 25  $\mu$ m. .... 86
- 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  $\mu$ m. .... 87
- 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  $\mu$ m. .... 87



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)..... 88

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 µm..... 89

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 µm..... 89

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..... 90

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..... 90

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..... 91

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  $\mu\text{m}$ . ..... 91

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  $\mu\text{m}$ . ..... 92

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  $\mu\text{m}$ . ..... 92

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  $\mu\text{m}$ . ..... 93

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  $\mu\text{m}$ . ..... 93

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)... 94

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 µm..... 95

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 µm. .... 95

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 imunoistoquímica para citoqueratina, em contraste com a vimentina (Figura 38), evidenciou a presença da invasão vascular. Imunoistoquímica para citoqueratina, método estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 µm..... 96

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. Imunoistoquímica para vimentina, método da estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração com hematoxilina de Harris, barra: 100 µm. .... 96

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 µm..... 97

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 µm..... 97

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)..... 98

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. .... 98

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 µm..... 99

Figura 44 – Carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, epiglote, Bovino 28. Numerosos eosinófilos circundando queratinócitos neoplásicos (seta). Hematoxilina-eosina, barra: 25 µm. .... 99

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. .... 100

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..... 100

## **LISTA DE APÊNDICES**

APÊNDICE A – DADOS DE RESENHA DOS 40 BOVINOS .....	121
APÊNDICE B - PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA .....	124
APÊNDICE C – FÓRMULAS DE SOLUÇÕES PARA IMUNOISTOQUÍMICA .....	126

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA – ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*) –  $\alpha$  actina de músculo liso

AG – agregados

AgNO<sub>3</sub> – nitrato de prata

AgNOR – (*argyrophilic nucleolar organizer regions*) – regiões organizadoras nucleolares argirofílicas

AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) – síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA – (*analysis of variance*) – análise de variância

BcL – (*B-cell lymphocyte*) – linfócito B

BL – base da língua

BPV-4 – (*bovine papillomavirus-4*) – papilomavírus bovino 4

CAF – (*carcinoma-associated fibroblasts*) – fibroblastos associados ao carcinoma

CCE – carcinoma de células escamosas

CCE-BD – carcinoma de células escamosas bem diferenciado

CCE-MD – carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado

CCE-PD – carcinoma de células escamosas pouco diferenciado

CIF – células individuais fusiformes

CIR – células individuais redondas

CO – cordões

COX-2 – ciclooxigenase 2

DC – (*dendritic cell*) – célula dendrítica

DNA – (*deoxyribonucleic acid*) – ácido desoxirribonucléico.

E-Cads – (*E-Cadherin*) – Caderina E

ECA – esôfago caudal

ECM – (*extracellular matrix*) – matriz extracelular

ECP – (*eosinophilic cationic protein*) – proteína catiônica eosinofílica

ECR – esôfago cranial

EDN – (*eosinophilic-derived neurotoxin*) – neurotoxina derivada de eosinófilo

EMT – (*epithelial to mesenchymal transition*) – transição epitelial à mesenquimal

eos/cga – número de eosinófilos por campo de grande aumento (400X)

EP – epiglote

EPO – (*eosinophilic peroxidase*) – peroxidase eosinofílica

ER – entrada do rúmen

FGF-2 – (*fibroblast growth factor – 2*) – fator de crescimento de fibroblastos – 2

FI – fitas

F/O – faringe/orofaringe

GM-CSF – (*granulocytic-monocytic colony stimulating factor*) – fator estimulador de colônia granulocítico-monocítico.

HEB – hematúria enzoótica bovina

HLA-DR – (*human lymphocyte antigen – DR*) – antígeno DR de linfócito humano

HPV – (*human papillomavirus*) – papilomavírus humano

ICAM-1 – (*intercellular adhesion molecule – 1*) – molécula de adesão intercelular 1

IILP – infiltrado inflamatório linfoplasmocítico

IL – Ilhas

IL-n – (*interleukin*) – interleucina

LN – linfonodo

MMPs – (*metallomatrix proteases*) – metalomatríz proteases

MBP – (*major basic protein*) – proteína básica principal

NK – (*natural killer cell*) – célula assassina natural

NORs – (*nucleolar organizer regions*) regiões organizadoras nucleolares

PDGF – (*platelet-derived growth factor*) – fator de crescimento derivado de plaquetas

ROS – (*reactive oxygen species*) – espécies reativas de oxigênio

RSV – (*Rous sarcomavirus*) – vírus do sarcoma de Rous

RU – rúmen

SHA – síndrome hemorrágica aguda

TATE – (*tumor-associated tissue eosinophilia*) – eosinofilia tecidual associada a tumores

TAS – trato alimentar superior

TcL – (*T-cell cytotoxic lymphocyte*) – linfócito T citotóxico

TGF- $\beta$  – (*transforming growth factor –  $\beta$* ) – fator de crescimento transformador  $\beta$

ThL – (*T-cell helper lymphocyte*) – linfócito T auxiliar

UDT – (*upper digestive tract*) – trato alimentar superior



VCAM-1 – (*vascular-cell adhesion molecule – 1*) – molécula de adesão celular-vascular 1

VEGF – (*vascular endothelial growth factor*) – fator de crescimento endotelial vascular

$x^2$  – qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 Considerações gerais sobre a planta e a intoxicação por <i>Pteridium aquilinum</i></b>	<b>27</b>
<b>2.2 CCEs no TAS de bovinos associados ao consumo de <i>Pteridium aquilinum</i></b> .....	<b>29</b>
<b>2.3 Biologia do crescimento tumoral</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4 Mecanismos de invasão e metástases</b> .....	<b>33</b>
<b>2.5 Migração e invasão local</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6 Diversidade morfológica de migração e invasão</b> .....	<b>36</b>
2.6.1 Migração de células individuais .....	38
2.6.2 Migração coletiva: .....	39
<b>2.7 Metástases</b> .....	<b>40</b>
<b>2.8 Microambiente tumoral</b> .....	<b>42</b>
2.8.1 Células inflamatórias e microambiente tumoral .....	43
2.8.2 Fibroblastos associados a tumores.....	46
<b>2.9 Eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE):</b> .....	<b>48</b>
<b>2.10 Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs)</b> .....	<b>51</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1 Amostras dos neoplasmas e parâmetros analisados</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2 Idade dos bovinos</b> .....	<b>56</b>
<b>3.3 Localização anatômica do CCE no TAS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.4 Grau de diferenciação celular (ou grau histológico)</b> .....	<b>56</b>
<b>3.5 Ocorrência de metástases</b> .....	<b>56</b>
<b>3.6 Intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral</b> .....	<b>57</b>

<b>3.7</b>	<b>Ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre .....</b>	<b>57</b>
<b>3.8</b>	<b>Técnica de imunoistoquímica .....</b>	<b>57</b>
3.8.1	Padrões morfológicos de migração e invasão.....	58
3.8.2	Intensidade da reação desmoplásica peritumoral .....	59
3.8.3	Ocorrência de invasão vascular linfática ou sangüínea.....	59
<b>3.9</b>	<b>Ocorrência e intensidade da TATE .....</b>	<b>59</b>
<b>3.10</b>	<b>Quantificação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) .....</b>	<b>59</b>
<b>3.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
4.1	Idade .....	61
4.2	Localização anatômica do CCE no TAS .....	64
4.3	Grau de diferenciação celular dos CCEs.....	64
4.4	Intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico .....	68
4.5	Ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre .....	68
4.6	Padrões morfológicos de migração e invasão.....	69
4.7	Intensidade da reação desmoplásica peritumoral .....	71
4.8	Ocorrência de invasão vascular linfática ou sangüínea .....	71
4.9	Ocorrência de metástases.....	72
4.10	Ocorrência e intensidade da eosinofilia tecidual associada a tumores .....	74
4.11	Quantificação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas.....	76
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Carcinomas de células escamosas (CCEs) têm sido descritos no trato alimentar superior (TAS) de bovinos intoxicados cronicamente por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, conhecida popularmente como samambaia (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; JARRET, 1978; POLACK, 1990; GAVA et al., 2002; MOREIRA SOUTO et al., 2006).

Apesar de consideradas como pouco freqüentes (TOKARNIA et al., 2000), metástases de CCEs alimentares desses bovinos têm sido relatadas em 20-40% dos casos (JARRET, 1978; HEAD et al., 2002). Vários aspectos histomorfológicos dos neoplasmas podem estar correlacionados com o comportamento biológico dos mesmos (CULLEN et al., 2002). O grau de diferenciação celular é o principal fator de determinação do comportamento biológico dos neoplasmas (CULLEN et al., 2002). Porém, recentemente tem sido analisada também a influência do microambiente tumoral como fator determinante na progressão tumoral (BISSELL & RADISKY, 2001). Dentre os componentes do microambiente destacam-se o infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) e a reação desmoplásica peritumoral. A eosinofilia tecidual associada a tumores (*tumor-associated tissue eosinophilia* – TATE) também faz parte do estroma dos CCEs de humanos, e tem sido relacionada como fator prognóstico adicional para CCEs localizados principalmente na cabeça e pescoço (DORTA, 2000; SAID et al., 2005; ERCAN et al., 2005). A importância da TATE em CCEs de animais permanece indefinida.

A quantificação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs) é fortemente associada ao grau de proliferação celular e tem sido utilizada como método complementar na graduação histológica de CCEs em humanos (XIE et al., 1999; MONTOYA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005) e em vários neoplasmas de animais domésticos, tais como mastocitomas (RECH, 2003) e neoplasmas mamários caninos (BRATULIC et al., 1996; MADEWELL, 2001).

Uma revisão detalhada da histopatologia dos tumores de bexiga associados à hematúria enzoótica bovina, causada pelo consumo prolongado de samambaia, revelou vários aspectos relevantes quanto à histogênese e comportamento biológico dos neoplasmas, incluindo o potencial metastático dos mesmos (PEIXOTO et al., 2003). No caso da ocorrência de CCEs do TAS de bovinos, poucos estudos no Brasil têm detalhado as características histomorfológicas desses neoplasmas (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969;

POLACK, 1990) ou essa caracterização tem sido feita de forma sucinta, sem as possíveis correlações entre a histopatologia e a ocorrência de metástases dos CCEs do TAS.

Os objetivos deste estudo foram detalhar os principais aspectos morfológicos de 40 CCEs do TAS de bovinos recebidos pelo Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da UFSM, visando determinar os principais fatores histomorfológicos que influenciam no comportamento biológico e no potencial metastático desses neoplasmas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações gerais sobre a planta e a intoxicação por *Pteridium aquilinum*

*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Figuras 1 e 2), conhecida popularmente como samambaia, samambaia do campo, pluma ou pluma-grande, é uma planta pertencente à família Polypodiaceae (TOKARNIA et al., 2000). A samambaia está presente em todos os continentes e, no Brasil, ocorre principalmente em regiões montanhosas, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 2000). Somente *P. aquilinum* subespécie *caudatum* variedade *arachnoideum* foi identificada no Brasil (TOKARNIA et al., 2000). Ela se desenvolve melhor em regiões frias e de boa pluviosidade, com solos ácidos, arenosos e bem drenados (GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000).

A samambaia é considerada uma planta tóxica que causa doença clínica em animais. As formas clínicas associadas ao consumo espontâneo da samambaia são: a) deficiência de tiamina em animais monogástricos; b) degeneração progressiva da retina (“*bright blindness*”) em ovinos; c) síndrome hemorrágica aguda (SHA) associada com aplasia de medula óssea; e d) duas doenças crônicas neoplásicas que incluem neoplasmas da bexiga (hematúria enzoótica bovina - HEB) e carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) de bovinos (SMITH et al., 1999; TOKARNIA et al., 2000). Dentre essas formas clínicas, somente a SHA e as doenças neoplásicas em bovinos tem sido amplamente documentadas no Brasil (TOKARNIA et al., 2000).

Sua toxicidade está associada principalmente a dois princípios tóxicos encontrados na planta: a) uma tiaminase tipo I, que acomete animais monogástricos; e b) um princípio radiomimético, responsável por quadros patológicos observados principalmente em bovinos (FENWICK, 1988; TOKARNIA et al., 2000). A ação radiomimética deve-se à presença de vários princípios tóxicos que atuam como mutágenos, carcinógenos e imunossupressores (EVANS, 1968; EVANS, 1979; FENWICK, 1988). Um dos compostos químicos de *P. aquilinum* é o ptaquilosídeo norsesquiterpeno, que exerce comprovadamente as ações mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas (FENWICK, 1988). Em solução aquosa e na presença de ácidos, bases ou calor, o ptaquilosídeo é degradado até pterosina B (POTTER, 1999). Sob condições alcalinas, ocorre a formação de uma dienona instável (potencialmente carcinógena-mutágena), que pode sofrer aromatização até liberar pterosina B. A exigência de

Figuras 1 e 2 – Samambaia (*Pteridium aquilinum*). Exemplares de samambaia presentes em um propriedade de Jaguari, Rio Grande do Sul. As folhas (frondes) são grandes, bipinadas ou tripinadas, e formam touceiras densas que se estendem ao longo dos rizomas.





condições alcalinas para a ativação do ptaquilosídeo ao composto carcinogênico-mutágeno (dienona instável) sugere que os tumores induzidos no esôfago e bexiga de bovinos estão associados com o pH 8,1-8,2 da saliva e 7,5-8,5 da urina, respectivamente. Semelhantemente, adenocarcinomas intestinais em ratos induzidos pela samambaia ou pelo ptaquilosídeo norsesquiterpeno são preferencialmente encontrados nos segmentos finais mais alcalinos do intestino (FENWICK, 1988).

Outro composto químico potencialmente carcinogênico presente na samambaia é o flavonóide quercetina (PAMUKCU et al., 1980). Apesar de seus efeitos biológicos serem controversos (PAMUKCU et al., 1980; MUSONDA & CHIPMAN, 1999) tem sido demonstrado em estudos *in vitro* que a quercetina pode atuar como um agente mutagênico em sinergismo com o papilomavírus bovino tipo 4 (*bovine papillomavirus type 4* – BPV-4), transformando células primárias bovinas (CAMPO, 1999; BENISTON et al., 1999; BENISTON et al., 2001; BENISTON & CAMPO, 2003). As células primárias bovinas transformadas *in vitro* pelo BPV-4 crescem independentemente de ancoragem, porém não sofrem imortalização e não são capazes de induzir carcinomas em camundongos “nude” (JAGGAR et al., 1990). Entretanto, o tratamento dessas células com uma única dose de quercetina levou à completa transformação oncogênica das células transfectadas com BPV-4 (na presença do gene *ras*), indicando a quercetina como um provável co-carcinógeno *in vivo*, o qual sinergisaria com o BPV-4 para a progressão celular maligna (PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CONNOLLY et al., 1998). Devido à ausência do gene *E6* (JACKSON et al., 1991), o BPV-4 não induz a malignização das células primárias bovinas. A proteína codificada pelo gene *E6* degrada a proteína p53, contribuindo para a transformação celular observada na infecção pelo HPV-16 em humanos (PENNIE et al., 1993).

## 2.2 CCEs no TAS de bovinos associados ao consumo de *Pteridium aquilinum*

A intoxicação por *P. aquilinum* em bovinos sob a forma de CCEs no TAS será o enfoque desta revisão bibliográfica. Esta forma de intoxicação tem sido descrita em bovinos pastoreando por tempo prolongado em áreas altamente infestadas pela planta (DÖBEREINER et al., 1967; JARRET, 1978; POLACK, 1990; GAVA et al., 2002; MOREIRA SOUTO et al., 2006). Não há aparente predisposição por sexo ou raça. Quanto à idade, os bovinos afetados geralmente têm idade mais avançada, aproximadamente seis anos (TOKARNIA et al., 1969; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000), com maior número de casos entre sete e oito anos

(GAVA, 1993; MOREIRA SOUTO et al., 2006). Em um estudo de 30 casos, dois bovinos tinham três ou quatro anos, indicando que animais mais jovens também podem adoecer (MOREIRA SOUTO et al., 2006).

