

Figura 8. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Timpanismo acentuado. A. Bovino 14. B. Bovino 19.

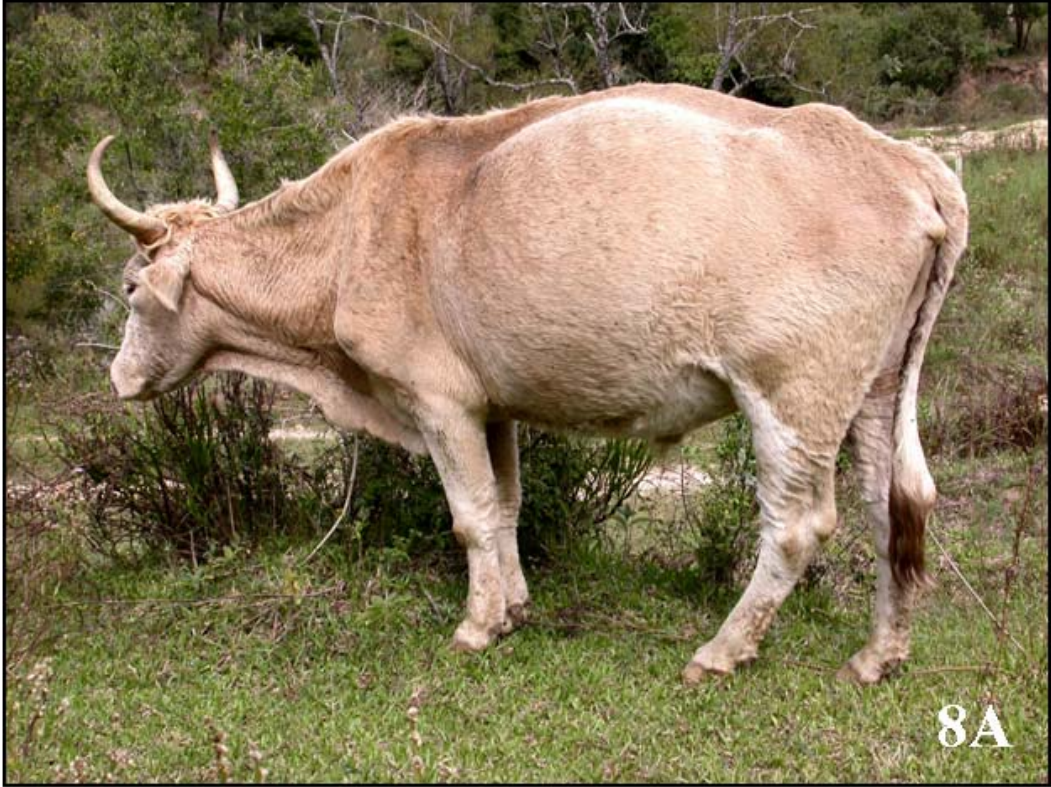


Figura 9. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Salivação intensa. A. Bovino 10. B. Bovino 3.



Figura 10. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 11. Papilomas multifocais nos palatos mole e duro. B. Bovino 2. Múltiplos papilomas jovens no palato mole. C. Bovino 14. Papilomas de tamanhos variados no palato mole, faringe e base da língua.

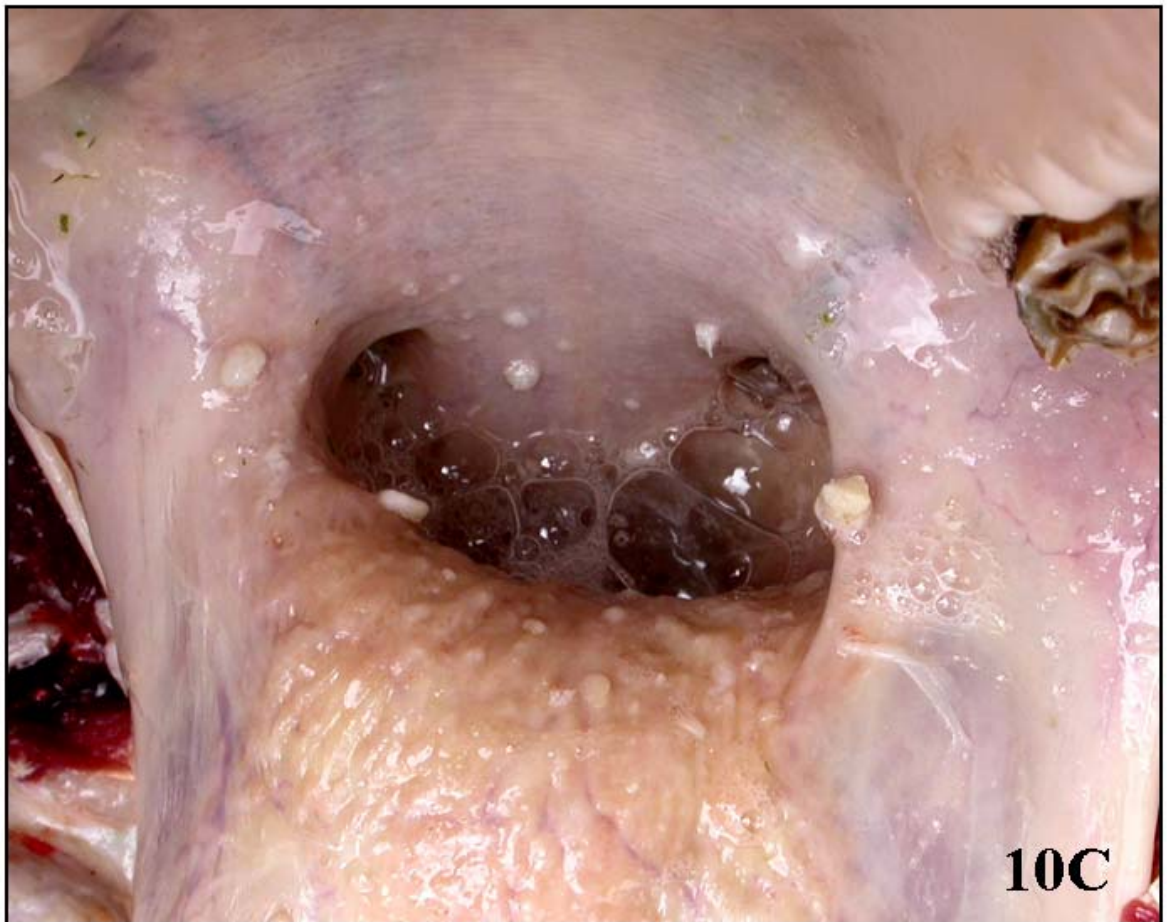
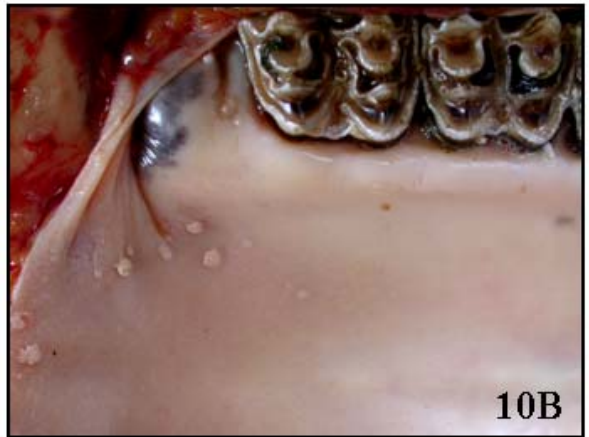


Figura 11. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomas na faringe. A. Bovino 24. Papiloma pedunculado. B. Bovino 26. Papilomas sésseis.





Figura 12. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomas multifocais. A. Bovino 28. Papiloma pedunculado no esôfago cranial. B. Bovino 3. Múltiplos papilomas no esôfago médio. C. Bovino 9. Múltiplos papilomas na entrada do rúmen.



Figura 13. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomatose acentuada na região cranial do trato alimentar superior. A. Bovino 4. B. Bovino 24.

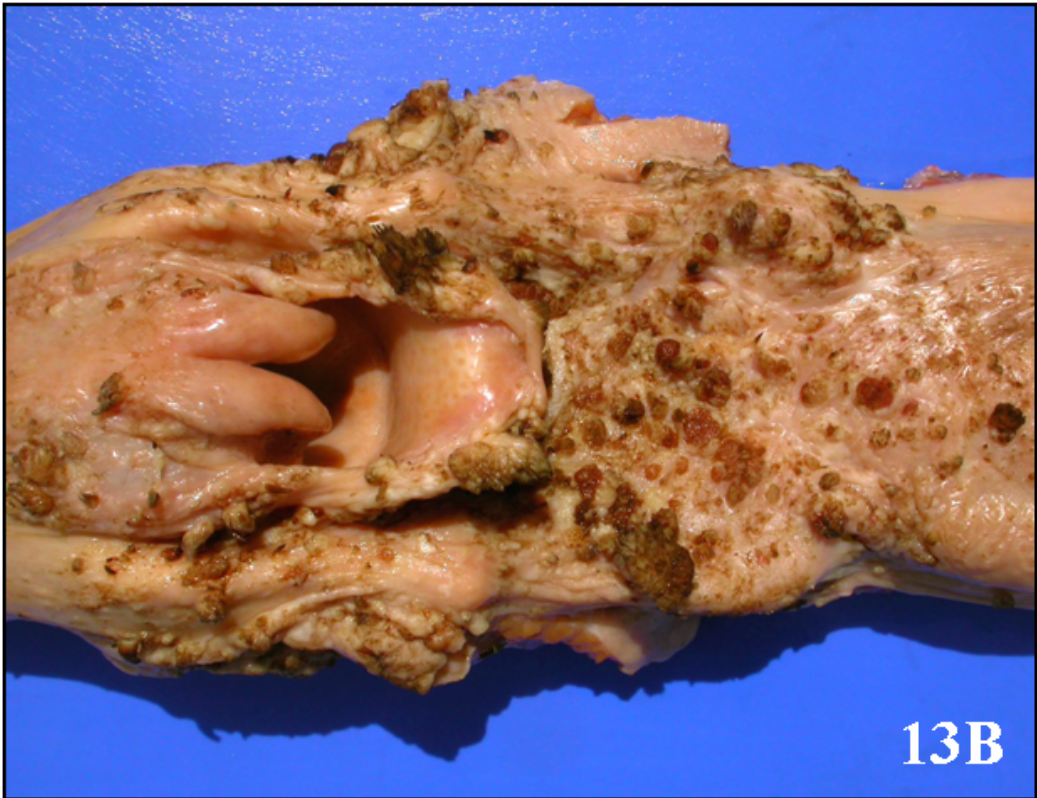
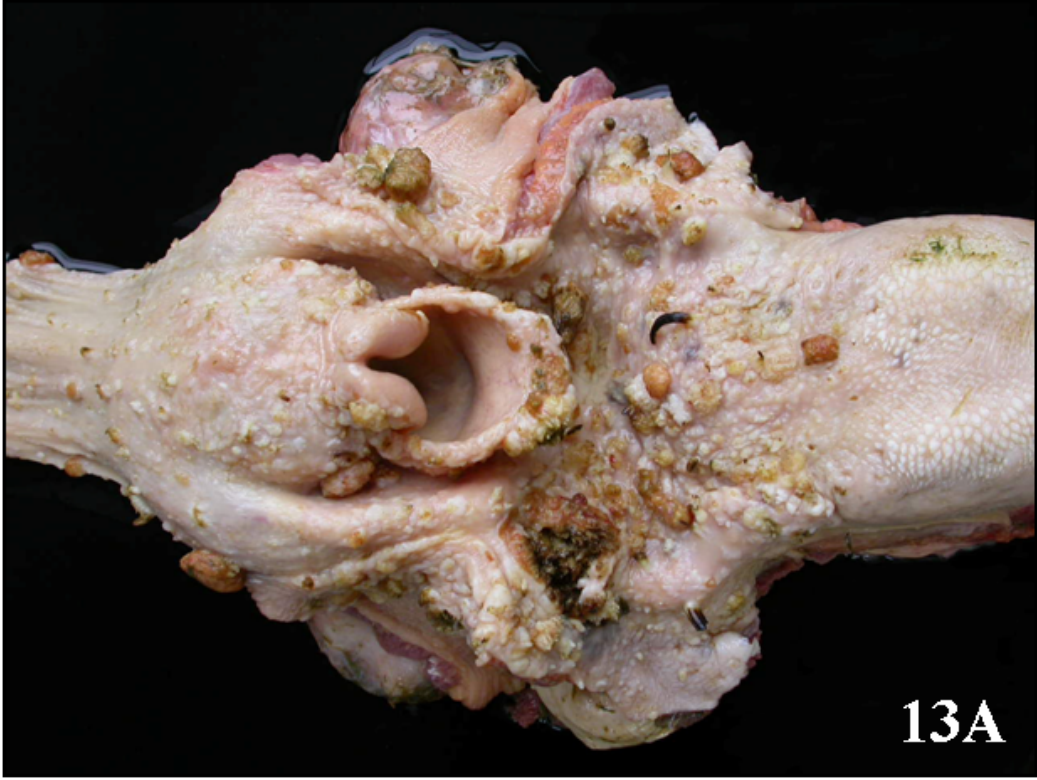


Figura 14. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Aspectos histológicos dos papilomas. A. Bovino 4. Projeções digitiformes características dos papilomas (40x). B. Bovino 2. Epitélio escamoso estratificado hiperplásico com queratinização superficial variável (100x). C. Bovino 2. Observam-se coilócitos caracterizados por núcleos pequenos, hipercromáticos e excêntricos, circundados por um halo claro perinuclear (setas; 400x). D. Bovino 28. Mesmo aspecto observado em C (setas; 400x). H & E.

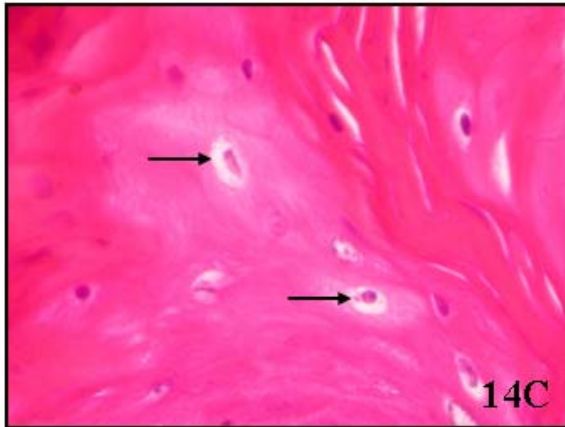
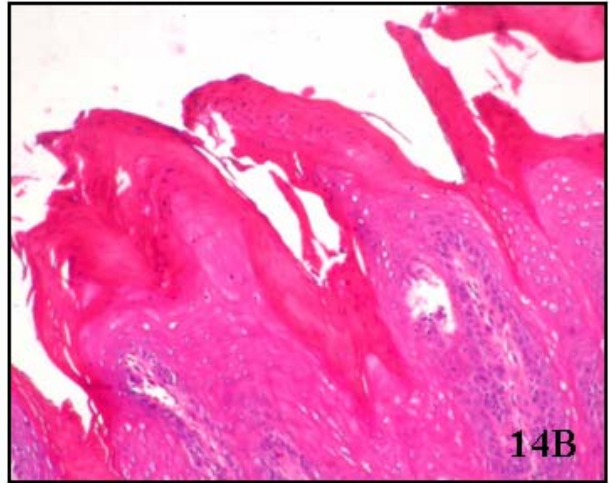
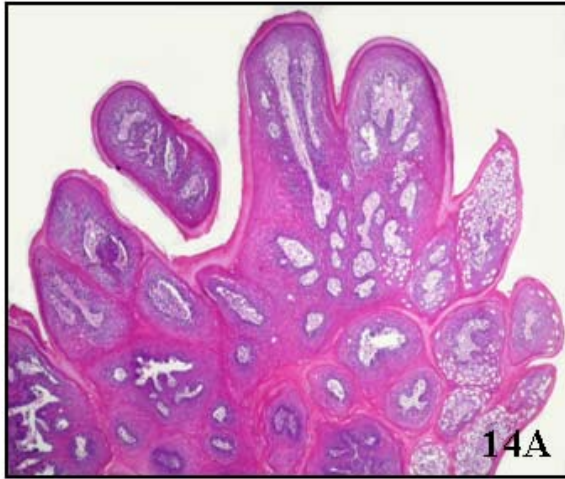


Figura 15. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Fases de desenvolvimento dos papilomas. A. Bovino 26. Papiloma em fase inicial de crescimento (40x). B. Bovino 28. Fase de desenvolvimento de um papiloma pedunculado (submacroscópica). C. Bovino 26. Fase de desenvolvimento de um papiloma séssil (submacroscópica). D. Bovino 26. Papiloma em fase de regressão com discreta atenuação das projeções digitiformes (submacroscópica). E. Observa-se acentuado infiltrado linfocitário na base dos eixos fibrovasculares do papiloma ilustrado em D (200x). H & E.

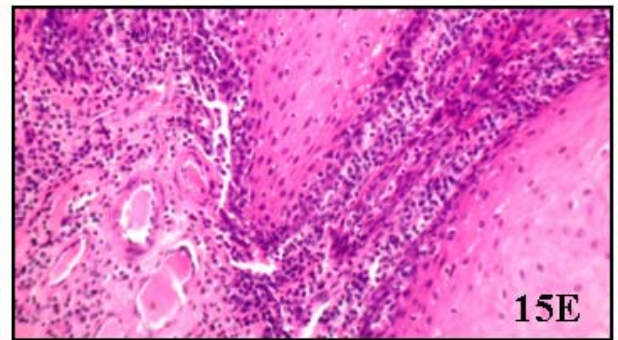
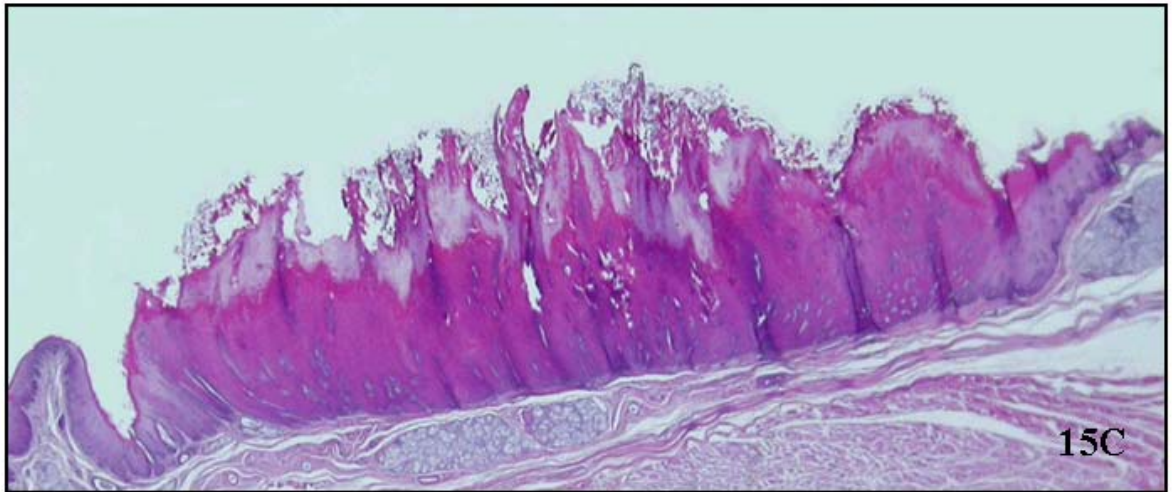
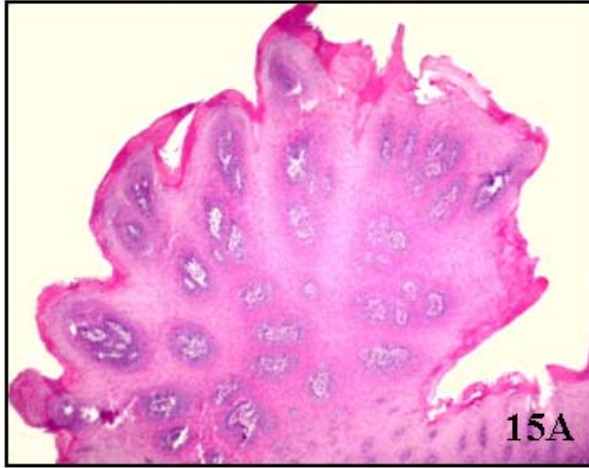




Figura 16. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomas em transformação (PTs) para carcinoma de células escamosas. A. Bovino 4. Esôfago médio. PT com projeções digitiformes arredondadas. B. Bovino 8. PT de contorno irregular no esôfago caudal (seta). C. Bovino 12. PTs ao longo da entrada do rúmen e da goteira esofágica (setas).