Os principais sinais clínicos observados são: tosse, disfagia, regurgitação freqüente, halitose, diarréia, timpanismo e emagrecimento (TOKARNIA et al., 1969; POLACK, 1990; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000; MOREIRA SOUTO et al., 2006). O índice de letalidade é de 100% (TOKARNIA et al., 2000). Como os CCEs podem ter origem única ou freqüentemente múltipla (TOKARNIA et al., 1979), os sinais clínicos são dependentes da localização do CCE no TAS (TOKARNIA et al., 2000) e, na grande maioria dos casos, estão associados ao CCE de maior tamanho (MOREIRA SOUTO et al., 2006).

A distribuição dos CCEs no TAS não é constante, tendo sido observados diferentes percentuais de freqüência de aparecimento deste tumor em diferentes estudos (JARRET, 1978; GAVA, 1993; GAVA et al., 2002; MOREIRA SOUTO et al., 2006). MOREIRA SOUTO et al. (2006) demonstraram que os CCEs acometem principalmente a região cranial do TAS (base da língua, faringe/orofaringe e epiglote) e a região caudal (entrada do rúmen e rúmen), sendo menos freqüentes no esôfago.

O aspecto macroscópico dos CCEs é bastante característico, e consiste de massas tumorais exuberantes, de crescimento exofítico ou endofítico, podendo ser sésseis ou pedunculados, acompanhados ou não por edema e por extensas áreas de ulceração ou de necrose na superfície de corte. Espessamentos estenosantes anelares também foram descritos, principalmente nos CCEs localizados no esôfago. Na superfície de corte, pontos ou áreas irregulares de coloração amarelo-ouro foram vistas onde havia acentuada queratinização do neoplasma. Áreas firmes e brancas também foram observadas e associadas à ocorrência de fibroplasia intratumoral (MOREIRA SOUTO et al., 2006).

Histologicamente, os CCEs são constituídos de queratinócitos arranjados em ninhos, cordões ou ilhas e com variado grau de queratinização (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; MOREIRA SOUTO et al., 2006). O grau de diferenciação é o principal parâmetro de avaliação do comportamento biológico dos CCEs (JANES & WATT, 2006), sendo a queratinização o principal critério de classificação, podendo ser classificados em bem diferenciados (BD), moderadamente diferenciados (MD) ou pouco diferenciados (PD) (MURPHY et al., 2004). Outros critérios adicionais de classificação incluem pleomorfismo nuclear e celular e atividade mitótica (MCKEE, 1999; HEAD et al., 2002). Extensos infiltrados inflamatórios linfoplasmocíticos, infiltrado eosinofílico e reação desmoplásica também foram relatados (MOREIRA SOUTO et al., 2006). Há evidências histomorfológicas,

em um estudo de casos espontâneos de intoxicação por samambaia, de que os CCEs do TAS de bovinos originam-se tanto de papilomas (papilomas em transformação para CCE) como do epitélio de revestimento do TAS previamente íntegro (MOREIRA SOUTO et al., 2006).

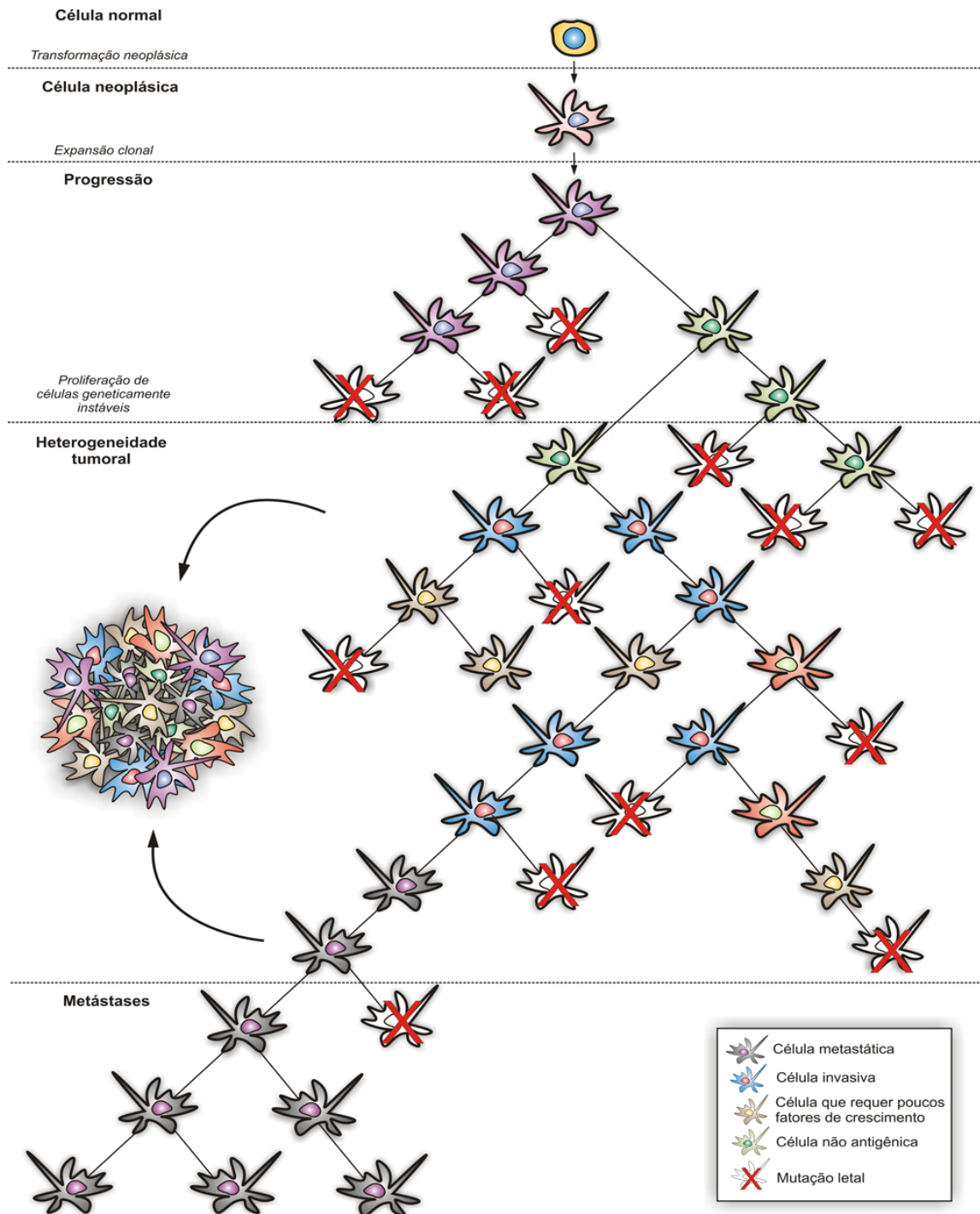
Metástases dos CCEs são relatadas em linfonodos regionais, fígado e pulmão, porém não são consideradas freqüentes por alguns autores (TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 2000). Entretanto, outros autores citam a ocorrência de metástases em 20-40% (HEAD et al., 2002), 36% (JARRET, 1978) ou em 60% dos casos (MOREIRA SOUTO et al., 2006). Nesse último estudo, os linfonodos regionais foram os mais acometidos, sendo encontradas metástases também no fígado, pulmão, baço, omento, intestino e bexiga.

Os estudos já publicados sobre a intoxicação crônica por samambaia não estabeleceram as possíveis relações entre os parâmetros histomorfológicos dos CCEs do TAS que influenciam no comportamento biológico desses neoplasmas. Para um maior entendimento desses parâmetros, segue-se uma detalhada revisão sobre a biologia geral dos neoplasmas e as suas relações com o microambiente tumoral.

### **2.3 Biologia do crescimento tumoral**

A história natural da maioria dos tumores malignos pode ser dividida em quatro fases: (1) transformação maligna da célula-alvo; (2) progressão tumoral; (3) invasão local; e (4) metástases. (CONTRAN et al., 2000).

Após a transformação, o aumento da malignidade dos neoplasmas (progressão tumoral) é frequentemente adquirido de modo crescente. Ela está relacionada ao aparecimento seqüencial de subpopulações de células que diferem em relação a vários atributos fenotípicos, como caráter invasivo, velocidade de crescimento e capacidade metastática. Juntas, as células formadas por múltiplas mutações que se acumulam independentemente, formam uma massa única e heterogênea, com subclones com diferentes características (heterogeneidade tumoral) (Esquema 1) (CONTRAN et al., 2000).



Esquema 1 – Evolução clonal e a geração da heterogeneidade tumoral. Novos subclones originam-se da célula transformada original. Com o crescimento progressivo, a massa tumoral torna-se enriquecida dessas variantes que estão mais aptas à evasão do sistema imune do hospedeiro e com mais características de malignidade. Fonte: esquema adaptado de MISDORP et al. (2002) e CONTRAN et al., (2000).

## 2.4 Mecanismos de invasão e metástases

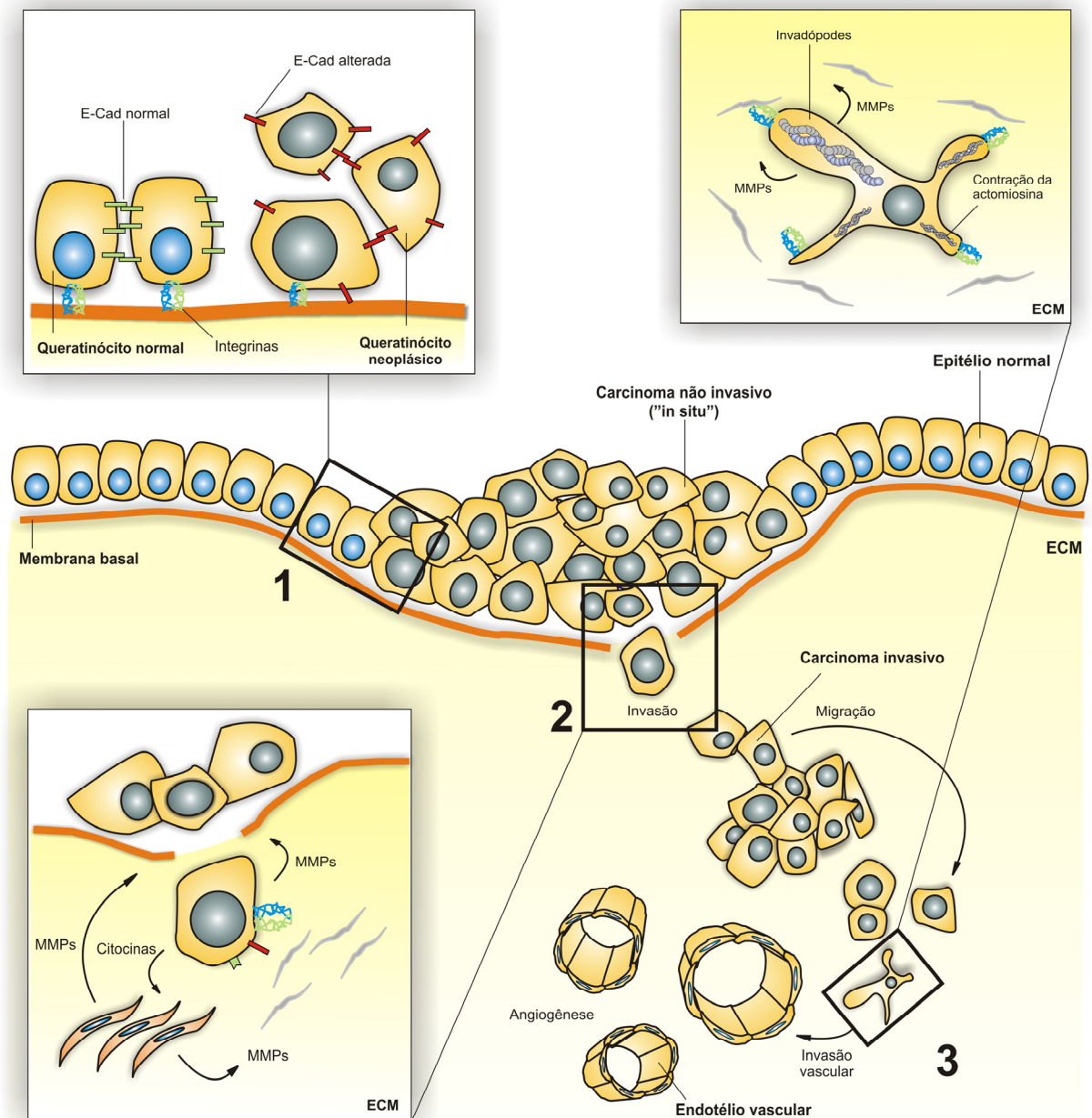
A invasão e as metástases constituem marcos biológicos dos neoplasmas malignos (CONTRAN et al., 2000). A habilidade das células tumorais de migração e invasão permite sua mudança de posição dentro dos tecidos. Isso também permite que elas penetrem vasos linfáticos e sanguíneos para a disseminação e metástases (FRIEDL & WOLF, 2003). Para que as células tumorais se desprendam do tumor primário e produzam um crescimento secundário em um sítio distante, elas devem passar por uma série de etapas que serão descritas a seguir.

## 2.5 Migração e invasão local

Quase todos os tumores benignos crescem como massas coesivas em expansão que permanecem localizadas em seu sítio de origem, porém sem a capacidade de infiltração, invasão ou metástases (CONTRAN et al., 2000; COCKERELL & COOPER, 2002). Diferentemente, o crescimento dos neoplasmas malignos é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circundante, não reconhecendo limites anatômicos normais. Depois do desenvolvimento de metástases, a invasão constitui a característica mais confiável que diferencia os tumores malignos dos benignos (CONTRAN et al., 2000).

O estágio pré-invasivo dos neoplasmas epiteliais, denominado de carcinoma “*in situ*”, pode ser considerado a etapa anterior do neoplasma invasivo (JANES & WATT, 2006). A invasão das células neoplásicas requer as fases de descolamento das células, adesão aos componentes da matriz extracelular (*extracellular matrix* – ECM), proteólise da ECM e migração das células neoplásicas (Esquema 2) (CONTRAN et al., 2000; STEEG, 2006).

Nos tecidos normais e nos carcinomas “*in situ*”, as células do epitélio estão claramente aderidas umas as outras, e ao seu ambiente, por uma variedade de moléculas de adesão. Dentre elas, as caderinas E (E-cads) são de particular importância. Elas medeiam adesões homotípicas no epitélio com a função de manter as células epiteliais sempre unidas entre si (STEEG, 2006). Entretanto, a perda ou alteração dessas moléculas leva ao desenvolvimento de um fenótipo pré-maligno (displásico) ou neoplásico. Esse processo de descolamento é necessário para a mobilidade celular e o início do processo invasivo (BISSELL & RADISKY, 2001).



Esquema 2 – Mecanismos de invasão e migração das células tumorais. 1. Os queratinócitos neoplásicos estão aderidos uns aos outros por moléculas de adesão (E-Cads). A alteração genética e a expressão alterada dessas moléculas leva as células ao desenvolvimento de um fenótipo maligno (carcinoma “*in situ*”). Nesse estágio, as células ainda estão ligadas à membrana basal por intermédio de integrinas. 2. A invasão se inicia após a quebra da membrana basal e da matriz extracelular (ECM) por proteases (MMPs) provenientes dos queratinócitos neoplásicos ou dos fibroblastos em resposta à citocinas produzidas pelas células tumorais. A expressão de moléculas e receptores na superfície das células neoplásicas permite sua interação com a ECM, alterando a morfologia celular e permitindo um comportamento maligno. 3. A interação das integrinas com a ECM adjacente, através da formação de protrusões celulares (“invadópodes”), induz a proliferação celular, produção de MMPs e a movimentação progressiva. O corpo celular avança pelo espaço deixado pela ECM degradada através da contração dos filamentos de actomiosina presentes no citoesqueleto. Essa contração promove o encurtamento do comprimento celular e gera tensão suficiente no pólo anterior, promovendo o movimento celular. Esse movimento migratório-invasivo permite aos queratinócitos neoplásicos a expansão dos limites teciduais, a interação com o endotélio vascular e a promoção de metástases.