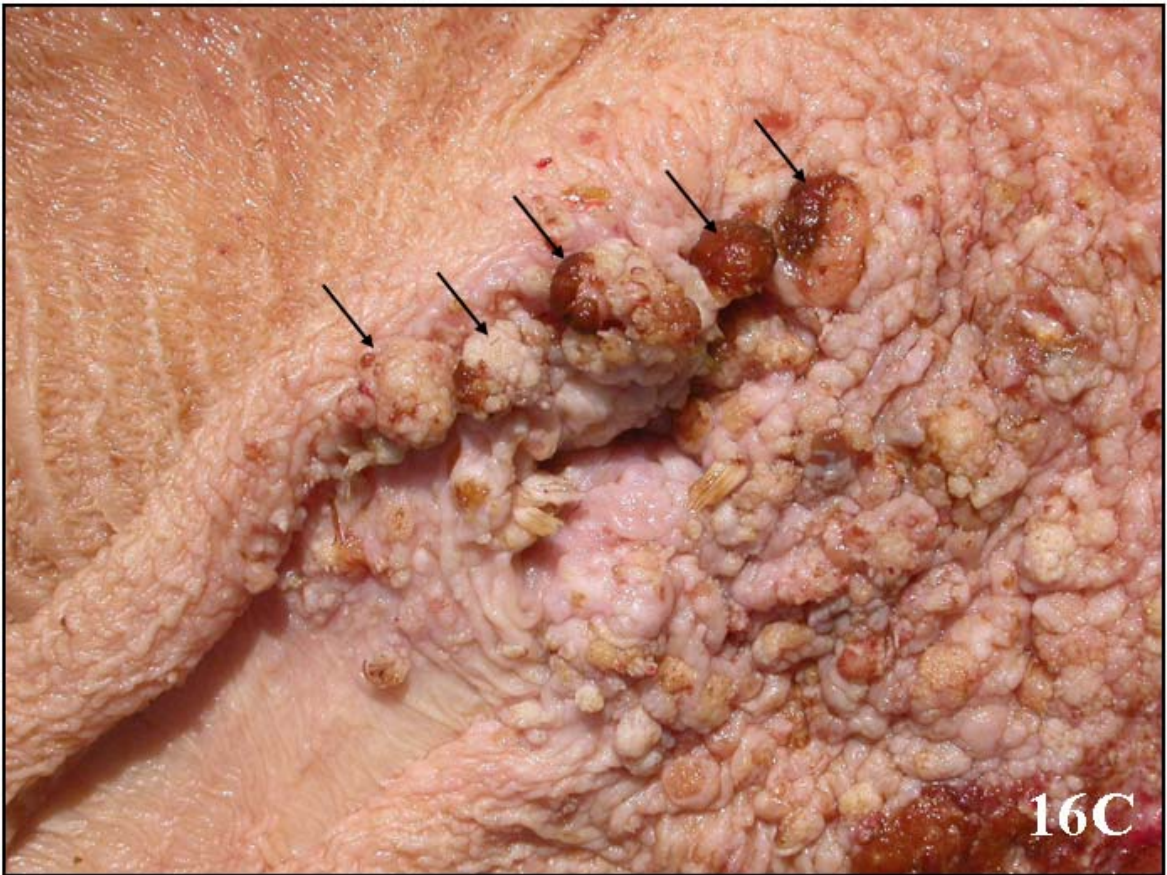
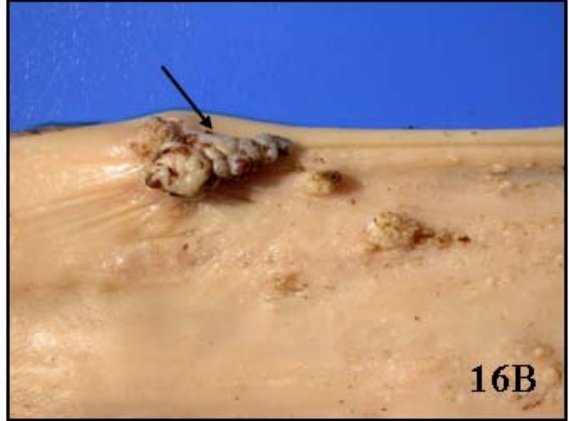


Figura 17. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Aspectos histológicos de papilomas em transformação (PTs) para carcinoma de células escamosas. A. Bovino 4. Ilustração submacroscópica de um papiloma em transformação (PT) e de um papiloma (PAP) na base da língua. B. Bovino 4. Detalhe da base do PT ilustrado em A. Observam-se ilhas de queratinócitos neoplásicos (setas; 40x). C. Bovino 4. Magnificação das ilhas de queratinócitos neoplásicos malignos ilustradas em B (100x). D. Bovino 4. Detalhe da extremidade lateral esquerda do PT ilustrado em A (40x). E. Bovino 23. Entrada do rúmen. PT com ilhas de queratinócitos neoplásicos malignos (\*) na base das projeções digitiformes (\*\*) remanescentes (40x). H & E .

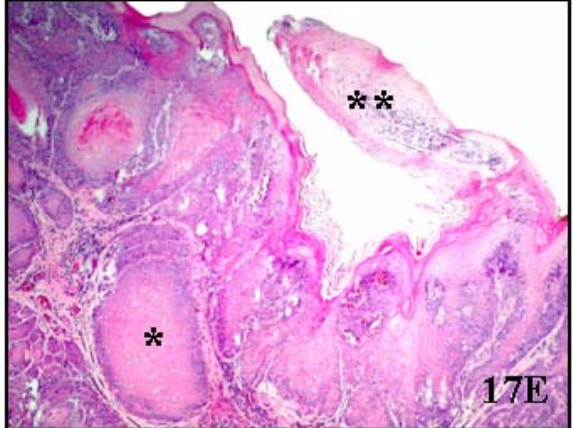
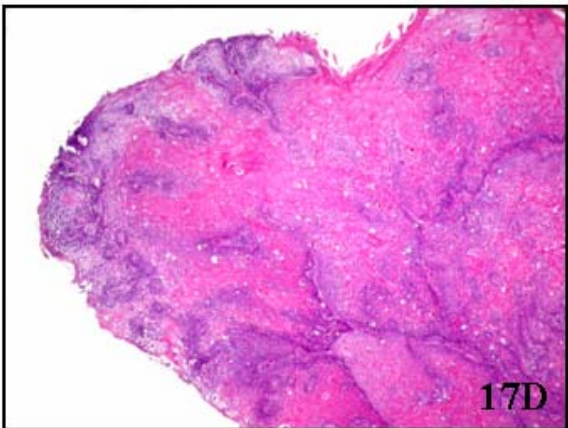
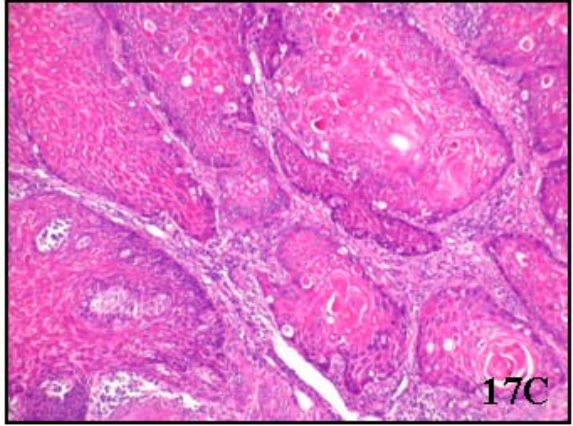
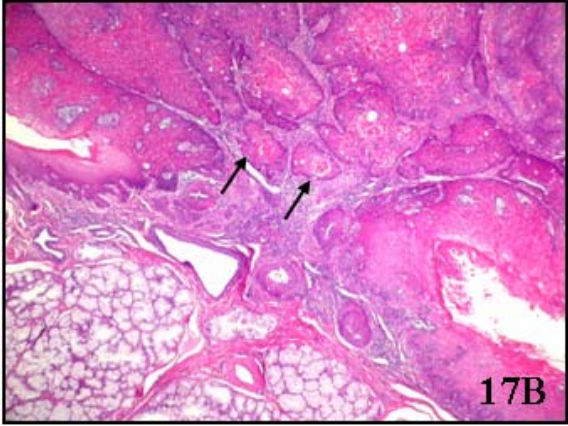
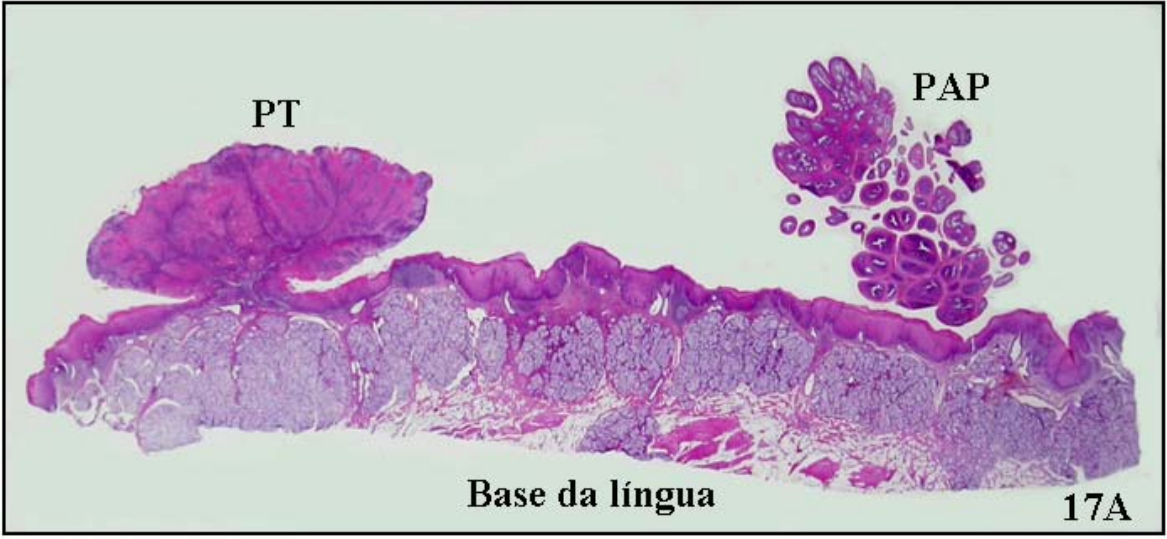


Figura 18. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Encaminhamento dirigido de lesões macroscopicamente compatíveis ou suspeitas de serem carcinomas de células escamosas (CCEs). Bovino 4. a. Papiloma em transformação para CCE. b-d. CCEs bem diferenciado. e-f. Há áreas de hiperplasia epitelial focalmente extensas.

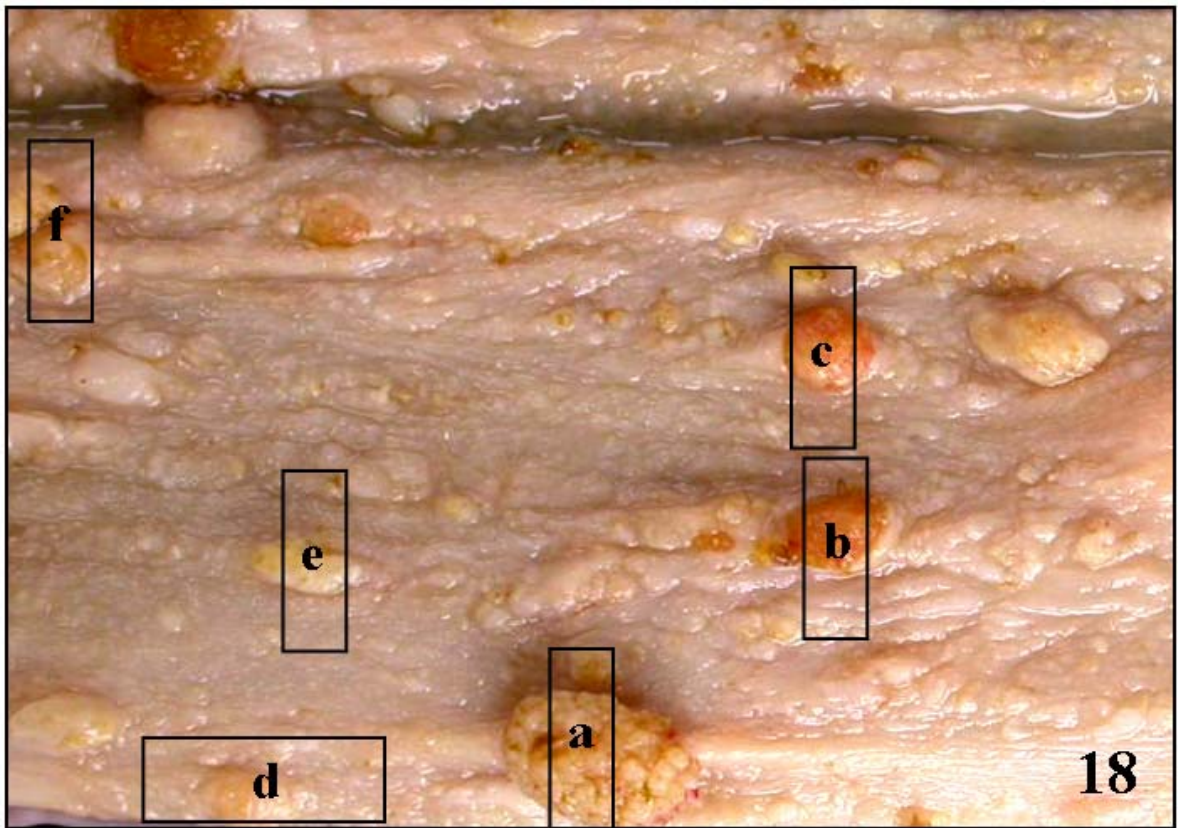


Figura 19. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior. A. Bovino 21. CCE endofítico na base da língua. No detalhe, observam-se áreas amarelas na superfície de corte do CCE. B. Bovino 12. CCE ulcerado na base da língua. C. Bovino 6. CCE exofítico na faringe/orofaringe. D. Bovino 23. CCE ulcerado na faringe. E. Bovino 17. CCE exofítico e pedunculado na base da língua. F. Superfície ventral do CCE pedunculado observado em E.

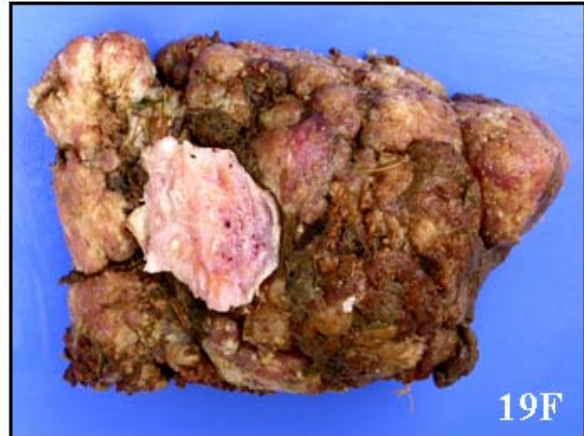
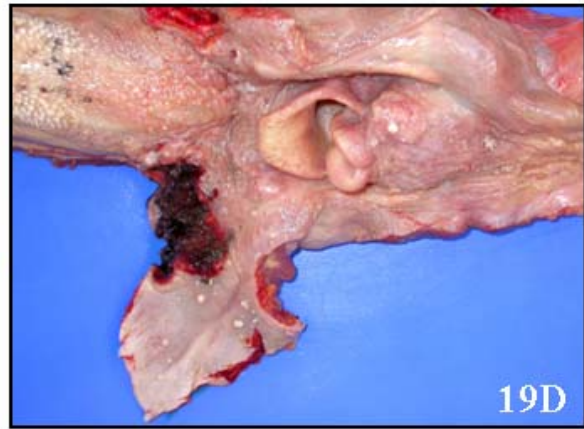
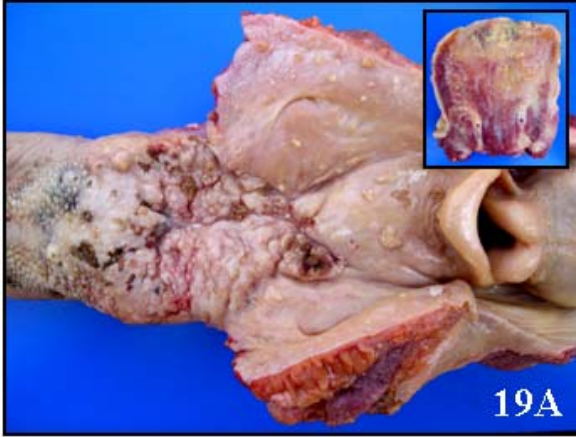




Figura 20. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 17. Carcinoma de células escamosas (CCE) exofítico e pedunculado na base da língua. Observam-se também papilomas cranialmente ao CCE.



Figura 21. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 10. Carcinoma de células escamosas (CCE) ulcerado na epiglote. B. Bovino 8. CCE ulcerado na epiglote e orofaringe.

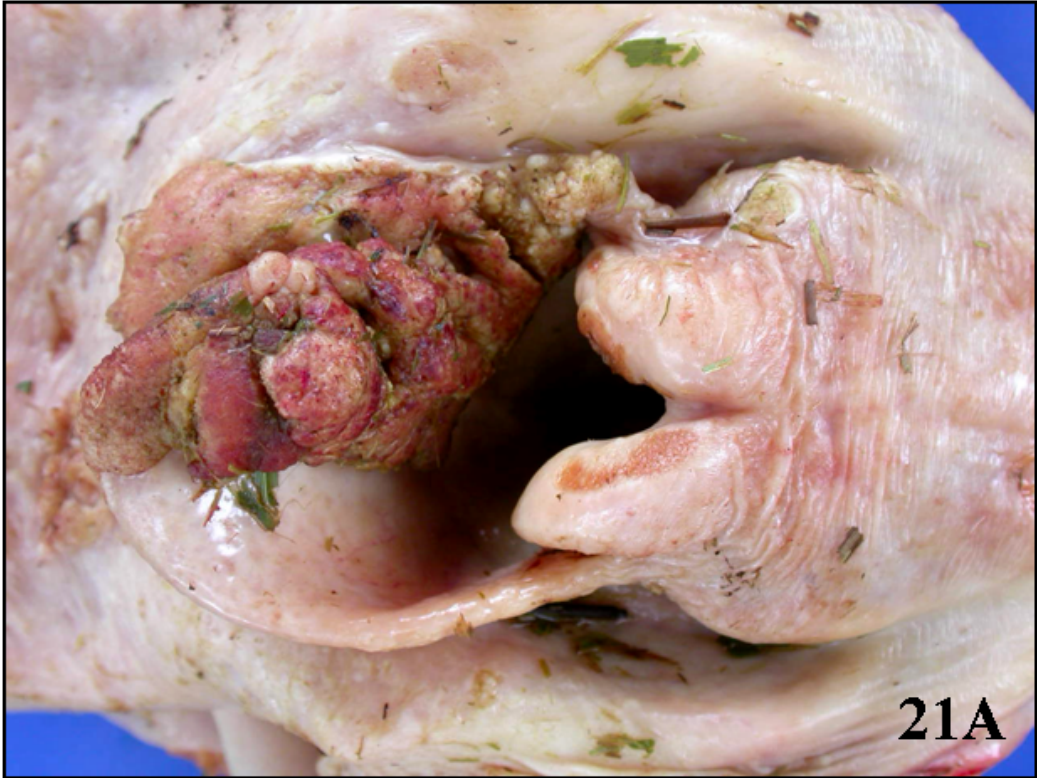


Figura 22. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Espessamentos estenosantes anelares esofágicos que correspondiam microscopicamente a carcinomas de células escamosas. A. Bovino 23. Área rugosa não ulcerada no esôfago cranial. B. Bovino 9. Área rugosa no esôfago cranial. C. Bovino 25. Área rugosa parcialmente ulcerada no esôfago médio.

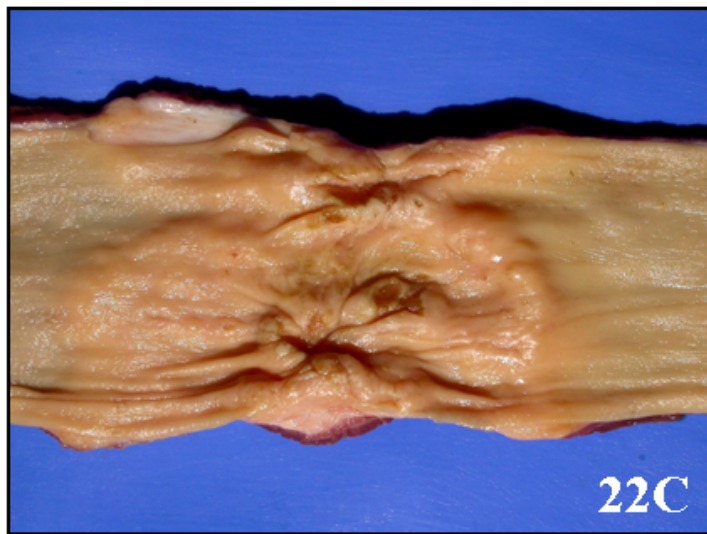


Figura 23. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas (CCEs) no esôfago caudal. A. Bovino 28. CCE ulcerado. B. Bovino 13. Espessamento da parede esofágica por CCE com impactação do conteúdo alimentar.