O processo de invasão é seguido pela adesão das células neoplásicas aos componentes da ECM. Ela é composta por duas fases: gel visco-elástico de glicosaminoglicanos e proteoglicanos; e material fibrilar, formado por colágenos tipo I, III e V e fibronectina (KALLURI & ZEISBERG, 2006). A membrana basal, uma forma especializada de ECM, é constituída principalmente de laminina, colágeno IV, proteoglicanos e glicoproteínas. A membrana basal é uma estrutura dinâmica que provê suporte estrutural e, principalmente, sinais de polarização ao epitélio. Esses sinais são os responsáveis pela orientação das células e pela manutenção do estado de diferenciação (BISSELL & RADISKY, 2001). A invasão da membrana basal e da matriz extracelular propriamente dita pelas células neoplásicas não é meramente devida à pressão passiva de crescimento, mas exige a degradação enzimática ativa dos componentes da ECM para se criar vias de passagem para migração (PRICE et al., 1997; STEEG, 2006). As próprias células neoplásicas secretam enzimas proteolíticas (por exemplo, o grupo das metalomatrix proteases - MMPs) ou induzem as células do próprio estroma (p.ex. fibroblastos do estroma ou células inflamatórias) a elaborar proteases (CULLEN et al., 2002; COUSSENS & WERB, 2002; KALLURI & ZEISBERG, 2006). Um bom exemplo disso é a colagenase tipo IV (*metallomatrix protease 2* – MMP-2), que é uma potente enzima degradadora do colágeno tipo IV das membranas basais epiteliais e vasculares, as quais são principalmente secretadas pelos fibroblastos no processo de cicatrização (STEEG, 2006). As alterações ou quebra na composição da membrana basal levam também a mudanças na morfologia e no comportamento celular, alterando a afinidade de ligação entre elas (p.ex. E-cads), a distribuição de receptores de superfície e a resposta a estímulos (BISSELL & RADISKY, 2001). Enquanto o efeito mais óbvio da destruição da matriz consiste em criar uma passagem para a invasão das células tumorais, os produtos de clivagem dos componentes da matriz, derivados do colágeno e de proteoglicanos possuem atividades promotoras do crescimento, angiogênicas e quimiotáticas (PRICE et al., 1997; CONTRAN et al., 2000).

Uma vez livres na ECM, a ligação das células neoplásicas à laminina e fibronectina através das E-cads é crucial para a invasão. Além disso, as integrinas, que atuam como receptores de muitos componentes da ECM, também estão altamente expressadas e têm grande importância nos neoplasmas invasivos (PRICE et al., 1997; KALLURI & ZEISBERG, 2006; JANES & WATT, 2006; STEEG, 2006).

As células neoplásicas na ECM devem, então, expressar moléculas de adesão para mudar de forma e se interagir com estruturas ao seu redor para migrar (FRIEDL & WOLF, 2003). As interações proteína-proteína e a formação de extensões celulares são requisitos

básicos para a dinâmica celular, e são reconhecidas como básicas para a movimentação celular nos processos fisiológicos e patológicos. Tal movimentação e as alterações na morfologia ocorrem principalmente através da ligação célula-ECM e da polimerização e contração da actomiosina presente no seu interior (FRIEDL & WOLF, 2003). As protrusões celulares (“pseudópodes”, “lamelípodes”, “filópodes” ou comumente denominados de “invadópodes”) tocam a ECM adjacente, e iniciam a movimentação via moléculas de adesão (STEEG, 2006). O engajamento das integrinas e outros receptores levam ao recrutamento de proteases de superfície que, por sua vez, degradam os componentes da ECM (FRIEDL & WOLF, 2003; JANES & WATT, 2006; STEEG, 2006). O corpo celular avança então pelo espaço deixado pela ECM degradada, através da contração da actomiosina. Essa contração promove o encurtamento do comprimento celular e gera tensão suficiente no pólo anterior, promovendo o movimento celular. Esse movimento provê espaço suficiente para a expansão celular, deixando para trás um defeito em forma de tubo no trajeto migratório (FRIEDL & WOLF, 2003).

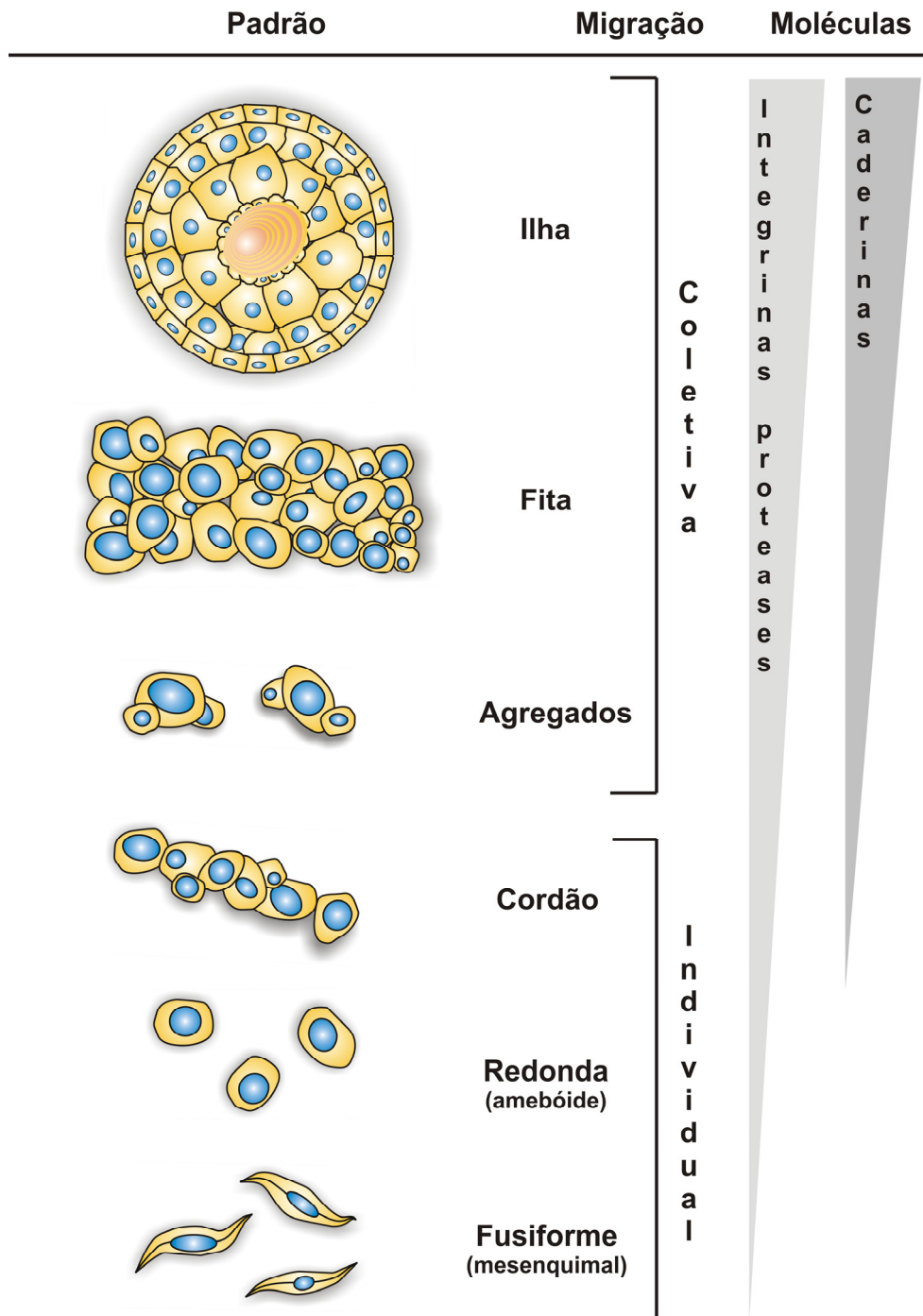
Em resumo, a motilidade das células neoplásicas, baseia-se na ação das integrinas, formação de contato focal (“invadópodes”), proteólise da ECM e a contratilidade dependente de actomiosina (FRIEDL & WOLF, 2003; STEEG, 2006). As células tumorais se utilizam de mecanismos de migração que são similares (se não idênticos) àqueles que ocorrem nos processos fisiológicos de embriogênese, inflamação e cicatrização (BISSELL & RADISKY, 2001; FRIEDL & WOLF, 2003; BRABLETZ et al., 2005; KALLURI & ZEISBERG, 2006). Essa interação entre células neoplásicas e células constituintes do estroma tumoral é denominada de microambiente tumoral, que será abordada a seguir. O desequilíbrio dos sinais regulatórios é o que permite que as células neoplásicas se tornem continuamente migratórias e invasivas, levando à expansão aos limites teciduais e à promoção de metástases (FRIEDL & WOLF, 2003).

## **2.6 Diversidade morfológica de migração e invasão**

Observações *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que as células tumorais infiltram a ECM através de diversos padrões (FRIEDL & WOLF, 2003). Elas podem se disseminar como células individuais (migração de células individuais) ou expandir-se em mantos, feixes, fitas, cordões ou agregados, denominado de migração coletiva (Esquema 3). Em muitos tumores, os dois tipos de migração podem estar presentes simultaneamente. Essas diferenças encontradas



nos padrões celulares refletem as variações no repertório molecular dos neoplasmas, e estão diretamente ligada, portanto, ao grau de diferenciação das células. (FRIEDL & WOLF, 2003)



Esquema 3 – Padrões morfológicos de migração e invasão. As estratégias de migração individual ou coletiva são determinadas pela presença de diferentes moléculas (triângulos invertidos). Do padrão coletivo ao individual, o controle das interações célula-ECM é dada por integrinas e proteases. A adesão célula-célula é feita através das caderinas e outros receptores de adesão, e são características específicas do movimento coletivo. Fonte: esquema adaptado de FRIEDL & WOLF (2003).

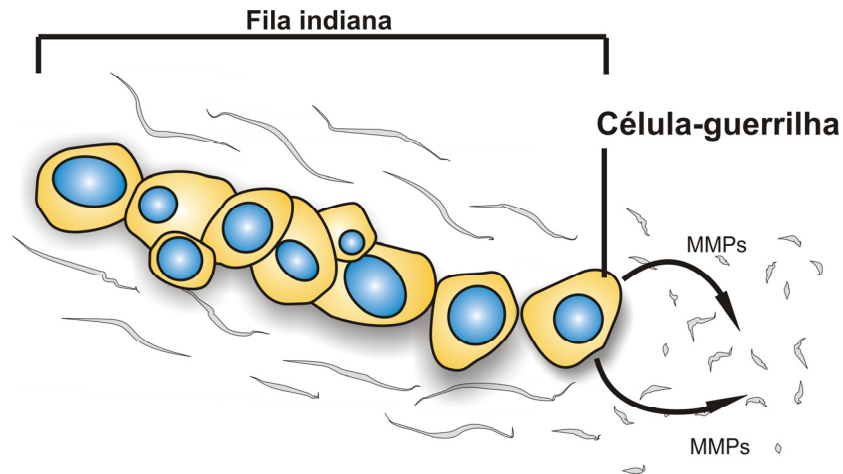
### 2.6.1 Migração de células individuais

Na migração de células individuais, duas variações morfológicas podem ser encontradas: fusiforme (mesenquimal) ou redonda (amebóide).

O padrão de migração mesenquimal é um mecanismo eficiente de disseminação comumente encontrado em sarcomas (WOLF et al., 2003). Nos tumores pouco diferenciados, há a transição do padrão coletivo para o de células individuais disseminadas. A morfologia é dependente da dinâmica de adesão e da presença de forças de tração nos dois pólos. Essa alteração morfológica pode ser considerada um pré-requisito anterior à transição epitelial a mesenquimal (*epithelial to mesenchymal transition* – EMT), com perda das junções celulares, ainda mantendo a expressão de moléculas migratórias, como as integrinas (FRIEDL & WOLF, 2003). Nos neoplasmas epiteliais, o processo de progressão tumoral e desdiferenciação leva à formação de células fusiformes (semelhantes a um fibroblasto) que é denominado EMT. Ela é reconhecida como um importante determinador na progressão tumoral, pois, neste ponto, as células já desenvolveram muito suas habilidades de invasão e migração (KALLURI & ZEISBERG, 2006).

O tipo amebóide de migração é feito principalmente por leucócitos e por alguns tipos de células neoplásicas (STEEG, 2006). Diferentemente da EMT, seu movimento é principalmente físico e é feito através de interações fracas com a ECM, o que permite que as células se disseminem rapidamente em um ambiente com pouca resistência, ditadas por sua forma e barreiras teciduais (FRIEDL & WOLF, 2003; STEEG, 2006).

Uma variação do tipo de migração de células individuais é a formação de cordões celulares, denominado de migração em cadeia (Esquema 4). Esses cordões são formados pela primeira célula invasora, denominada de “célula-guerrilha”, que forma o trajeto da ECM remodelada. As células neoplásicas estão em contato próximo (“*tip-like junctions*”), formando “filas indianas” de células. Este arranjo é comum nos neoplasmas epiteliais e representam um efetivo mecanismo de penetração que confere alta capacidade metastática (FRIEDL & WOLF, 2003).

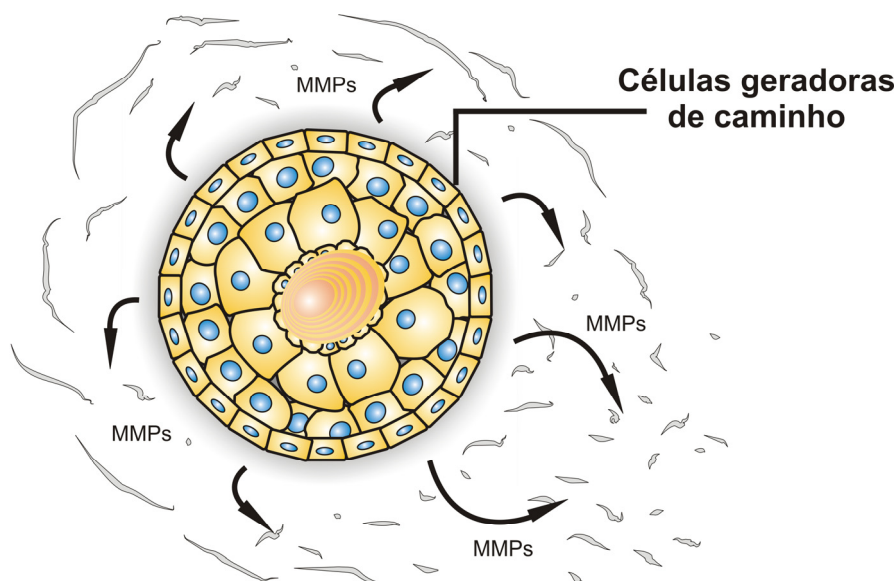


Esquema 4 – Cordão de células neoplásicas. Neste tipo de migração, a primeira célula invasora é denominada “célula-guerrilha”, que é a responsável pela formação do trajeto na ECM através da liberação de proteases (MMPs). As células neoplásicas estão em contato próximo (“*tip-like junctions*”), formando uma cadeia celular tipo “fila indiana” através do trajeto de ECM remodelada.

#### 2.6.2 Migração coletiva:

Nos tumores, duas variantes morfológicas e funcionais também têm sido descritas: mantos e fitas, que ainda mantêm contato com o sítio primário, e grupos de células, caracterizados como ilhas e agregados celulares.

O movimento coletivo, fenômeno bem descrito no desenvolvimento embrionológico, consiste de grupos celulares que se movimentam como uma única unidade funcional. Ocorre principalmente nos neoplasmas epiteliais, em que as junções celulares desses grupos são mantidas, permitindo a formação de um único corpo multicelular contrátil. Nessas variantes, um subtipo de células foi denominada de “células geradoras de caminho”, que estão em contato íntimo com ECM e geram tração migratória através dos invadópodes (Esquema 5) (FRIEDL & WOLF, 2003). Após a formação do trajeto, as células são passivamente movimentadas juntas permitindo a invasão. Esse tipo de migração coletiva é importante em neoplasmas epiteliais bem diferenciados e constituem o principal tipo de invasão vascular e metástase nesse tumores (FRIEDL & WOLF, 2003).



Esquema 5 – Ilha de células neoplásicas. Neste tipo de migração, um subtipo de células, denominado de “células geradoras de caminho”, produz proteases (MMPs) e gera tração migratória através da formação de “invasóides”. A ilha movimenta-se como um corpo único através da ECM remodelada.

## 2.7 Metástases

Metástases consistem de uma série de processos biológicos discretos que movimentam as células neoplásicas de um local primário a um distante (STEEG, 2006). Elas inequivocamente definem um tumor como maligno (CONTRAN et al., 2000). De maneira geral, quanto mais agressivo, de crescimento mais rápido e maior for o neoplasma primário, maior a probabilidade de sofrer metástases ou de já apresentar metástases. Para se tornarem metastáticas, as células neoplásicas devem invadir a ECM, penetrar os vasos linfáticos ou sanguíneos, sobreviver na circulação, extravasar e crescer em um novo sítio, processo denominado de colonização (CONTRAN et al., 2000; COCKERELL & COOPER, 2002).

A invasão da ECM é seguida pela penetração das células neoplásicas no interior dos vasos sanguíneos (intravasão) através da quebra da membrana basal e retração do endotélio vascular (CONTRAN et al., 2000; STEEG, 2006). A corrente sanguínea é um ambiente hostil para as células neoplásicas. A força da corrente sanguínea, a falta de substrato e a presença de células imunes são importantes fatores que limitam a presença das células neoplásicas neste ambiente (STEEG, 2006). Embora muitas de células sejam liberadas na circulação a cada dia por um tumor primário, apenas algumas metástases são formadas (CONTRAN et al., 2000). Isso se deve em parte aos fatores ligados à presença das células na circulação e à vigilância

imunológica. A heterogeneidade da massa tumoral também determina que apenas alguns subclones, aqueles que possuem a combinação correta de produtos gênicos para completar todas as etapas de invasão da matriz extracelular, disseminação vascular e implantação, sejam as capazes de metastatizar (COCKERELL & COOPER, 2002). Ainda, o simples desprendimento das células neoplásicas de um substrato (ECM) ou placa *in vitro* pode levar a morte celular, fenômeno que é denominado de *anoikis* (ZENG et al., 2002; JANES & WATT, 2006; STEEG, 2006). Esses fatores são determinantes e influenciam na ineficiência das células metastáticas de promover metástases (STEEG, 2006).

As células neoplásicas na circulação tendem a se agregar em grupos por adesão homotípica célula-célula e/ou heterotípica, com componentes do sangue (células sanguíneas, fibrinogênio e plaquetas), o que aumenta a sobrevivência das células neoplásicas e melhora a apreensão e a adesão ao endotélio dos vasos (CONTRAN et al., 2000; STEEG, 2006). A parada e a extravasão através da parede dos vasos segue, de maneira inversa, ao que ocorre na invasão e intravasão vascular. Neste processo também estão envolvidas proteases, integrinas e outras molécula de adesão, conforme previamente discutido (COCKERELL & COOPER, 2002).

No tecido, o sucesso da colonização depende crucialmente da interação da célula neoplásica com o seu microambiente (COCKERELL & COOPER, 2002; STEEG, 2006). O local onde as células tumorais circulantes deixam os capilares para formar depósitos secundários está relacionado, em parte, com a localização anatômica do tumor primário. Entretanto, as vias de drenagem naturais não explicam por completo a distribuição das metástases (CONTRAN et al., 2000). A caracterização molecular do microambiente dos sítios de metástases é importante na determinação do nicho pré-metastático dos neoplasma (STEEG, 2006).

Três possíveis vias de disseminação dos neoplasmas podem ocorrer: implantação direta nas cavidades ou superfícies corporais, disseminação linfática e disseminação hematogênica.

Pode ocorrer implantação nas cavidades ou superfícies corporais toda vez que um neoplasma penetrar superfícies serosas (COCKERELL & COOPER, 2002). Notavelmente, as células podem permanecer confinadas à superfície visceral e se implantar (CONTRAN et al., 2000) o que, em determinados neoplasmas, pode ser denominado de carcinomatose (COCKERELL & COOPER, 2002).

A metástase através dos linfáticos constitui a via mais comum para a disseminação inicial dos carcinomas (STACKER et al., 2002). Entretanto, os sarcomas também podem

utilizar esta via. O padrão de comprometimento dos linfonodos segue as vias naturais de drenagem através da drenagem por linfáticos pré-existentes ou pela formação de novos capilares linfáticos (STACKER et al., 2002; COCKERELL & COOPER, 2002). Entretanto, os linfonodos locais podem estar preservados, o que é denominado de metástases em salto. Este fato pode ocorrer através da presença de anastomoses venolinfáticas ou obstrução dos canais por inflamação (CONTRAN et al., 2000).

A disseminação hematogênica é típica de sarcomas, mas também é utilizada por carcinomas (CONTRAN et al., 2000; COCKERELL & COOPER, 2002). Ela pode ser tanto arterial quanto venosa. Na primeira, vários fatores condicionam os padrões de distribuição de metástases. Entretanto, com a invasão venosa, as células transportadas pelo sangue seguem o fluxo venoso, drenando o local do neoplasma. O fígado e os pulmões são mais frequentemente afetados de forma secundária. Toda drenagem da área portal flui para o fígado, e todo o sangue da cava flui para os pulmões (CONTRAN et al., 2000).

## **2.8 Microambiente tumoral**

Os neoplasmas podem ser considerados como um desequilíbrio de sociedades celulares (LIOTTA & KOHN, 2001; MERLO et al., 2006). Designados de “microcosmos da evolução”, os diversos grupos de células neoplásicas que compõem um determinado tumor (heterogeneidade) competem por espaço e recursos para sobreviver (MERLO et al., 2006). Ao invés de serem renegadas, as células neoplásicas são capazes de recrutar células do hospedeiro para produção de fatores de crescimento e citocinas a fim de modificar seu ambiente e seu comportamento (LIOTTA & KOHN, 2001). Portanto, o crescimento de um tumor não é determinado apenas pelas células neoplásicas malignas (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Todos os componentes celulares e moleculares do neoplasma fazem parte do que se denomina microambiente tumoral.

Os estudos sobre o microambiente tumoral tiveram como marco inicial as observações de MINTZ & ILMENSEE (1975). Utilizando camundongos como modelo experimental, células de teratocarcinoma de corpos embrionários *in vitro* foram injetadas em blastocistos normais. Surpreendentemente, os camundongos nasceram sem nenhuma evidência de tumores. Entretanto, as células derivadas do tumor estavam presentes em grande quantidade em diversos tecidos dos camundongos, mais notavelmente como espermatozóides funcionais. Concluíram, com base nesse estudo, que essas células neoplásicas totipotentes poderiam

reverter ao seu comportamento normal em um ambiente apropriado (MINTZ & ILLMENSEE, 1975).

DOLBERG & BISSEL (1984), inspirados nas observações supracitadas, demonstraram que a habilidade do vírus do sarcoma de Rous (*Rous sarcoma virus* – RSV) de produzir tumores também era dependente de seu contexto. O RSV injetado em asas de galinhas produz neoplasmas através do gene viral *v-src*. Entretanto, foi observado que nenhum tumor era produzido quando o RSV era injetado em embriões de 4 dias. Além disso, quando essas células embrionárias foram isoladas e cultivadas *in vitro*, elas adquiriam a capacidade e se transformavam em tumores. Portanto, concluiu-se que algum fator no ambiente embrionário era capaz de bloquear a tumorigênese (DOLBERG & BISSELL, 1984). Posteriormente, outro estudo de seu grupo demonstrou que a cicatrização era importante na habilidade da célula de promover a tumorigênese (DOLBERG et al., 1985).

Desde então, nos últimos 10 anos, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a importância do microambiente tumoral como fator crítico no desenvolvimento dos neoplasmas (LIOTTA & KOHN, 2001; COUSSENS & WERB, 2002; BARCELLOS-HOFF et al., 2005; KALLURI & ZEISBERG, 2006; OVERALL & KLEIFELD, 2006; DE VISSER et al., 2006). Uma complexa interação molecular entre células neoplásicas e não-neoplásicas, como células inflamatórias, fibroblastos e células do endotélio vascular têm sido descritas (KALLURI & ZEISBERG, 2006; OVERALL & KLEIFELD, 2006; DE VISSER et al., 2006). A matriz extracelular (ECM), a qual é intensivamente remodelada por proteases, também contribui ativamente ao microambiente, providenciando um solo crítico para a progressão tumoral, migração, disseminação metastática e promoção do crescimento neoplásico irrestrito (OVERALL & KLEIFELD, 2006; DE VISSER et al., 2006).

### 2.8.1 Células inflamatórias e microambiente tumoral

As principais funções do sistema imune são baseadas em três parâmetros: monitoramento da homeostase tecidual, proteção contra patógenos e eliminação de células danificadas (DE VISSER et al., 2006). Apesar do cuidadoso processo de regulação, as células podem se livrar das restrições que normalmente as regulam e proliferar de maneira descontrolada, formando um neoplasma (TIZARD, 2004a). Se essas células forem antígenicamente diferentes, serão consideradas estranhas ao organismo e eliminadas pelo sistema imune. A idéia de que tumores não são totalmente próprios foi concebida por Ehrlich,

que propôs que o reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imune pudesse representar um mecanismo positivo de defesa (CONTRAN et al., 2000), conceito que foi denominado posteriormente de vigilância imunológica. A presença de extensos infiltrados inflamatórios de células mononucleares (principalmente linfócitos, plasmócitos e/ou macrófagos) em carcinomas de mama de cães e em carcinomas gástricos e colorretais em humanos é associada com um prognóstico favorável (MISDORP, 2002; DE VISSER et al., 2006)

Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa podem exercer atividade anti-tumoral. As células da resposta inata, como as células dendríticas (*dendritic cell* – DC), assassinas naturais (*natural killer* – NK), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, fazem parte da primeira linha de defesa contra patógenos e células neoplásicas (CONTRAN et al., 2000). Se a homeostase tecidual é perturbada, macrófagos residentes e mastócitos imediatamente liberam uma série de mediadores como citocinas, quimiocinas, MMPs, espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e mediadores bioativos, como a histamina, que induzem a mobilização e a infiltração de mais leucócitos no local da lesão (COUSSENS & WERB, 2002). Os macrófagos e mastócitos também ativam a resposta vascular e de fibroblastos a fim de se iniciar e orquestrar o processo de reparo celular e cicatrização. As células dendríticas, por outro lado, migram aos órgãos linfóides e apresentam os antígenos às células do sistema imune adaptativo (DE VISSER et al., 2006). A indução de uma resposta eficiente necessita da direta interação das células apresentadoras de antígenos com as do sistema imune adaptativo, tal como os linfócitos B (*B-cell lymphocyte* – BcL), linfócitos T auxiliar ( $CD4^+$  *T helper lymphocyte* – ThL) ou citotóxico ( $CD8^+$  *T cytotoxic lymphocyte* – TcL) (DE VISSER et al., 2006). Juntas, a ativação dessas duas vias distintas (resposta inata e adaptativa) eficientemente removem ou eliminam patógenos, células danificadas e a ECM degradada (CONTRAN et al., 2000; TIZARD, 2004a).

Apesar da existência de mecanismos regulatórios contra as células neoplásicas, a idéia de que as células inflamatórias podem agir diretamente no desenvolvimento dos neoplasmas foi hipotetizada por Virchow em 1863, quando foi relacionada a presença de neoplasmas em locais com inflamação crônica (COUSSENS & WERB, 2002). A inflamação sozinha não é capaz de gerar um tumor. Entretanto, para entender a inflamação como parte integrante do microambiente tumoral, é importante revisar os aspectos fisiológicos e patológicos do processo inflamatório e de cicatrização (DE VISSER et al., 2006). A manutenção de um ambiente que é rico em fatores de crescimento, de proliferação celular e de agentes promotores de dano ao DNA certamente deve potencializar e/ou promover um risco maior de



desenvolver neoplasmas (COUSSENS & WERB, 2002; DE VISSER et al., 2006). O desenvolvimento de neoplasmas em locais cronicamente inflamados tem como principais exemplos a infecção crônica em humanos por *Helicobacter pylori* e a hepatite viral B e C (DE VISSER et al., 2006). Outras condições patológicas que levam à associação com os neoplasmas são: asbestose, esofagite de refluxo, inflamação na pele, colangite por *Opisthorchis sinensis* e a AIDS (COUSSENS & WERB, 2002).

O papel da inflamação no desenvolvimento tumoral ainda não está claro. O recrutamento de células inflamatórias é utilizado para conter o desenvolvimento tumoral, representando uma tentativa do hospedeiro de suprimir o crescimento neoplásico (CONTRAN et al., 2000; DE VISSER et al., 2006). Entretanto, a liberação de fatores de crescimento e sobrevivência, angiogênese, linfangiogênese, dano de DNA induzido, remodelamento da ECM, e aumento do número de receptores de adesão também possibilitam a progressão neoplásica e a evasão do sistema imune (Tabela 1) (COUSSENS & WERB, 2002). Esse papel paradoxal do sistema imune no desenvolvimento dos neoplasmas e a complexidade do microambiente são fundamentais e representam um desafio único no entendimento da completa gênese tumoral.

Tabela 1 – Mecanismos pelos quais as células imunes regulam o desenvolvimento dos neoplasmas. Fonte: tabela adaptada de VISSER et al., 2006.

<b>Resposta inata (macrófagos, mastócitos e granulócitos)</b>	<b>Resposta adaptativa</b>
<b>Mecanismos diretos</b>	<b>Mecanismos diretos</b>
- Indução de dano ao DNA através da geração de radicais livres (ROS).	- Inibição do crescimento tumoral pela atividade dos TcL
- Regulação parácrina de sinalização intracelular (através do fator kB)	- Inibição do crescimento tumoral pela lise das células neoplásicas mediada por citocinas.
<b>Mecanismos indiretos</b>	<b>Mecanismos indiretos</b>
- Promoção da angiogênese.	- Promoção do crescimento tumoral por linfócitos T regulatórios que suprimem a resposta antitumoral das células T.
- Remodelamento tecidual através da produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e MMPs.	- Promoção do desenvolvimento tumoral pela resposta imune humoral que aumenta a inflamação crônica no microambiente tumoral.
- Sobrerregulação da COX-2.	
- Supressão da resposta imune adaptativa anti-tumoral.	