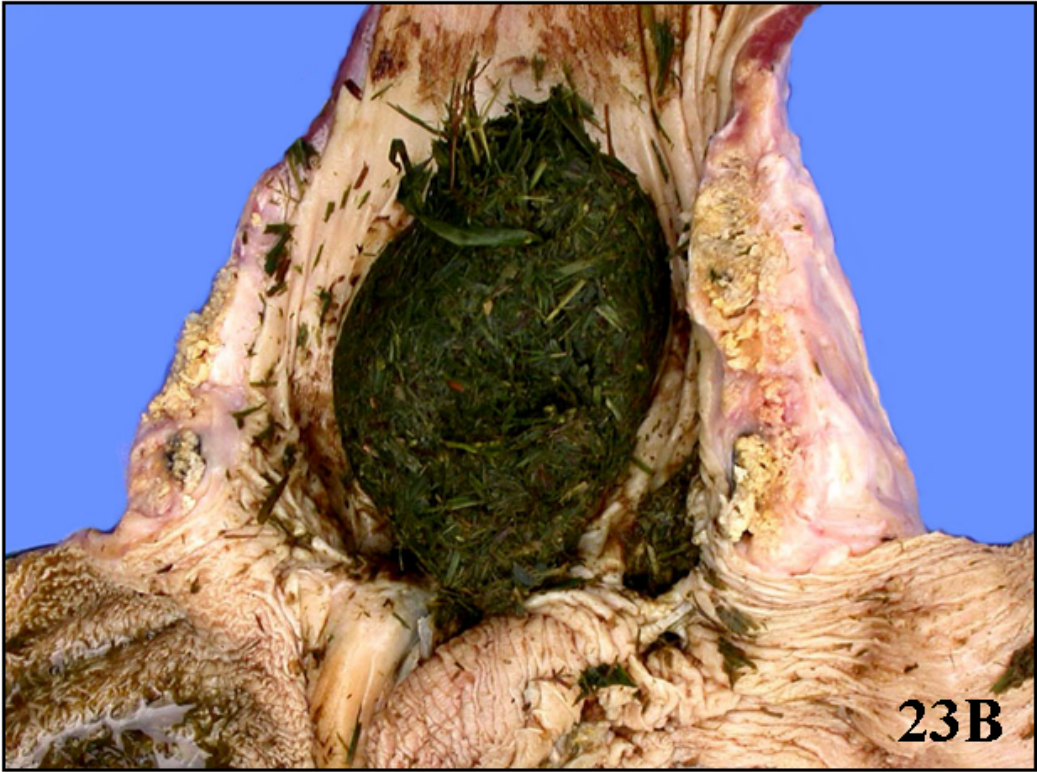
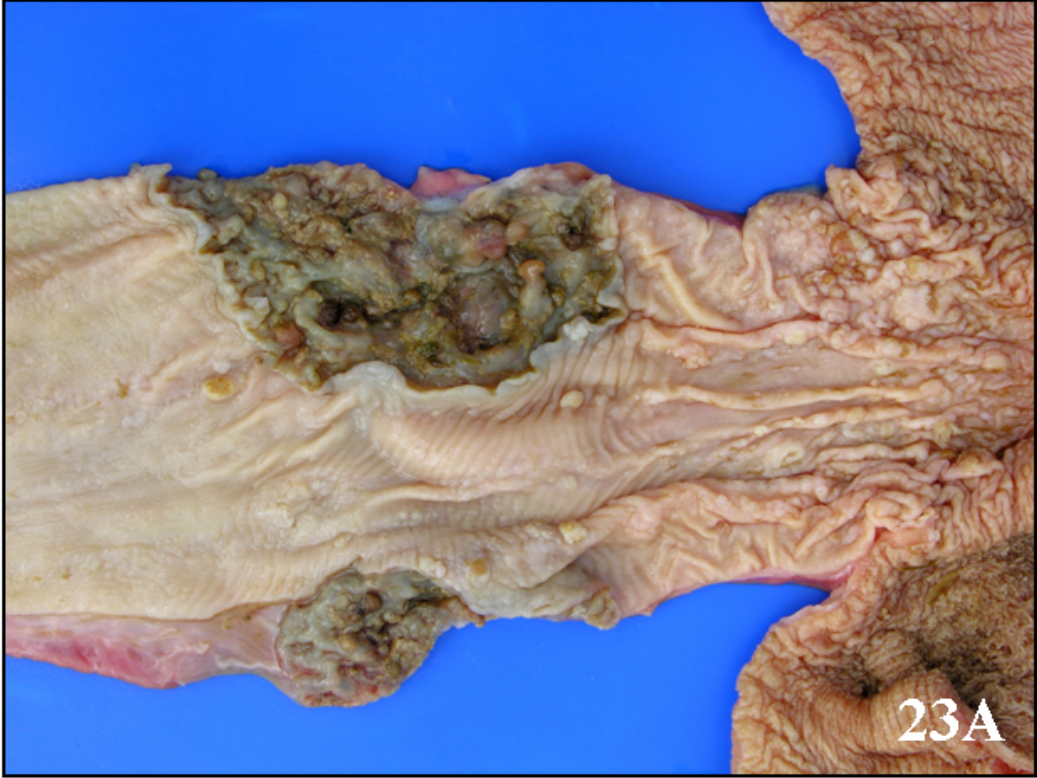




Figura 24. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas ulcerados na entrada do rúmen (ambos causaram timpanismo). A. Bovino 2. B. Bovino 16.

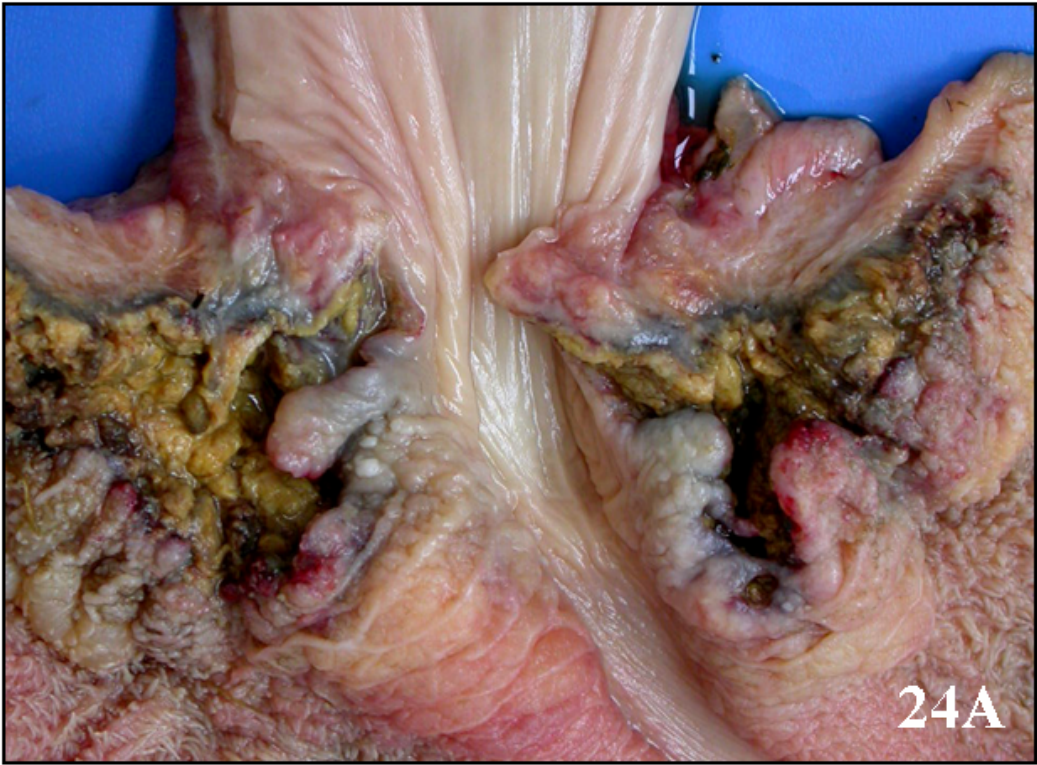


Figura 25. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas (CCEs) no rúmen. A. Bovino 22. Extenso CCE ulcerado na goteira esofágica. B. Bovino. 7. Extenso CCE ulcerado. C. Bovino 18. Há nodulações irregulares numa extensão de até 15-30 cm na mucosa ruminal infiltrando a parede ruminal.



Figura 26. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 12. Papiloma adjacente a um carcinoma de células escamosas (CCEs) na base da língua. B. Bovino 23. Há papilomas (a), papilomas em transformação para CCEs (b) e CCEs (c) na entrada do rúmen.