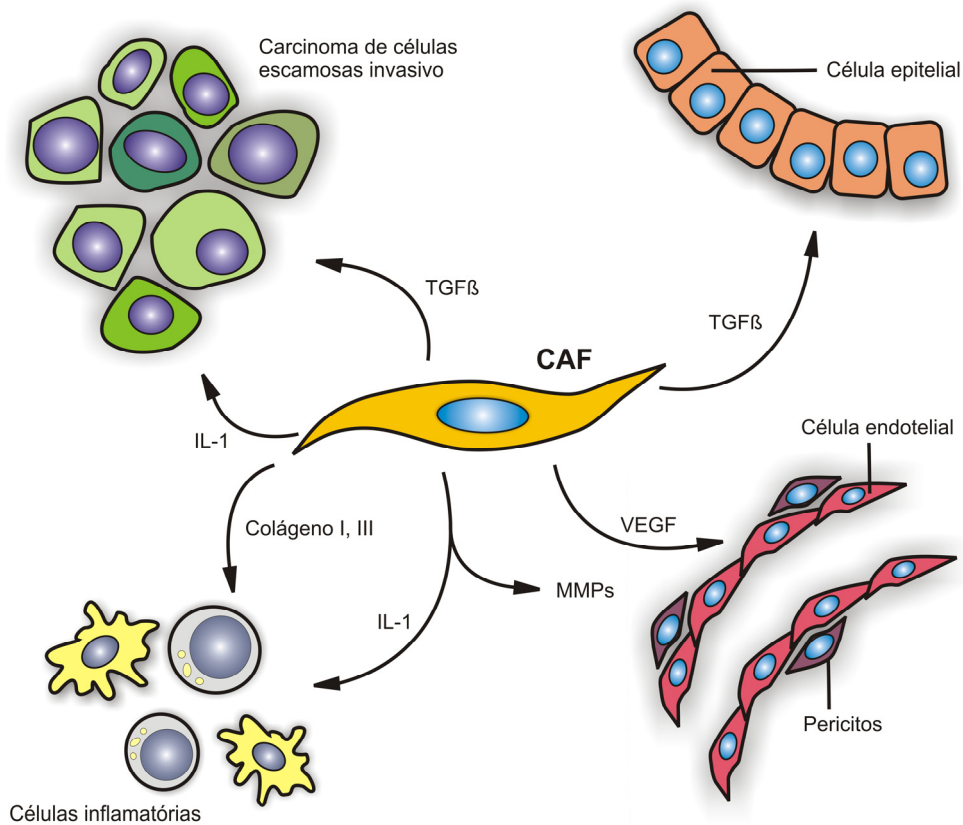
## 2.8.2 Fibroblastos associados a tumores

Os fibroblastos são os principais elementos celulares do tecido conjuntivo, os quais estão embebidos pela ECM nos tecidos (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Morfologicamente, eles são fusiformes ou alongados e suas principais funções incluem: produção e deposição da ECM, regulação da diferenciação epitelial, regulação da inflamação e envolvimento na cicatrização (KALLURI & ZEISBERG, 2006).

O processo de cicatrização de tecidos lesados é um processo biológico fundamental para a sobrevivência do indivíduo e inicia-se logo após a destruição tecidual (CONTRAN et al., 2000; WYNN, 2004). A proliferação de fibroblastos e de células endoteliais (angiogênese) no processo cicatricial leva à formação de um tecido especializado, a qual é comumente denominado de “tecido de granulação”. A neoformação de vasos sanguíneos, e o conseqüente aumento da permeabilidade vascular, resultam na deposição aumentada de proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina) na ECM, o qual proporciona um estroma provisório para a migração e proliferação de fibroblastos (CONTRAN et al., 2000). Diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$*  – TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento de fibroblastos 2 (*fibroblast growth factor 2* – FGF-2) induzem a proliferação e a ativação dos fibroblastos no sítio de lesão (BISSELL & RADISKY, 2001). A ativação dos fibroblastos também pode ocorrer através da presença de oxigênio reativo, fator C1, alterações da composição da ECM ou pelo contato com leucócitos utilizando moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1* – ICAM1) ou molécula de adesão celular-vascular 1 (*vascular-cell adhesion molecule 1* – VCAM1) (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Uma vez ativado, os fibroblastos também são induzidos a produzir MMPs e fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), promovendo a remodelação da ECM e a produção de novos vasos sanguíneos. Ainda, os mesmos mecanismos interagem com o epitélio, reduzindo a adesividade das células epiteliais, induzindo sua proliferação e sua mobilidade para repor o tecido lesado (Esquema 6) (BISSELL & RADISKY, 2001). A regeneração da membrana basal é seguida pela migração lateral não invasiva das células do epitélio e pela recomposição dos hemidesmossomos (BISSELL & RADISKY, 2001).

Normalmente, esse processo é temporário e reversível. Entretanto, quando a lesão e/ou processo inflamatório são persistentes, a intensa produção de proteases e de fatores de crescimento pelos fibroblastos ativados e células inflamatórias pode levar a quebra da

membrana basal e promover o crescimento anormal das células (BISELL & RADISKY, 2001; COUSSENS & WERB, 2002). Nesses locais, qualquer célula epitelial que adquiriu potencial tumorigênico pode começar a proliferar. Ainda, essas interações com o microambiente podem levar a instabilidade genômica, possibilitando a aquisição de um fenótipo maligno (BISELL & RADISKY, 2001).



Esquema 6 – Funções dos fibroblastos ativados (CAF) no estroma tumoral. Os fibroblastos comunicam-se com as células neoplásicas, inflamatórias, endoteliais, células epiteliais residentes e pericitos através da secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Através da deposição aumentada de colágeno I e III, além da produção de tenascina C, os fibroblastos induzem uma alteração no microambiente da ECM, o que potencializa os sinais oncogênicos, acelerando a progressão tumoral. Os fibroblastos medeiam a reação inflamatória pela secreção de quimiocinas, tal como a IL-1. Os fibroblastos também interagem com a microvasculatura através da secreção de MMPs e VEGF. Eles também produzem sinais potencialmente oncogênicos, como o TGF-β, ao epitélio residente, estimulando diretamente a proliferação e a invasão neoplásica. Fonte: esquema adaptado de KALLURI & ZEISBERG (2006).

DOLBERG et al. (1985) demonstraram que a cicatrização é essencial para o desenvolvimento do sarcoma de Rous. Desde então, diversos estudos têm demonstrado que a cicatrização e seu principal constituinte (fibroblastos) são peças-chave no desenvolvimento e na progressão tumoral (BISELL & RADISKY, 2001; COUSSENS & WERB, 2002;

KALLURI & ZEISBERG, 2006; DE VISSER et al., 2006). Os fibroblastos dentro do estroma tumoral, que adquirem um fenótipo alterado, semelhante ao que ocorre na cicatrização, são denominados de fibroblastos associados aos carcinomas (*carcinoma associated fibroblasts* – CAFs), fibroblastos peritumorais, fibroblastos reativos do estroma, estroma tumoral ativado ou fibroblastos associados a tumores (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Os CAFs, assim como os fibroblastos ativados normais, expressam  $\alpha$ -actina de músculo liso ( *$\alpha$ -smooth muscle actin* –  $\alpha$ SMA) sendo muitas vezes denominados de miofibroblastos. A transformação de fibroblastos normais para CAF pode ser induzida principalmente pelo TGF- $\beta$ , que medeia a mesma ativação durante o processo de cicatrização e fibrose.

Os carcinomas invasivos, como os CCEs, estão frequentemente associados à expansão do estroma tumoral e a um aumento da deposição da ECM. Essa deposição aumentada em tumores é conhecida como desmoplasia (ou reação desmoplásica) e é similar ao processo de cicatrização e fibrose (CONTRAN et al., 2000; CULLEN et al., 2002). Entretanto, enquanto a fibrose de um órgão está associada à rarificação da microvasculatura, os tumores normalmente são mais vascularizados (DVORAK, 1986; KALLURI & ZEISBERG, 2006). O estroma desmoplásico dos tumores contém grande quantidade de colágeno fibrilar, fibronectinas, proteoglicanos e tenascina C, as quais estão correlacionadas com aumento da invasividade em carcinomas de mama e bexiga em humanos (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Diversos estudos têm demonstrado que o papel dos CAFs é proeminente na progressão, crescimento e disseminação tumoral (DVORAK, 1986; COUSSENS & WERB, 2002; BIERIE & MOSES, 2006; KALLURI & ZEISBERG, 2006).

## **2.9 Eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE):**

Os eosinófilos são células polimorfonucleares, pouco maiores que os neutrófilos, com grânulos no citoplasma que se coram intensamente pelo corante eosina, de onde deriva o seu nome. Eles se originam da medula óssea e permanecem trinta minutos na circulação sanguínea antes de migrar aos tecidos, onde a meia-vida é de aproximadamente 12 dias. Sua quantidade no sangue varia de 2% no cão a 10% nos bovinos (TIZARD, 2004b).

O crescimento e a diferenciação dos eosinófilos ocorrem na medula óssea e são promovidos pela interação de citocinas: fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (*granulocytic-monocytic - colony stimulating factor* – GM-CSF), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-5 (IL-5), sendo que esta última age mais

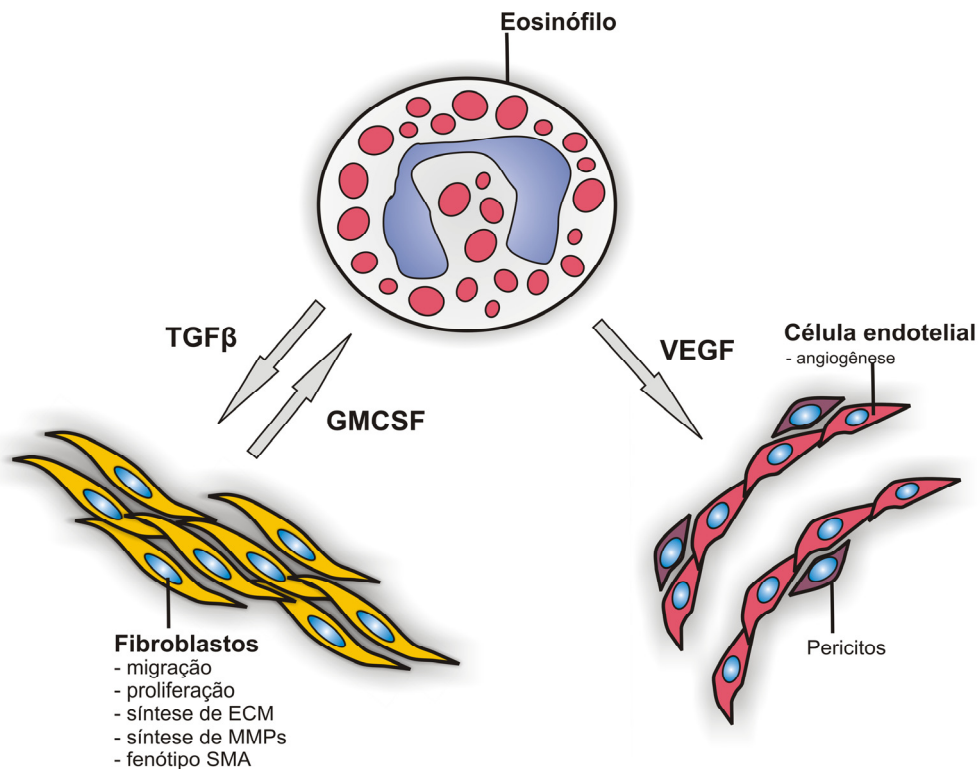
especificamente na linhagem dos eosinófilos (WARDLAW, 1994). Apesar de ter sido detectada nos mastócitos e eosinófilos, os linfócitos T são provavelmente as principais fontes desta citocina (WARDLAW, 1994; DORTA, 2000).

Microscopicamente, os eosinófilos contêm dois tipos de grânulos. Seus grânulos primários contêm arilsulfatase, peroxidase e fosfatase ácida (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; TIZARD, 2004b). Os do segundo tipo (secundários) possuem um centro cristalóide pouco elétron-denso formado pela proteína básica principal (*major basic protein* – MBP), o qual é circundado por uma matriz contendo a proteína catiônica eosinofílica (*eosinophilic cationic protein* – ECP), a peroxidase eosinofílica (*eosinophilic peroxidase* – EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (*eosinophil-derived neurotoxin* – EDN) (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004; TIZARD, 2004b). Os eosinófilos contêm também corpos lipídicos, organelas não aderidas à membrana celular, que são as principais responsáveis pelo armazenamento do ácido araquidônico, sendo a principal fonte de produção de prostaglandinas e leucotrienos no eosinófilo normal (DORTA, 2000).

Os mediadores químicos contidos em seus grânulos desempenham importantes funções na patofisiologia da célula. A MBP é a proteína mais abundante dos grânulos e, embora não apresente ação enzimática, ela é uma potente toxina citolítica (DORTA, 2000; TIZARD, 2004b). A ECP possui sua ação através da criação de canais e poros nas células-alvo. A EPO age como uma proteína catiônica ou uma peroxidase na ausência ou presença de peróxido de oxigênio, respectivamente. Todas são capazes de promover a destruição de bactérias e parasitas, sendo também responsáveis em boa parte pela defesa contra as células tumorais (DORTA, 2000).

Em virtude das características de seus grânulos, os eosinófilos têm sido observados e associados a diversas condições patológicas como doenças alérgicas, comumente associadas à mastócitos, infecções parasitárias e neoplasmas (TIZARD, 2004b). Sua presença nos tecidos sempre incitou grande curiosidade pelos pesquisadores, principalmente na última década, o que se refletiu em um exponencial número de publicações e um aumento no conhecimento de suas funções nos tecidos desde então (THIERY, 2002; MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004). Entretanto, inúmeras controvérsias permanecem a respeito de seu verdadeiro papel nos processos patológicos, podendo ter tanto um papel benéfico como deletério ao hospedeiro (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004). Isso por que seus mediadores químicos estão envolvidos tanto no papel de defesa do organismo quanto na promoção de cicatrização e fibrose, tanto fisiológica quanto patológica. Além de modular os fibroblastos através de citocinas, a MBP e a EDN possuem características pro-fibrogênicas, agindo sinergicamente

com a interleucina 1 (IL-1) e TGF- $\beta$  para aumentar a produção de IL-6, a qual estimula a produção de fibroblastos. Os eosinófilos ainda produzem TGF- $\beta$ , o mais potente fator fibrogênico, além de FGF-2 e VEGF, contribuindo para a angiogênese (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004). Eles também contêm proteases pré-formadas (como as MMPs) que podem modular a formação de ECM (Esquema 7) (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004).



Esquema 7 – A interação dos eosinófilos com fibroblastos e células endoteliais influencia diversos processos fisiológicos e patológicos. Nos tumores, seu papel na angiogênese está baseado na secreção de VEGF. O TGF- $\beta$  produzido pelos eosinófilos induz a proliferação e migração dos fibroblastos. Além disso, induz a produção e o remodelamento da ECM e a aquisição de um fenótipo contrátil, através da expressão de SMA. Os fibroblastos, por sua vez, estimulam a proliferação de mais eosinófilos e células inflamatórias, perpetuando o ciclo. Fonte: adaptado de MUNITZ & LEVI-SCHAFFER (2004).

A presença de eosinófilos em neoplasmas de humanos e animais tem sido observada em diversos estudos e foi denominada de eosinofilia tecidual associada a tumores (*tumor-associated tissue eosinophilia* – TATE) (DORTA, 2000). Ela já foi observada em neoplasmas cutâneos, mamários, pulmonares, gastrintestinais e geniturinários de humanos (DORTA, 2000) e em muitos neoplasmas de animais domésticos, principalmente em mastocitomas (HEAD et al., 2002; RECH, 2003) e linfossarcomas gastrintestinais (OZAKI et al., 2006). A TATE também é comumente observada nos carcinomas de células escamosas (CCEs) em

humanos. Diversos estudos têm associado a presença e/ou a intensidade da TATE com o prognóstico (Tabela 2). Entretanto, os resultados são muito controversos, correlacionados tanto com um prognóstico favorável, como desfavorável, ou mesmo não apresentando qualquer relação com a evolução dos pacientes (DORTA, 2000; DORTA et al., 2002; SAID et al., 2005; ERCAN et al., 2005). Tal fato deve-se, em parte, à ausência de uma metodologia padronizada e bem estabelecida para a avaliação dos eosinófilos nos CCEs. O perfeito entendimento dos diversos mecanismos de atração dos eosinófilos e seu papel nos tumores ainda necessita estudos.

## **2.10 Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs)**

As regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (*argyrophilic nucleolar organizer regions* – AgNORs) são proteínas com afinidade para prata associadas a agregados de DNA ribossomal (rDNA) no núcleo (LOHR et al., 1997; CULLEN et al., 2002). O arranjo do rDNA, também conhecido como nucléolo ou regiões organizadoras (NORs), formam locais onde os genes do RNA ribossomal (rRNA) permanecem em interfase e mitose (genes do rRNA ativo no nucléolo e em reorganização do nucléolo no final da telófase, respectivamente) (BRATULIC et al., 1996; LOHR et al., 1997). Como o nucléolo é o local da produção de rRNA, e sendo este necessário para a síntese protéica, células que se replicam rapidamente requerem uma abundante quantidade de proteína e, conseqüentemente, possuem um maior número de AgNORs (CULLEN et al., 2002). Tem-se, portanto, que a taxa de AgNORs (número e/ou tamanho) está diretamente relacionada com a atividade proliferativa da célula, através da maior transcrição do RNA ribossomal (rRNA) necessária para a montagem dos ribossomos (LOHR et al., 1997; MADEWELL, 2001). Em células normais, as AgNORs estão normalmente arranjadas em apenas um nucléolo. No entanto, em neoplasmas, as AgNORs tendem a se desagregar do nucléolo e a se dispersar pelo núcleo. Seu número aumenta progressivamente em células em fase G0 a fase S (MADEWELL, 2001).

Em tumores, muitas técnicas histológicas tem sido utilizadas para se avaliar as NORs (BRATULIC et al., 1996). A intensidade de coloração, formato e número são indicativos de atividade metabólica celular, síntese de DNA e nível de proliferação (MADEWELL, 2001; ROMÃO-CORRÊA et al., 2005). As técnicas de visualização baseiam-se na impregnação através do uso de uma solução coloidal e de prata a 50%, a qual foi padronizada por PLOTON et al. (1986).

Tabela 2 – Lista de publicações relacionando a TATE e os diferentes fatores prognósticos em humanos. A metodologia utilizada em cada estudo também está apresentada.

Autor(es)	Número de eosinófilos por campo de maior aumento (400X)					Relação positiva com fatores prognósticos***	Relação da TATE com o prognóstico
	Ausente	Leve	Moderado	Acentuado	Maciço		
LOWE & FLETCHER (1984)*	-	-	>10	>100	-	Nenhuma	Nenhuma
DESSY et al. (1986)*	-	ausente/ presença esporádica	até 10	>10	-	Grau de diferenciação Infiltrado de mastócitos	Sim (favorável)
GOLDSMITH et al. (1987)*	0	5 a 10	10 a 20	20 a 30	>30	Evolução clínica	Sim (favorável)
GOLDSMITH et al. (1992)*	0 a 2	2 a 10	10 a 20	20 a 30	>30	Evolução clínica	Sim (favorável)
HORIUCHI et al. (1993)*	-	leve	moderado	acentuado	-	Expressão de antígeno HLA-DR	Sim (ruim)
THOMPSON et al. (1994)*	-	1 a 5	5 a 10	>20	-	Localização do tumor	Nenhuma
SASSLER et al. (1995)*	-	1 a 5	5 a 10	>10	-	Intensidade do IILP e pleomorfismo nuclear	Nenhuma
LEIGHTON et al. (1996)*	-	até 10	>10	>100	-	Nenhuma	Nenhuma
DERON et al. (1996)*	-	positivo: >2 (TATE não graduada)			-	Evolução clínica	Sim (favorável)
DORTA (2000)	-	0 a 26**	27 a 83**	>84**	-	Intensidade e localização do IILP	Sim (favorável)
ERCAN et al. (2005)	0	1 a 5	6 a 20	21 a 100	>101	Idade	Nenhuma
SAID et al. (2005)	0	1 a 4	5 a 19	>20	-	Migração e invasão	Sim (ruim)

\* Dados retirados e adaptados da revisão de DORTA (2000). \*\* número de eosinófilos por milímetro quadrado. \*\*\* antígeno HLA-DR: (*human lymphocyte antigen – DR*) antígeno DR de linfócito humano. IILP: infiltrado inflamatório linfoplasmocítico.



O método de contagem do número total de NORs dividido pelo número de células contadas (geralmente 100 células neoplásicas), denominado AgNOR médio (mAgNOR), já foi aplicado a diversos tumores de humanos e animais domésticos para a determinação do índice de proliferação das células (BOSTOCK et al., 1989; BRATULIC et al., 1996; ROMÃO-CORRÊA et al., 2005). Desde então, diversos estudos demonstraram que as células neoplásicas malignas possuem um maior número de AgNORs do que as células normais, hiperplásicas ou neoplásicas benignas (CULLEN et al., 2002). O significado prognóstico dessas contagens foi observado em mastocitomas, linfossarcomas, carcinomas de pele e neoplasmas mamários em cães e/ou gatos (BOSTOCK et al., 1989; SIMOES et al., 1994; KRAVIS et al., 1996; BRATULIC et al., 1996; LOHR et al., 1997; MADEWELL, 2001; RECH, 2003). Em geral, o estudo das AgNORs provê uma boa visão da atividade nuclear e a melhor compreensão do comportamento biológico tumoral (MADEWELL, 2001; CULLEN et al., 2002).

Em humanos, o carcinoma de células escamosas (CCEs) é o principal neoplasma de cabeça e pescoço, e sua ocorrência está relacionada principalmente ao consumo de álcool e ao tabagismo (JANES & WATT, 2006). Diversos estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre o número de AgNORs e o grau de diferenciação (GULER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; PILLAI et al., 2005) e/ou o índice proliferativo (XIE et al., 1999; MONTROYA et al., 2001).

OLIVEIRA et al. (2005), estudando os CCEs de cabeça e pescoço em humanos, observou uma relação direta entre o mAgNOR e o grau histológico e, portanto, a um prognóstico ruim. Outro método de contagem, estabelecendo-se a percentagem de núcleos com um ou mais AgNORs em 100 células (pAgNOR), também tem sido utilizado. Através deste método, verificou-se que a pAgNOR é um importante parâmetro e que pode ser usado para se avaliar a velocidade de replicação celular. Outros autores também tem relacionado a pAgNOR como um melhor método para prever o comportamento biológico, quando comparados com o mAgNOR (XIE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, o mAgNOR permanece o método de contagem de AgNORs mais utilizado. Através do uso concomitante de marcadores de proliferação celular (Ki-67, um antígeno nuclear expressado nas fases G1 e M do ciclo celular), foi observado que existe uma íntima relação entre o pAgNOR e a fase do ciclo celular em que a célula neoplásica está (XIE et al., 1999). Como as células em repouso (G0) possuem normalmente um AgNOR, e que seu número aumenta do início da fase-G1 ao final da S/G2, estudos com dupla coloração utilizando-se AgNOR e

imunohistoquímica para Ki-67 tem demonstrado uma relação positiva entre os dois métodos (XIE et al., 1999; MONTOYA et al., 2001).

Nos animais domésticos, a contagem de mAgNORs tem sido utilizada como método auxiliar no diagnóstico e como uma importante ferramenta prognóstica dos CCEs em cães (MADEWELL, 2001). Entretanto, até o presente momento, não há estudos relacionando a contagem de AgNORs, e o grau de diferenciação dos CCEs de bovinos intoxicados por samambaia.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras dos neoplasmas e parâmetros analisados

Foram estudadas 40 amostras de carcinomas de células escamosas (CCEs) do trato alimentar superior (TAS) de bovinos intoxicados espontaneamente por samambaia (*Pteridium aquilinum*). Estes tumores eram de 40 bovinos de 37 propriedades rurais dos municípios de Jaguari e Nova Esperança do Sul, RS, recebidos no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV-UFSM) no período de Agosto/2003 a Agosto/2006. Desses, 30 animais pertenceram ao estudo de MOREIRA SOUTO et al. (2006). Todos os dados de resenha dos animais encontram-se no Apêndice A.

Após a fixação em formol 10%, os neoplasmas foram clivados e encaminhados ao processamento histológico de rotina. Apenas um fragmento representativo do CCE de maior extensão em centímetros de cada animal foi selecionado para este estudo (identificados como Bovinos 1 a 40). A avaliação microscópica dos neoplasmas foi feita através de secções histológicas de 3µm coradas por hematoxilina-eosina.

O único dado de anamnese avaliado foi a idade dos bovinos. Os parâmetros morfológicos analisados em cada caso foram: localização anatômica do CCE no TAS, grau de diferenciação celular (ou grau histológico), ocorrência de metástases, intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) peritumoral e ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre.

Utilizando-se a técnica de imunistoquímica, foram avaliados: padrões morfológicos de migração e invasão, intensidade da reação desmoplásica peritumoral e ocorrência de invasão vascular linfática e/ou sangüínea.

Adicionalmente, foi avaliada a ocorrência e intensidade da eosinofilia tecidual associada ao tumor (*tumor associated tissue eosinophilia* – TATE) e a quantificação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (*argyrophilic nucleolar organizer regions* – AgNORs).

Os resultados foram avaliados estatisticamente conforme o item 3.11.

### **3.2 Idade dos bovinos**

Quanto à idade, os bovinos foram classificados em jovens (até dois anos de idade), adultos (de três a sete anos) e idosos (acima de oito anos). A idade média dos bovinos foi determinada através da distribuição da frequência das idades.

### **3.3 Localização anatômica do CCE no TAS**

A distribuição dos CCEs no TAS foi classificada em três regiões: cranial (neoplasmas localizados na base da língua, faringe/orofaringe e epiglote), média (esôfago) e caudal (neoplasmas encontrados na entrada do rúmen e rúmen). Para esta classificação, foi considerado apenas o CCE de maior extensão (em centímetros), nos casos em que havia mais de um CCE ao longo do TAS, conforme a metodologia empregada por MOREIRA SOUTO (2005).

### **3.4 Grau de diferenciação celular (ou grau histológico)**

Quanto ao grau de diferenciação celular, os CCEs foram classificados em bem (BD), moderadamente (MD) ou pouco diferenciados (PD), baseado principalmente no grau de queratinização (MURPHY et al., 2004), seguido de pleomorfismo nuclear e celular e atividade mitótica (HEAD et al., 2002).

### **3.5 Ocorrência de metástases**

Metástases para linfonodos e/ou órgãos distantes foram avaliadas macroscopicamente e consideradas somente quando as mesmas estavam presentes nas seções histológicas examinadas. As metástases foram classificadas quanto a sua distribuição, relacionadas com a localização anatômica do CCE analisado (regiões cranial, média ou caudal do TAS) e com o grau de diferenciação do CCE.

### **3.6 Intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral**

O infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) peritumoral foi classificado conforme a intensidade em ausente (0), leve (1), moderado (2) ou acentuado (3). Para a avaliação do IILP, somente os infiltrados inflamatórios que circundavam as células ou conjuntos de células neoplásicas foram considerados. Não foram avaliadas as áreas ulceradas e com infecção bacteriana secundária.

### **3.7 Ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre**

A necrose foi classificada em presente ou ausente, associada ou não com queratina livre no estroma tumoral. Novamente, não foram consideradas as regiões relacionadas com úlceras e infecção bacteriana secundária.

### **3.8 Técnica de imunistoquímica**

A técnica de imunistoquímica foi realizada utilizando-se lâminas silanizadas com duas secções histológicas de 3µm de cada CCE. Após a desparafinização e re-hidratação com banhos de xilóis e alcoóis em diferentes concentrações, as secções histológicas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 20 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em solução de Tris-EDTA (pH 9,0), em forno microondas, com potência máxima (800W) por 10 minutos.

Os anticorpos primários, diluídos em diluente de anticorpo (DakoCytomation, cód. S3022), foram adicionados separadamente nos cortes histológicos e incubados “overnight” a 4°C em câmara úmida. Foram utilizados como anticorpos (Acs) primários o Ac policlonal anti-pancitoqueratina bovina produzido em coelho, (DakoCytomation, cód. Z0622), na diluição de 1:2000, e o Ac monoclonal anti-vimentina humana, clone V9 (DakoCytomation, cód. M0725), na diluição de 1:100.

O Ac secundário biotilado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB) (DakoCytomation, cód. K0690) foram incubados consecutivamente à temperatura ambiente por 30 minutos e marcados através da adição do cromógeno de tetracloreto de 3-

3'diaminobenzidina (DAB, Sigma, cód. D-5637). As secções histológicas foram então contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas, clarificadas e montadas em meio de montagem sintético (Entellan®).

Como controles positivos, foram utilizadas secções histológicas previamente estabelecidas como citoqueratina e vimentina positivas. No controle negativo, as mesmas secções dos CCEs testados foram utilizadas, com a substituição dos Acs primários por diluente de anticorpo. O detalhamento do protocolo de imunistoquímica encontra-se nos APÊNDICES B e C.

### 3.8.1 Padrões morfológicos de migração e invasão

Nas secções imunomarcadas para citoqueratina, foram analisados os padrões morfológicos de migração e invasão das células neoplásicas em meio ao estroma tumoral. Estes padrões foram classificados em cinco tipos: ilhas (IL), fitas (FI), cordões (CO), agregados (AG) e células individuais (CI) (conforme o Esquema 3 da revisão de literatura). As variantes morfológicas caracterizadas pela formação de extensas ilhas e fitas de queratinócitos neoplásicos tinham numerosas camadas de queratinócitos neoplásicos, com presença ou não de pérolas de queratina e/ou queratinização individual de células. As ilhas foram caracterizadas como grupos celulares bem delimitados, de formato circular, delineados ou não por uma camada de células semelhantes às células basais do epitélio. As fitas eram formações alongadas em faixas celulares. Os cordões caracterizavam-se como pequenos conjuntos alongados (fileiras) de uma a duas camadas de células neoplásicas. Pequenos ninhos de duas a cinco células foram classificados como agregados. A presença de células individuais foram subdivididas de acordo com seu formato em redondas (amebóides) e alongadas (fusiformes), conforme revisão de FRIEDL & WOLF (2003). Nas secções analisadas, cada padrão morfológico foi classificado e numerado quanto a sua intensidade em: ausente (0), leve (1), moderado (2) e acentuado (3). Dentro de cada grau histológico (BD, MD e PD), foram somadas as intensidades de cada padrão de migração e invasão. Cada soma foi então dividida pela soma de todos os padrões morfológicos de cada grau de diferenciação, obtendo-se, no final, o percentual relativo de cada padrão.

### 3.8.2 Intensidade da reação desmoplásica peritumoral

A intensidade da reação desmoplásica peritumoral foi avaliada nas secções marcadas pela vimentina e classificadas quanto a sua intensidade em ausente (0), leve (1), moderada (2) ou acentuada (3).

### 3.8.3 Ocorrência de invasão vascular linfática ou sangüínea

Comparando as secções imunomarcadas para citoqueratina e vimentina, foi avaliada a ocorrência de invasão vascular sangüínea e/ou linfática. Em cada secção estudada, a invasão vascular foi dada quando observado pelo menos um vaso (linfático ou sangüíneo) contendo agregados celulares neoplásicos epiteliais em seu interior.

## 3.9 Ocorrência e intensidade da TATE

A intensidade da TATE foi obtida através da soma do número de eosinófilos (eos) em cinco campos aleatórios de grande aumento (cga; 400x) divididos por cinco, resultando no número médio de eos/cga. Apenas áreas adjacentes ao epitélio neoplásico não-ulcerado foram consideradas. A TATE foi classificada quanto à intensidade em: ausente (0), leve (1), quando observados até três eos/cga, moderada (2), quando contados de três a vinte eos/cga e acentuada (3), quando encontrados mais de vinte eos/cga, semelhante à metodologia desenvolvida por DORTA (2000).

## 3.10 Quantificação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs)

A evidenciação das AgNORs foi realizada através da técnica adaptada de Romão-Corrêa et al. (2005) para neoplasmas cutâneos em humanos. Após a desparafinização, as secções histológicas de 3µm foram lavadas em água deionizada e coradas com adição por gotejamento de solução coloidal (composta por gelatina a 2% e 1% de ácido fórmico em água

deionizada) e de nitrato de prata a 50% ( $\text{AgNO}_3$ ), na proporção de 1:2, respectivamente. As secções foram então incubadas em estufa a 37°C por 20 minutos, contracoradas com amarelo de metanila, desidratadas, clarificadas e montadas com uso de meio de montagem sintético (Entellan®, Merck).

A quantificação das NORs foi estabelecida através da contagem das estruturas impregnadas por prata (pontos pretos ou marrom-escuros) no interior do núcleo de 100 células neoplásicas, em campos aleatórios e representativos (em imersão, sob aumento de 1.000X, em microscopia de luz) e divididos por 100.