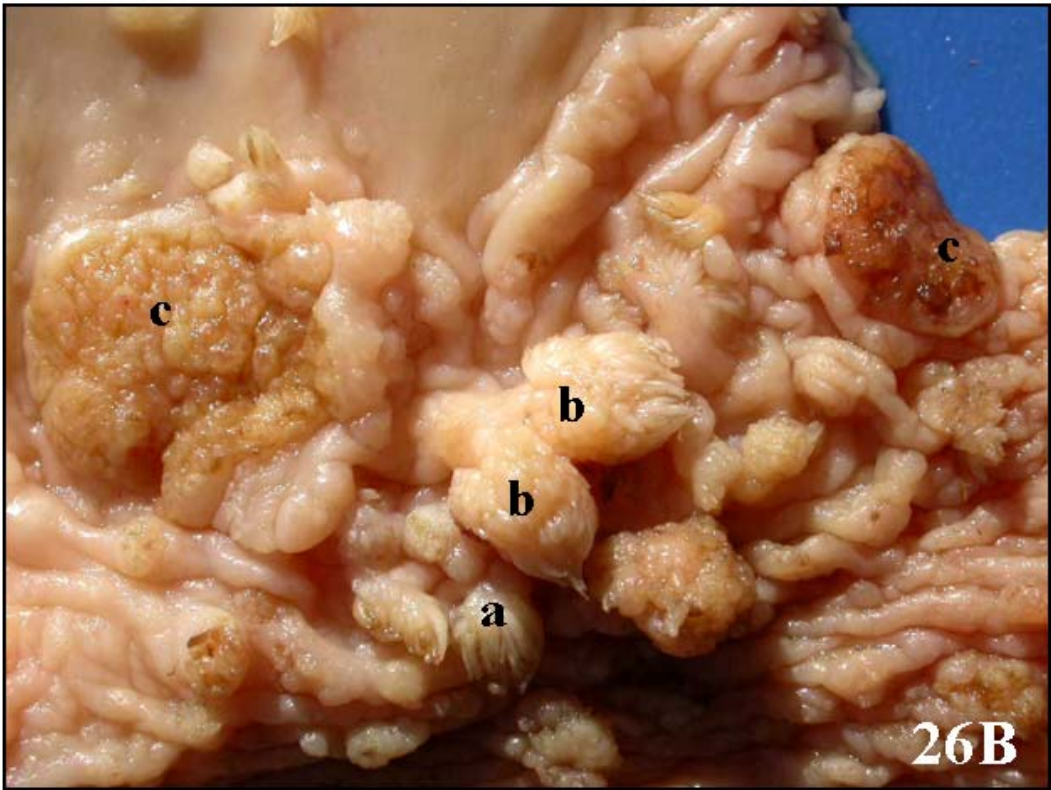


Figura 27. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Aspectos histológicos dos graus de diferenciação celular dos carcinomas de células escamosas (CCE). A. Bovino 15. CCE bem diferenciado. Observam-se ilhas de queratinócitos bem diferenciados com queratinização lamelar concêntrica (pérolas de queratina; 100x). B. Bovino 3. CCE moderadamente diferenciado. Há pequenas ilhas de queratinócitos com moderado pleomorfismo e queratinização discreta (200x). C. Bovino 29. CCE pouco diferenciado. Há ninhos altamente pleomórficos circundados por acentuada desmoplasia (200x). H & E.

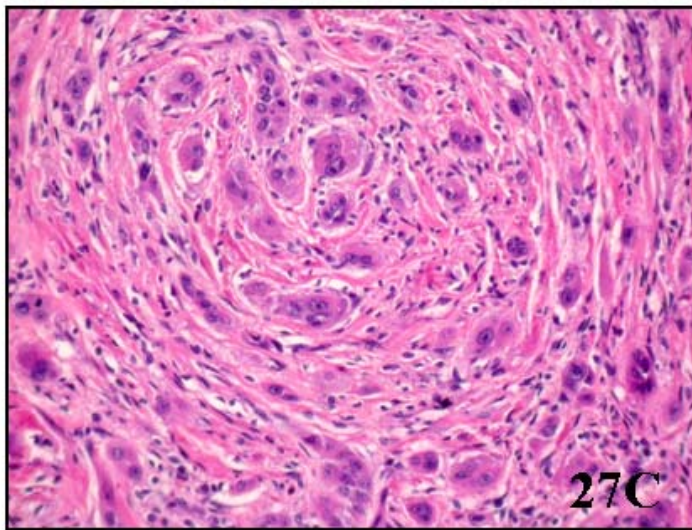
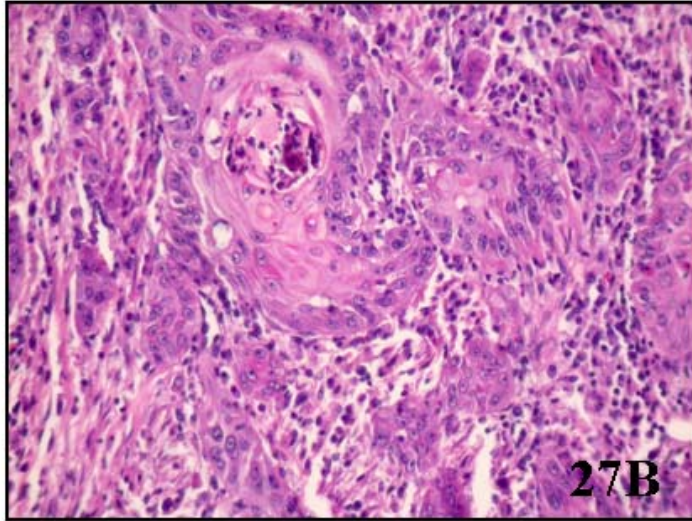
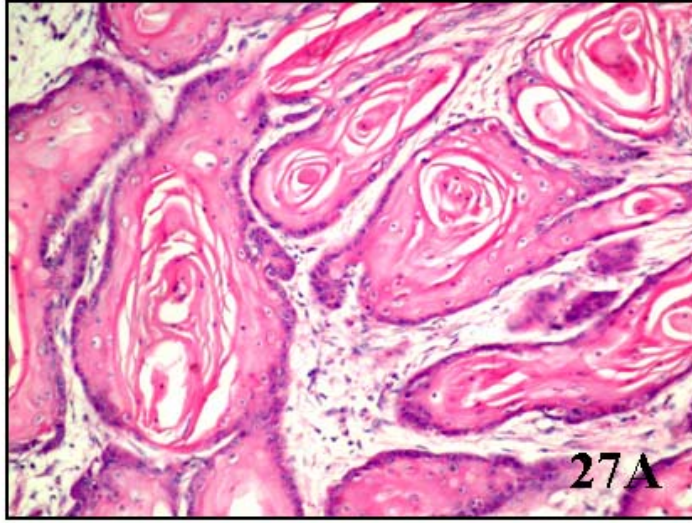




Figura 28. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 4. Carcinoma de células escamosas (CCE) bem diferenciado e invasivo na base da língua (100x). B. Bovino 23. Ilhas de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados circundadas por acentuada desmoplasia invadindo a camada muscular em um espessamento estenosante anelar (CCE) no esôfago cranial (100x). C. Bovino 3. Há acentuada reação desmoplásica circundando ilhas de CCE bem diferenciado em um linfonodo (200x). D. Bovino 11. Infiltrado de eosinófilos no estroma de um CCE bem diferenciado na epiglote (400x). E. Bovino 29. Alterações pré-neoplásicas no epitélio da base da língua (200x). F. Bovino 29. CCE em fase inicial de desenvolvimento no epitélio da base da língua (200x). H & E.

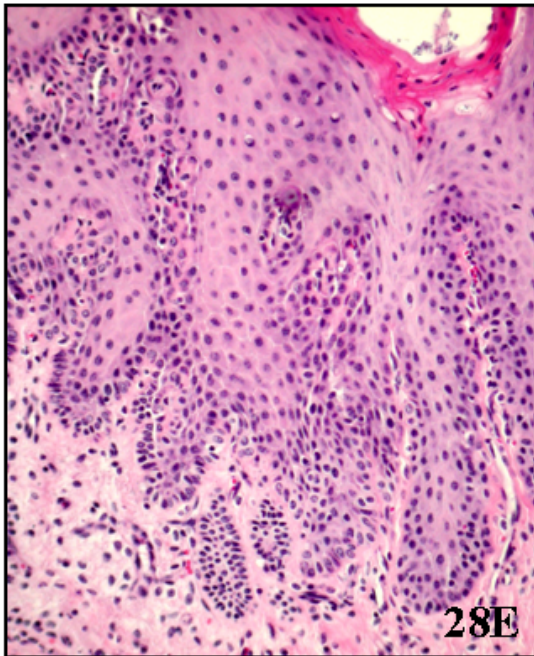
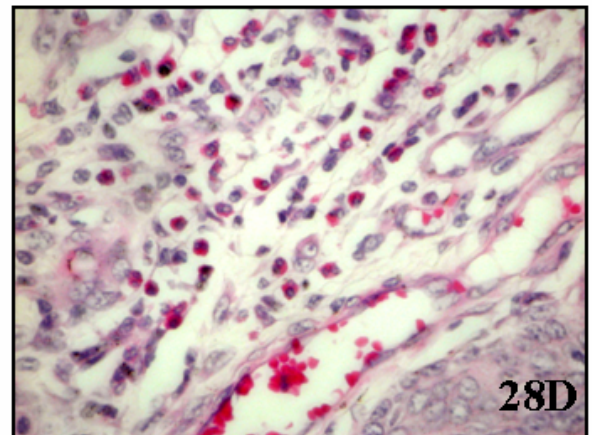
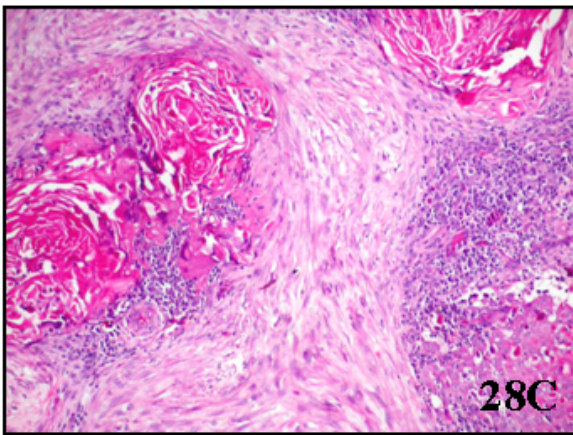
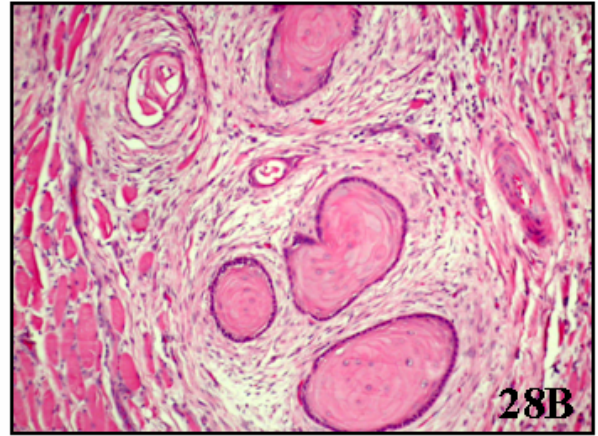
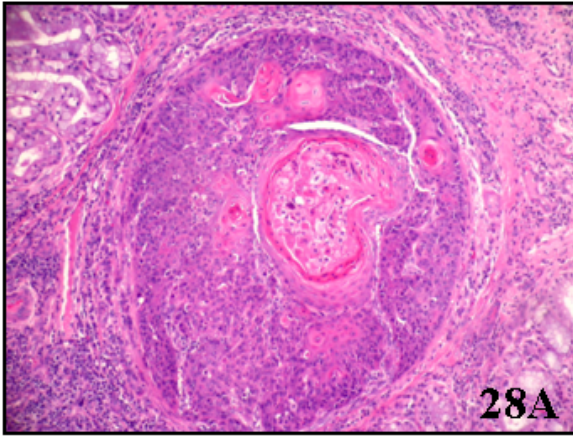


Figura 29. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Metástases de carcinomas de células escamosas nos linfonodos. A. Bovino 1. Linfonodo ruminal mostrando áreas multifocais amarelas correspondendo microscopicamente a intensa queratinização. B. Bovino 28. Linfonodo retroesofágico com áreas de necrose em meio a acentuada queratinização.