### **3.11 Análise estatística**

O grau de diferenciação foi comparado com: localização do CCE no TAS, infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral, ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre, padrão morfológico de migração e invasão, intensidade da reação desmoplásica peritumoral, ocorrência de invasão vascular linfática ou sangüínea e com a ocorrência de metástases. Esses parâmetros foram analisados através da formação de tabelas de contingência simples e análise descritiva.

A intensidade da TATE foi comparada com: idade dos bovinos, localização do CCE no TAS, grau de diferenciação celular, intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral, ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre, intensidade da reação desmoplásica peritumoral e ocorrência de metástases. A análise estatística foi realizada através do teste de associação qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com 95% de intervalo de confiança.

A interação entre a contagem de AgNOR e o grau de diferenciação celular foi determinada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação múltipla de todos os pares (método de Holm-Sidak), estabelecendo 95% de intervalo de confiança.



## 4 RESULTADOS

Os resultados gerais foram tabulados e apresentados na Tabela 3. Cada parâmetro analisado será detalhado a seguir.

### 4.1 Idade

Nos 40 casos de intoxicação espontânea e crônica por samambaia, o maior número de carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) ocorreu em bovinos de 8 anos (27,5%), variando entre 6,5 e 9 anos. Apenas adultos (42,5%) e idosos (57,5%), na faixa dos 3 aos 13 anos de idade, foram acometidos (Gráfico 1).

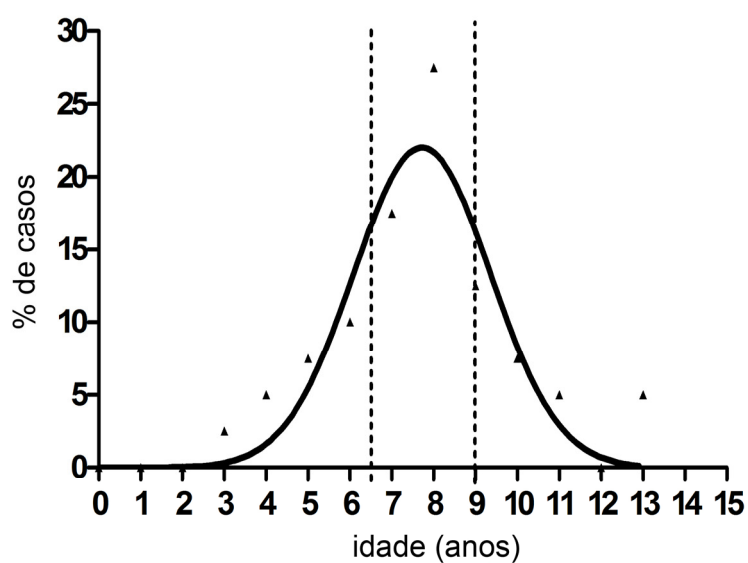


Gráfico 1 – Gráfico da distribuição de frequência das idades dos 40 bovinos. A idade média é de 8 anos, variando de 6,5 a 9 anos (região entre as linhas pontilhadas).

Tabela 3 – Distribuição dos resultados gerais da idade e dos parâmetros histomorfológicos dos 40 bovinos analisados.

Bovino	Protocolo	Idade (anos)	Localização no TAS <sup>A</sup>	Grau de diferenciação <sup>B</sup>	IILP <sup>C,D</sup>	Desmoplasia <sup>D</sup>	Necrose <sup>E</sup>	Queratina livre <sup>E</sup>	Granuloma <sup>E</sup>	Metástase <sup>E</sup>	Número de eos/cga <sup>F</sup>	Número de AgNOR
1	Vn-263-03	4	ER	PD	2	3	▲	-	▲	▲	6,6	2,17
2	Vn-264-03	7	ER	BD	2	3	▲	▲	-	-	4	1,74
3	Vn-357-03	13	BL	BD	3	2	▲	▲	-	▲	11,8	1,51
4	Vn-401-03	7	RU	BD	2	3	-	-	▲	▲	107,6	1,44
5	Vn-011-04	6	F/O	MD	3	2	▲	-	-	▲	110	1,72
6	Vn-029-04	8	F/O	BD	1	3	-	-	-	▲	0	1,58
7	Vn-030-04	8	RU	PD	1	3	▲	-	-	▲	2,6	2,35
8	V-138-04	11	F/O	BD	1	3	▲	▲	▲	-	0	1,8
9	V-165-04	9	ECR	MD	1	3	-	-	▲	-	0	1,82
10	Vn-050-04	5	EP	BD	2	1	-	-	▲	▲	69,6	1,91
11	Vn-051-04	5	F/O	MD	3	3	-	-	-	▲	108,2	2,26
12	Vn-078-04	6	BL	BD	1	1	-	-	-	▲	0	1,23
13	Vn-080-04	8	ECA	BD	3	2	▲	▲	▲	-	8	1,54
14	Vn-113-04	7	ER	MD	3	3	▲	-	-	-	2,6	2,06
15	V-495-04	3	RU	BD	3	2	▲	▲	▲	-	37,6	1,57
16	Vn-185-04	7	ER	BD	3	1	▲	-	▲	▲	17,8	1,76
17	Vn-221-04	7	BL	BD	2	1	▲	▲	▲	-	19,8	1,81
18	V-637-04	11	RU	MD	1	3	▲	▲	▲	▲	6,4	2,3
19	Vn-300-04	7	ER	BD	3	3	▲	▲	▲	-	1,8	1,86
20	Vn-302-04	10	ER	BD	3	2	▲	-	-	-	0	1,49

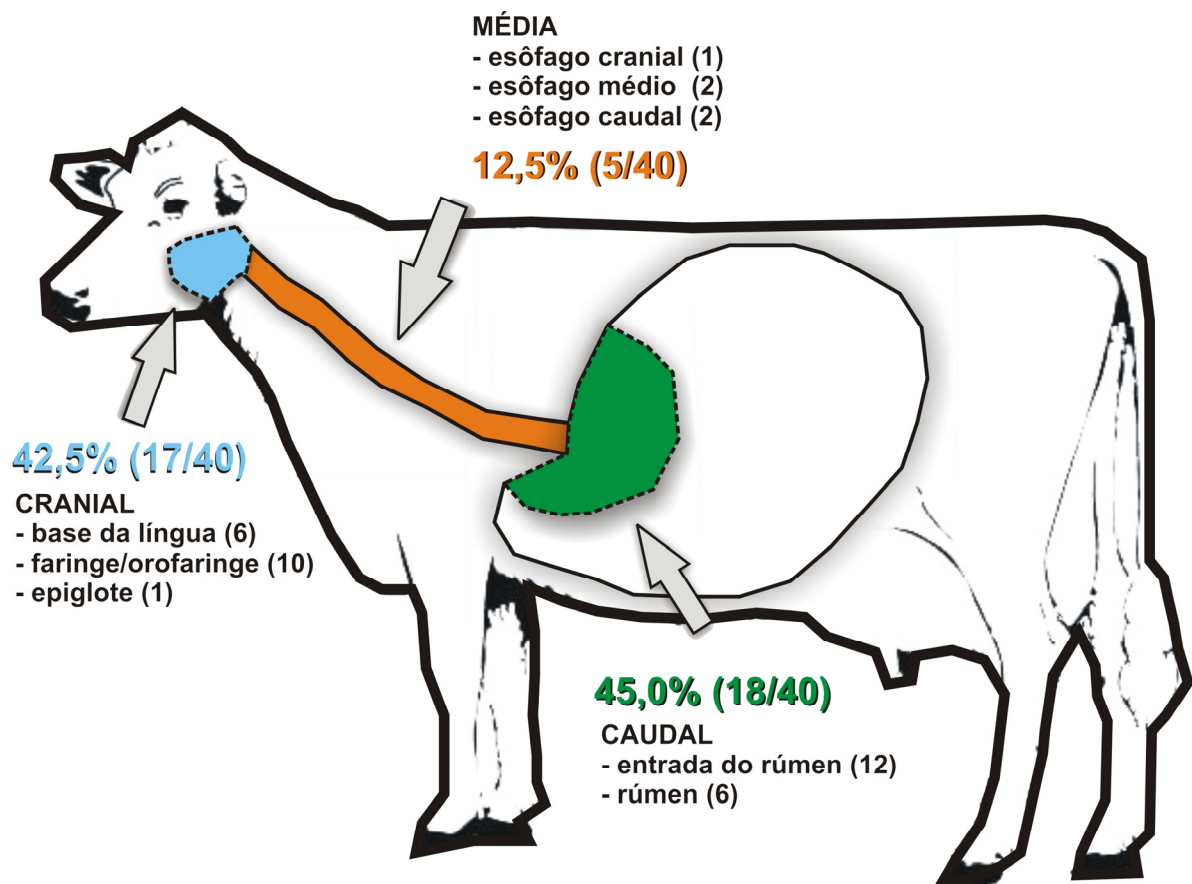
Tabela 3 – Distribuição dos resultados gerais dos parâmetros epidemiológicos e histomorfológicos dos 40 bovinos analisados (continuação).

Bovino	Protocolo	Idade (anos)	Localização no TAS <sup>A</sup>	Grau de diferenciação <sup>B</sup>	IILP <sup>C,D</sup>	Desmoplasia <sup>D</sup>	Necrose <sup>E</sup>	Queratina livre <sup>E</sup>	Granuloma <sup>E</sup>	Metástase <sup>E</sup>	Número de eos/cga <sup>F</sup>	Número de AgNOR
21	Vn-305-04	8	BL	BD	3	3	▲	▲	-	▲	34	1,53
22	Vn-366-04	10	ER	MD	1	1	▲	▲	-	▲	8,4	1,85
23	Vn-367-04	8	F/O	BD	3	3	▲	▲	-	-	2	2,04
24	Vn-373-04	9	BL	BD	1	1	▲	▲	▲	-	64,8	1,6
25	Vn-428-04	9	EME	BD	3	3	▲	▲	▲	-	81,6	1,92
26	V-431-05	8	F/O	BD	3	3	▲	▲	▲	▲	3,6	1,32
27	V-475-05	13	RU	MD	3	3	▲	-	-	▲	1	1,65
28	V-476-05	8	ECA	PD	3	3	-	-	-	▲	49	2,39
29	V-507-05	6	ER	PD	1	3	▲	-	-	▲	1,8	2,83
30	V-666-05	8	ER	BD	3	3	▲	▲	▲	-	0,8	1,74
31	V738-05	9	ER	MD	2	2	▲	▲	▲	▲	2,2	1,39
32	V882-05	10	EME	BD	3	2	▲	▲	-	▲	31,2	1,74
33	V003-06	9	ER	BD	1	3	▲	▲	-	-	3	1,56
34	V449-06	5	F/O	BD	3	1	▲	▲	▲	▲	0	1,65
35	V466-06	4	BL	BD	2	3	-	-	-	-	7	1,74
36	V544-06	8	F/O	BD	1	1	-	-	-	-	0,8	1,11
37	V545-06	8	RU	BD	1	3	-	-	-	▲	0	2,12
38	V590-06	7	F/O	BD	3	1	▲	▲	▲	-	27,8	1,83
39	V616-06	8	F/O	BD	3	2	▲	▲	-	▲	15,8	1,55
40	V617-06	6	ER	PD	1	3	-	-	-	▲	0,2	2,22

<sup>A</sup> BL: base da língua; F/O: faringe/orofaringe; EP: epiglote; ECR: esôfago cranial; EME: esôfago médio; ECA: esôfago caudal; ER: entrada de rúmen; RU: rúmen. <sup>B</sup> BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado. <sup>C</sup> IILP: intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral. <sup>D</sup> 1: leve; 2: moderado; 3 acentuado. <sup>E</sup> ▲: presença; -: ausência. <sup>F</sup> eos/cga: eosinófilos por campo de maior aumento (400X).

#### 4.2 Localização anatômica do CCE no TAS

Os CCEs foram distribuídos em regiões de acordo com a localização anatômica, que estão ilustradas no Esquema 8. Dos 40 CCEs, 42,5% (17/40) localizavam-se na região cranial (Figuras 3 e 4), 12,5% (5/40) na região média (Figura 5) e 45,0% (18/40) na região caudal do TAS (Figura 6).



Esquema 8 – Figura esquemática de bovino com as regiões do TAS e a distribuição percentual dos 40 CCEs de acordo com sua localização.

#### 4.3 Grau de diferenciação celular dos CCEs

Os CCEs foram caracterizados como uma proliferação de células epiteliais neoplásicas com diferentes graus de diferenciação e arranjados em diversos padrões morfológicos, como

ilhas, fitas ou agregados celulares e com variada quantidade de estroma tumoral. Nas seções analisadas, os grupos celulares originavam-se do epitélio superficial (Figuras 7 e 8), que muitas vezes estava ulcerado. Em dois casos (Bovino 5 e 10), grupos de células neoplásicas se originavam da parede dos ductos das glândulas salivares (Figura 9). Este aspecto também foi evidenciado através da imunoistoquímica para citoqueratina (Figura 10). Em todos os casos, os CCEs eram invasivos e se projetavam para as camadas mais internas dos tecidos, proliferando por entre ácinos e ductos glandulares (Figura 11) e fibras musculares (Figura 12). Frequentemente foi observada intensa reação granulomatosa com células gigantes tipo corpo estranho em resposta à presença de queratina livre no estroma (Figura 13). Nesses casos, a mineralização da queratina era freqüente (Figura 14).

Nos CCEs bem diferenciados (CCEs-BD), as células neoplásicas eram arranjadas em pequenas ou grandes ilhas queratinizadas com freqüente formação de extensos arranjos circunferenciais lamelares de queratina (pérolas de queratina). As ilhas eram formadas por números variados de camadas celulares delineadas externamente por uma camada de células com morfologia semelhante a das células basais do epitélio superficial que reveste o TAS (Figura 15). Em alguns CCEs-BD, apenas poucas camadas de células podiam ser observadas circundando extensas pérolas de queratina (Bovino 23 e 37). As células neoplásicas dos CCEs-BD eram cuboidais a poliédricas, com citoplasma abundante, fortemente eosinofílico, uniforme a fibrilar e com bordos moderadamente distintos (Figura 16). O núcleo era frequentemente redondo, com leve variação de forma e tamanho, central e com cromatina uniforme. Muitas vezes, o núcleo era vesiculoso e com cromatina periférica. O nucléolo era único, grande, central e conspícuo, com 0-1 figura de mitose atípica por campo de grande aumento (cga, 400X). As ilhas neoplásicas frequentemente infiltravam estruturas adjacentes (fibras musculares e ácinos glandulares) e eram circundadas por variado grau de reação desmoplásica e inflamatória. Em alguns CCEs-BD, reação granulomatosa com células gigantes estavam presentes no interior das ilhas queratinizadas íntegras. Os CCEs-BD perfizeram 67,5% (27/40) dos casos estudados (Gráfico 2).

Nos CCEs moderadamente diferenciados (CCEs-MD), as células neoplásicas eram arranjadas em ilhas, fitas e agregados celulares que, ao contrário dos CCEs-BD, eram menos queratinizados (Figuras 17 e 18). Frequentemente, o interior das ilhas era composto por numerosas camadas de células necróticas com queratinização individual, geralmente sem a formação de pérolas de queratina. As células dos CCEs-MD eram poliédricas, com citoplasma abundante, moderadamente eosinofílico, muitas vezes vacuolizado e com limites moderadamente distintos. O núcleo era central, grande e com cromatina frouxamente

arranjada. Em alguns CCEs-MD, o núcleo era claro e com a cromatina arranjada perifericamente, com grande variação de forma e tamanho. O nucléolo, quando estava presente, era conspícuo, pequeno e excêntrico. Havia 0-2 figuras de mitose atípicas por cga.

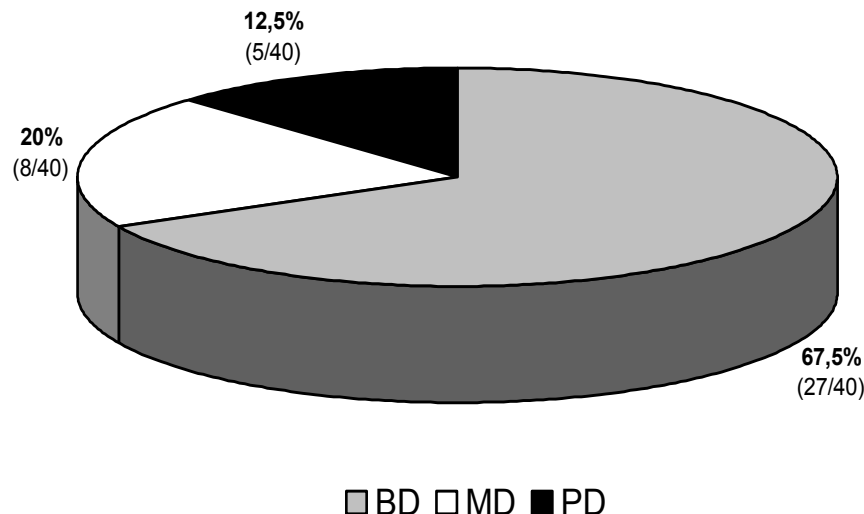


Gráfico 2 – Gráfico da percentagem dos CCEs com relação ao seu grau de diferenciação. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado.

Os arranjos celulares infiltravam-se por entre as fibras musculares das camadas subjacentes. A desmoplasia e o infiltrado inflamatório eram variáveis e a presença de reação granulomatosa tipo corpo estranho (reação à queratina livre) não foi observada. Os CCEs-MD perfizeram 20% (8/40) dos casos estudados.

A presença de pequenos agregados celulares e células individuais em meio à intensa reação desmoplásica foram as características marcantes dos CCEs pouco diferenciados (CCEs-PD) (Figura 19). Em todos os casos, células individuais e grupos de duas a quatro células neoplásicas foram observados circundados por intensa proliferação de fibroblastos. As células neoplásicas eram pouco diferenciadas, com grande variação de tamanho e forma (pleomorfismo acentuado). O citoplasma tinha formato poliédrico, oval ou fusiforme, abundante ou escasso, eosinofílico e com limites moderadamente distintos. O núcleo era redondo a oval, central ou excêntrico, com acentuada anisocariose e cromatina frouxamente ou densamente arranjada (Figura 20). As células tinham nucléolo inconspícuo ou frequentemente fragmentado em pequenos agregados fortemente basofílicos, com 1-3 figuras

de mitose atípicas por cga. A presença de pérolas de queratina ou de queratinização individual ficava restrita apenas a pequenas áreas mais diferenciadas adjacentes. Os CCEs-PD perfizeram 5/40 (12,5%) dos casos analisados.

Quando o grau de diferenciação dos CCEs foi comparado com a localização do CCE no TAS, foi observado que, dos 17 CCEs da região cranial, 15 eram BD e 2 eram MD. Nenhum PD foi observado neste mesmo local. Os CCEs-BD também foram observados em 3/5 e 9/18 dos CCEs localizados nas regiões média e caudal, respectivamente. Os CCEs-MD e PD representaram apenas um caso cada um nos cinco CCEs localizados na região média. Na região caudal, os CCEs-MD e PD foram observados em 5/18 e 4/18 casos, respectivamente. As percentagens de cada grau de diferenciação distribuídas nas três regiões do TAS estão apresentadas no Gráfico 3.

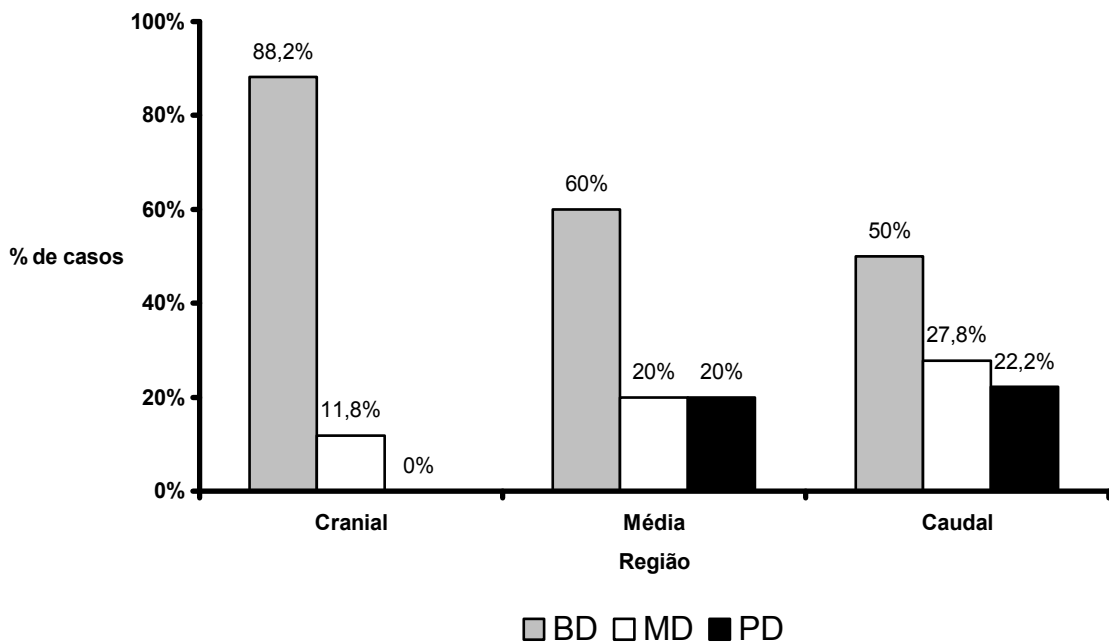


Gráfico 3 – Gráfico da porcentagem do número de casos em que os diferentes graus de diferenciação estiveram presentes nas três regiões do TAS. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado.

#### 4.4 Intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico

O infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (IILP) peritumoral foi observado em meio ao estroma tumoral (Figura 21) e circundando os agrupamentos de queratinócitos neoplásicos (Figura 22). A relação entre a intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico e o grau de diferenciação celular está apresentada na Tabela 4. Nos CCEs deste estudo, observou-se que quanto mais bem diferenciado o CCE, mais acentuada era a IILP peritumoral.

Tabela 4 – Relação entre a intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocítico peritumoral e o grau de diferenciação dos CCEs no TAS.

Intensidade do IILP*	Grau de diferenciação**					
	BD		MD		PD	
	n	%	n	%	n	%
<b>Leve</b>	7	25,9	3	37,5	3	60,0
<b>Moderada</b>	5	18,5	1	12,5	1	20,0
<b>Acentuada</b>	15	55,6	4	50,0	1	20,0
<b>Total</b>	27	100,0	8	100,0	5	100,00

\* IILP: infiltrado inflamatório linfoplasmocítico; \*\* BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado; n: número de casos; %: porcentagem dos casos em relação ao total de cada grau de diferenciação.

#### 4.5 Ocorrência de necrose intra-tumoral e de queratina livre

A necrose intra-tumoral ocorreu em 29 CCEs e estava associada à presença de queratina livre no estroma em 72,41% (21/29) dos casos (Tabela 3). Destes, a queratina livre estava presente em 66,67% (18/27) dos CCEs-BD e em 37,5% (3/8) dos CCEs-MD. Entretanto, infiltrado inflamatório granulomatoso pela presença da queratina livre esteve presente em apenas 61,9% (13/21) dos casos. Em cinco casos, a reação granulomatosa não estava associada à presença de queratina livre no estroma. Nesses, as células epitelióides e gigantes estavam presentes apenas no interior das ilhas queratinizadas (Bovinos 1, 4, 9, 10 e 16), ou associada à presença de fibras vegetais (Bovino 17). Não havia queratina livre no estroma dos CCEs-PD analisados. Mineralização da queratina foi observada em cinco casos.



Interessantemente, todos apresentavam extensas áreas queratinizadas com acentuado infiltrado inflamatório neutrofilico ao redor e no interior das lamelas de queratina.

#### **4.6 Padrões morfológicos de migração e invasão**

Os queratinócitos neoplásicos, em meio ao estroma de tecido conjuntivo, foram melhor visualizados através da técnica de imunistoquímica para citoqueratina. Nas secções analisadas, foram identificados os padrões morfológicos de ilhas, fitas, agregados, cordões e células individuais, de formato redondo (amebóide) e alongado (fusiforme) (Figura 23). Em todos os casos, mais de um padrão estava presente. Após a determinação dos padrões de migração e invasão predominantes, os resultados foram relacionados com o grau de diferenciação celular e apresentados na Tabela 5.

Nos CCEs-BD, a presença de ilhas queratinizadas foi o padrão predominante, perfazendo 34,11% dos padrões morfológicos encontrados (Figuras 24 e 25). Em alguns casos, as células presentes nas ilhas de queratinócitos possuíam diferentes padrões a imunomarcção para citoqueratina (Figuras 26 e 27). Cordões (Figura 28) e agregados celulares (Figura 29) foram os padrões mais freqüentemente encontrados nos CCEs-MD. Em contrapartida, as ilhas nos CCEs-MD e PD foram observadas em 19,72% e 12,07% dos casos, respectivamente. Porém, essas ilhas eram pouco ou não-queratinizadas.

Nos CCEs-PD, os agregados celulares também foram os mais frequentemente observados (Figura 30). No entanto, células individuais foram observadas em quase 20% dos casos (compreendendo CIR e CIF) (Figura 31). A identificação e a quantificação de células individuais de formato redondo (amebóide) ou alongado (fusiforme) só foi possível através da imunomarcção pela citoqueratina. Nos CCEs-BD e MD, a presença das mesmas foi observada em aproximadamente 15% dos casos.

Tabela 5 – Padrões morfológicos de migração e invasão, distribuídos quanto à presença e intensidade dentro dos graus de diferenciação dos CCEs.

GD*	Bovino	Padrões morfológicos**						Total	Invasão vascular***	Tipo de invasão vascular
		IL	FI	AG	CO	CIR	CIF			
CCE-BD	2	2	1	1	1	1	1	-	-	
	3	2	2	1	1	1	1	-	-	
	4	3	0	1	0	0	0	-	-	
	6	2	2	1	1	1	0	▲	linfática	
	8	3	1	2	1	1	0	-	-	
	10	3	1	1	1	1	0	▲	linfática	
	12	2	2	1	1	1	0	-	-	
	13	3	2	2	2	1	1	▲	linfática	
	15	3	1	1	0	0	0	-	-	
	16	3	2	1	1	1	0	-	-	
	17	3	1	1	0	1	0	-	-	
	19	3	2	2	2	1	1	-	-	
	20	3	2	1	1	1	1	-	-	
	21	3	1	1	1	1	1	-	-	
	23	3	2	1	1	1	0	-	-	
	24	2	1	1	0	0	0	-	-	
	25	3	1	2	1	1	1	▲	linfática	
	26	3	2	2	2	2	2	-	-	
	30	3	2	2	1	1	0	-	-	
	32	2	2	2	2	0	0	-	-	
33	2	2	2	2	1	0	-	-		
34	3	1	2	2	1	0	-	-		
35	3	1	1	1	1	0	-	-		
36	3	1	1	2	0	0	-	-		
37	3	1	1	0	0	0	-	-		
38	2	2	2	2	2	2	-	-		
39	3	1	2	1	1	0	-	-		
	<b>Soma</b>	73	39	38	30	23	11	214		
	%	34,11	18,22	17,76	14,02	10,75	5,14	100,0		
CCE-MD	5	2	2	3	2	1	0	▲	linfática	
	9	2	1	1	1	1	0	▲	linfática	
	11	1	3	2	3	1	1	▲	linfática	
	14	1	3	3	3	1	0	-	-	
	18	2	2	3	2	2	1	-	-	
	22	2	2	2	3	1	0	-	-	
	27	2	1	2	0	0	0	-	-	
	31	2	1	1	1	1	0	-	-	
	<b>Soma</b>	14	15	17	15	8	2	71		
	%	19,72	21,13	23,94	21,13	11,27	2,82	100,0		
CCE-PD	1	2	2	3	3	1	1	▲	venosa/linfática	
	7	1	2	3	1	3	0	▲	venosa/linfática	
	28	1	2	3	3	1	1	▲	venosa/linfática	
	29	1	2	3	2	3	3	-	-	
	40	2	2	2	1	3	1	▲	venosa/linfática	
	<b>Soma</b>	7	10	14	10	11	6	58		
	%	12,07	17,24	24,14	17,24	18,97	10,34	100,0		

\* GD: grau de diferenciação celular; CCE-BD: carcinoma de células escamosas bem diferenciado; CCE-MD: moderadamente diferenciado; CCE-PD: pouco diferenciado. \*\* IL: ilhas; FI: fitas; AG: agregados; CO: cordões; CIR: células individuais redondas; CIF: células individuais fusiformes; (0): ausente; (1): leve; (2): moderada; (3): acentuada. \*\*\* ▲: presença; -:ausência.

#### 4.7 Intensidade da reação desmoplásica peritumoral

Através do uso da técnica de imunohistoquímica para vimentina, os fibroblastos presentes na reação desmoplásica peritumoral foram fortemente marcados, contrastando com a imunomarcagem positiva para citoqueratina nos queratinócitos neoplásicos (Figuras 32 e 33). A imunohistoquímica para vimentina demonstrou que todos os casos apresentavam certo grau de reação desmoplásica (Figura 34). A desmoplasia foi classificada quanto à intensidade e foi acentuada em 48,1% (13/27) e 62,5% (5/8) dos CCEs-BD e MD, respectivamente. Nos CCEs-PD, a desmoplasia foi acentuada em todos os casos (Gráfico 4).

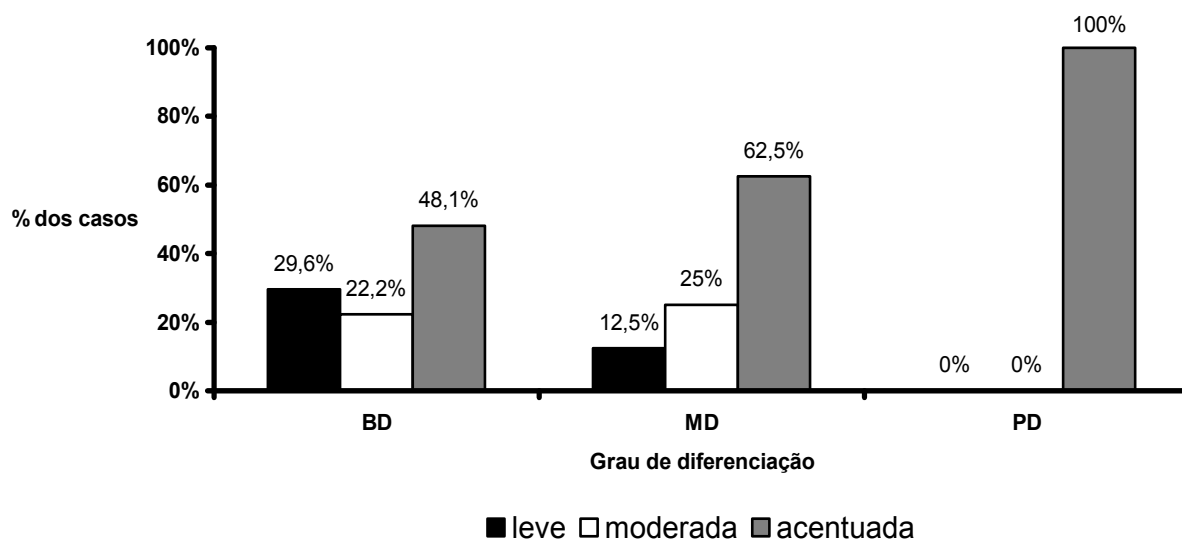


Gráfico 4 – Gráfico da percentagem das intensidades da reação desmoplásica nos diferentes graus de diferenciação dos CCEs do TAS. BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado.

#### 4.8 Ocorrência de invasão vascular linfática ou sangüínea

A invasão vascular com embolização neoplásica foi observada em 11 seções dos CCEs analisados (Figuras 35 e 36). Ela foi melhor visualizada com o auxílio da técnica de imunohistoquímica para citoqueratina (Figura 37), em contraste com a vimentina (Figura 38).