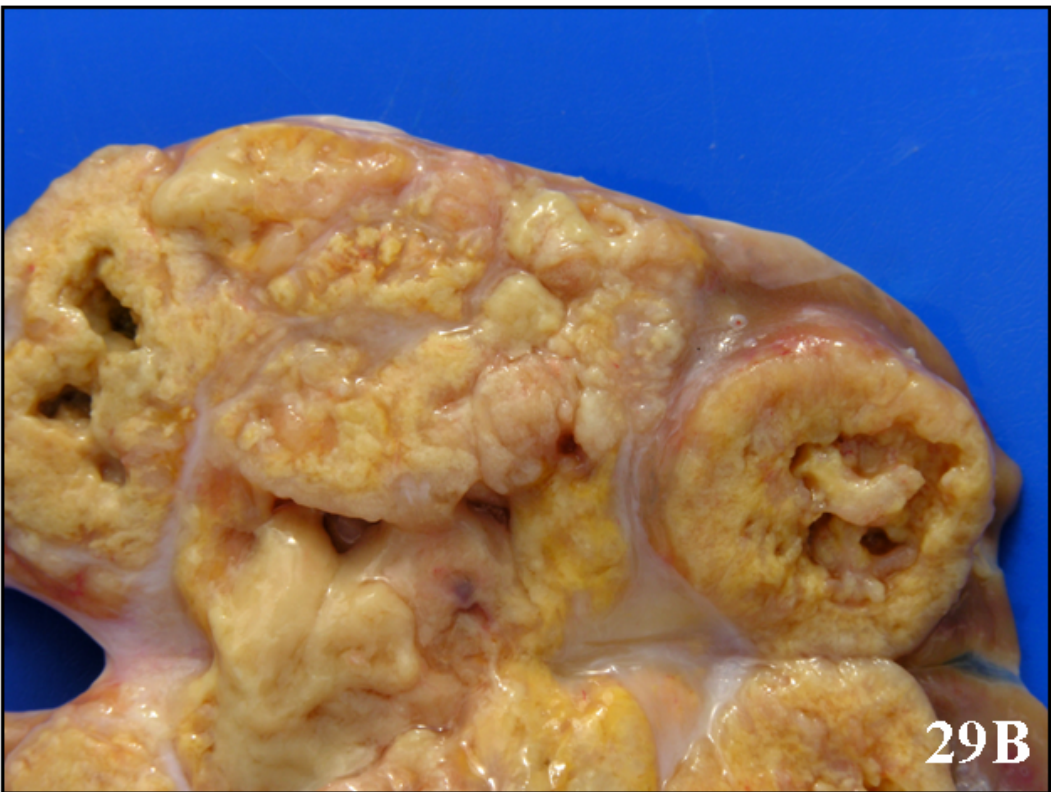


Figura 30. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Metástases de carcinomas de células escamosas (CCEs). A. Bovino 1. Áreas amarelas multifocais nodulares no bordo do fígado. B. Bovino 7. Áreas amarelas subpleurais. C. Bovino 27. Úlcera na mucosa contígua à metástase de implantação de CCE nas camadas serosa e muscular do intestino delgado.

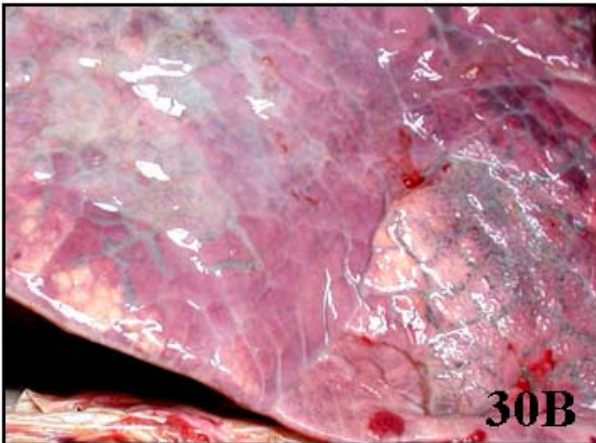


Figura 31. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 26. Metástase de carcinoma de células escamosas (CCE) bem diferenciado no linfonodo retrofaríngeo esquerdo (200x). B. Bovino 29. Metástase de CCE pouco diferenciado no fígado (visto em 27C; 200x). C. Bovino 18. Metástase de CCE bem diferenciado no pulmão (100x). D. Bovino 27. Metástase de CCE bem diferenciado no intestino delgado ilustrada na figura 30C (100x). H & E.

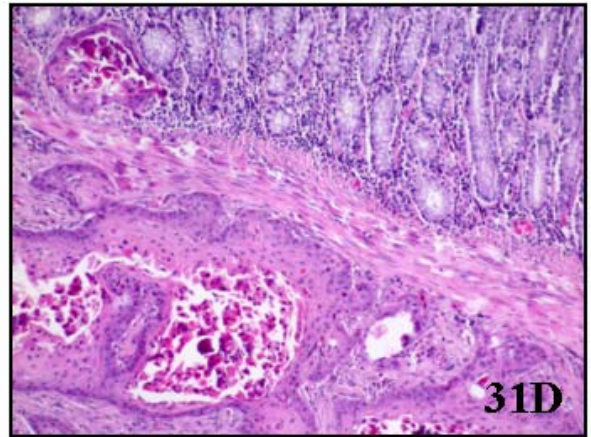
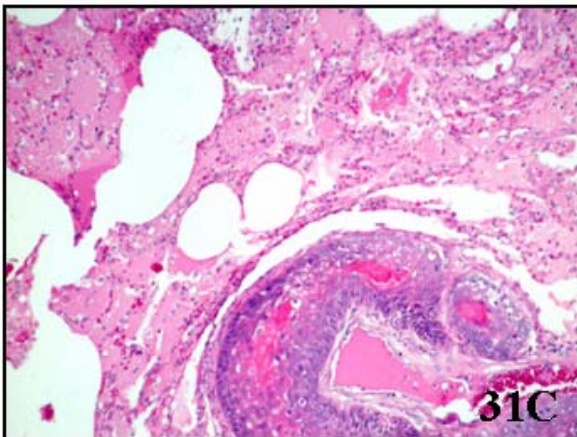
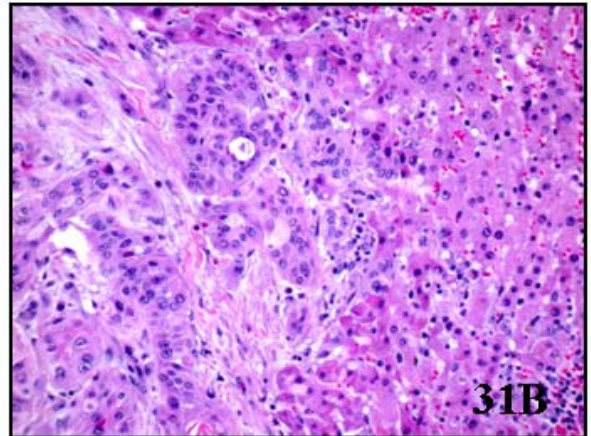
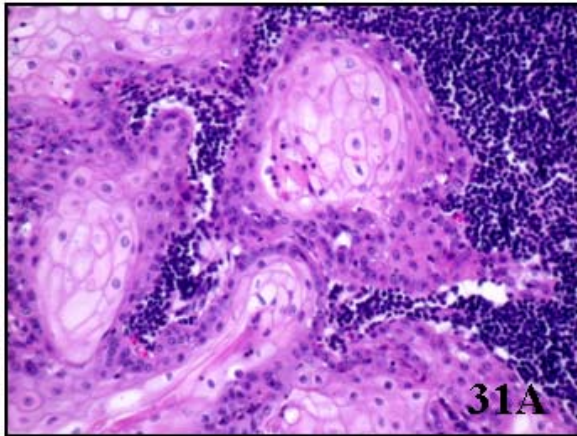
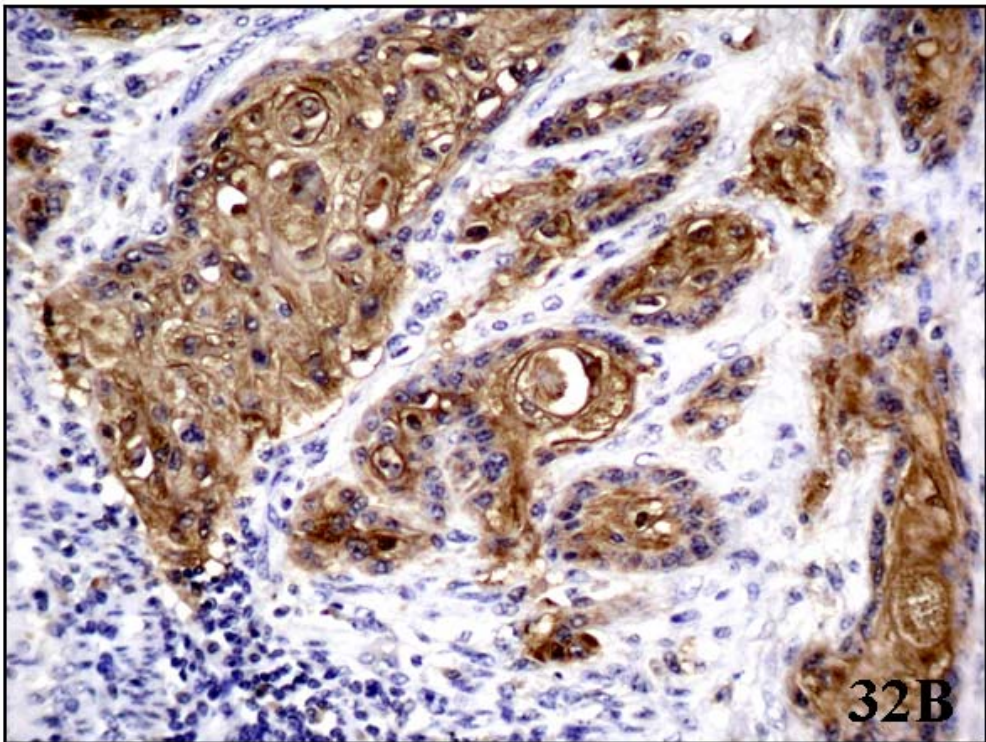
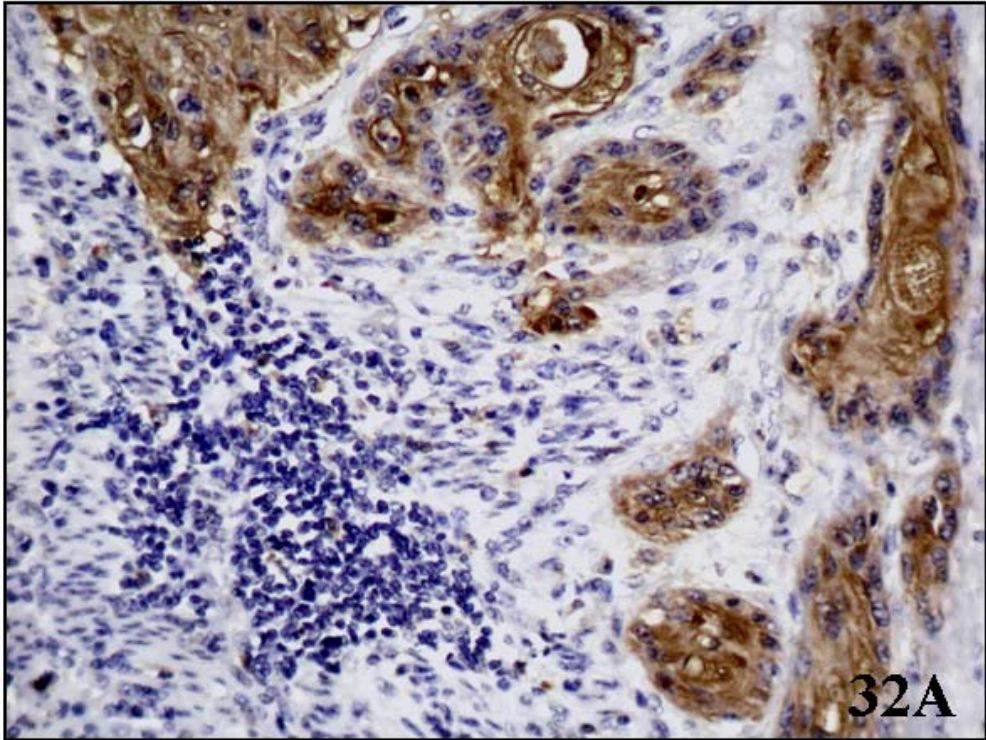




Figura 32. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Imunomarcaç o para pancitoqueratina bovina. A. Bovino 1. Linfonodo ruminal. Queratin citos neopl sicos fortemente positivos para citoqueratina (200x). B. Magnifica o de A (400x). IHQ, LSAB – peroxidase, contracolora o pela hematoxilina.



## 4.2 Discussão

A samambaia (*Pteridium aquilinum*) é reconhecida como planta tóxica para várias espécies animais (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; PLOWRIGHT et al., 1971; PIRIE, 1973; CAMPOS NETO et al., 1975; JARRETT, 1978; FRANÇA et al., 2002; PEIXOTO et al., 2003) e sua toxicidade direta ou indireta para humanos também tem sido investigada (EVANS et al., 1972; HIRONO et al., 1972; ALONSO-AMELOT et al., 1996; MARLIÈRE et al., 1998; ALONSO-AMELOT et al., 1999; MARLIÈRE et al., 1999; BICUDO, 2002).

*P. aquilinum* é cosmopolita, porém subdivide-se em variedades geográficas bem definidas (FENWICK, 1988), sendo *P. aquilinum* subesp. *caudatum* var. *arachnoideum* a variedade encontrada no Brasil (FREITAS et al., 1999; TOKARNIA et al., 2000). Esta planta requer condições ambientais favoráveis para seu pleno desenvolvimento e proliferação (LORENZI, 1991; TOKARNIA et al., 1979; SMITH, 1999), como as observadas nas propriedades estudadas (solos ácidos e arenosos, encostas de morros).

Os 30 bovinos estudados com CCEs no TAS eram provenientes de propriedades rurais onde a samambaia era abundante nas áreas de pastoreio ou, como no caso de dois bovinos, os animais tinham sido adquiridos de propriedades infestadas pela planta. Essa observação epidemiológica reforça os relatos de outros autores para essa forma de intoxicação por samambaia no Brasil e em outros países (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; PLOWRIGHT et al., 1971; PIRIE, 1973; JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978; TOKARNIA et al., 2000).

Na maioria das propriedades estudadas (18/27) já havia ocorrido pelo menos um caso de CCE no TAS de bovinos no mesmo ano em que foi realizado o questionário epidemiológico ou em anos anteriores, e/ou casos de HEB (7/27), o que demonstra a ocorrência de perdas econômicas consideráveis na região em consequência da presença de samambaia nas áreas de pastoreio.

Dentre as condições descritas para o consumo da samambaia pelos bovinos, destaca-se a fome (TOKARNIA et al., 1979; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000). A maioria dos proprietários relatou que a planta era consumida espontaneamente durante todo o ano, porém em maiores quantidades quando havia escassez de alimentos.

A taxa de morbidade foi de 2,7% numa população de 1090 bovinos. A letalidade pode ser considerada como de 100%, levando-se em consideração que os bovinos que foram

submetidos à eutanásia estavam em estado avançado da doença e provavelmente iriam morrer dentro de pouco tempo. Esses dados assemelham-se aos descritos na literatura (morbidade de 3% e letalidade de 100%) para essa forma de intoxicação no Estado de Santa Catarina (GAVA, 1993).

A maioria dos bovinos afetados eram vacas, porém isso não representa uma predisposição das fêmeas para desenvolverem CCEs no TAS. Este fato que pode ser explicado por essa categoria representar a maior parcela da população bovina nas 27 propriedades estudadas (41%) e nos dois municípios atingidos (34,5% em Jaguari e 36,3% em Nova Esperança do Sul). Adicionalmente, as vacas assim como os bois (destinados ao trabalho), têm vida mais prolongada que as demais categorias de bovinos, tendo mais chances de desenvolver as lesões desta forma de intoxicação crônica por samambaia, a qual é considerada como dose-dependente, ou seja, os bovinos devem consumir pequenas quantidades de samambaia por vários meses a anos para desenvolverem os CCEs (TOKARNIA et al., 2000).

Os bovinos neste estudo tinham entre três e 13 anos, sendo o maior número de casos entre sete e oito anos (46,6%). Estes dados estão em concordância com a literatura que destaca uma maior casuística em bovinos acima de seis anos (TOKARNIA et al., 2000), principalmente entre sete e oito anos (GAVA, 1993). Somente dois bovinos tinham três ou quatro anos, porém isso indica que animais com menos de cinco anos também podem adoecer. Não foi observada predisposição racial, sendo a grande maioria dos bovinos atingidos de raça mista provavelmente por esta representar a maioria da população bovina nas propriedades estudadas.

Os sinais clínicos apresentados por todos os bovinos examinados foram semelhantes aos relatados na literatura (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; POLACK, 1990; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000;) e geralmente variaram de acordo com a localização do CCE de maior extensão no TAS, de forma semelhante à descrita anteriormente (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000), porém verificou-se também a ocorrência de sinais clínicos não diretamente relacionados à localização do maior CCE ou relacionados com papilomatose digestiva acentuada.

Bovinos que tinham CCEs na região cranial do TAS (base da língua, faringe/orofaringe, epiglote) apresentavam mais frequentemente tosse e sinais clínicos relacionados com distúrbios da apreensão e deglutição de alimentos. Bovinos com tumores ulcerados nestas localizações apresentaram halitose acentuada devido à impactação de alimentos e necrose da massa tumoral. Os CCEs que causavam estenose do lúmen esofágico e

da entrada do rúmen geralmente eram acompanhados por sinais clínicos relacionados à regurgitação de alimentos ou dificuldades na eructação dos gases da ruminação, levando frequentemente ao timpanismo, semelhantemente ao descrito por outros autores (PIRIE, 1973; RADOSTITS et al., 2003). O curso clínico crônico associado ao impedimento mecânico à ingestão de alimentos (TOKARNIA et al., 2000) deve ter contribuído para o acentuado emagrecimento observado em todos os bovinos intoxicados.

Os achados macroscópicos e histológicos caracterizaram-se principalmente por alterações epiteliais neoplásicas benignas (papilomas) e malignas (PTs e CCEs) nas mesmas localizações ao longo do TAS.

Papilomas foram observados em 29 dos 30 casos (97%) examinados nesse estudo, semelhantemente ao que foi relatado na Escócia, onde 96% dos bovinos tinham esses tumores benignos nas mesmas localizações dos CCEs (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978). Foram também detalhadas as características macroscópicas e microscópicas dos papilomas, que se assemelharam às descritas na literatura (HEAD et al., 2002, JARRETT, 1978; 1985), sendo importante salientar a presença de várias fases de desenvolvimento desta lesão. A etiologia viral dos papilomas do TAS já foi plenamente estabelecida, sendo os mesmos causados pelo BPV-4 (JARRETT, 1985). Corpúsculos de inclusão intranucleares nos queratinócitos foram relatados (JARRETT et al., 1978; JARRETT, 1978; 1985), porém não foram vistos neste estudo.

Ficou evidente através dos resultados deste trabalho que há uma amplificação no número de papilomas em bovinos pastoreando samambaia, pois na rotina de necropsias de bovinos no LPV-UFSM, papilomas são raramente vistos e quando são, geralmente estão em pequeno número em bovinos provenientes de áreas sem samambaia, fato que também foi observado em bovinos de matadouro na Escócia (JARRETT, 1985). Esta amplificação tem sido explicada (JARRETT et al., 1978; JARRETT, 1978; 1985) pelos efeitos imunossupressores da samambaia (EVANS, 1968). Foi também demonstrado através de estudo experimental que a ingestão prolongada de samambaia deprime o mecanismo de regressão espontânea dos papilomas permitindo que os mesmos permaneçam no TAS por vários anos (JARRETT, 1985). Entretanto, vale salientar que papilomas com características histológicas típicas da fase de regressão, com infiltrados linfocitários marcados (KNOWLES et al, 1996), foram observados em vários dos bovinos deste estudo, indicando que não há uma total inibição dos mecanismos de regressão espontânea dos papilomas, mas talvez haja um retardamento neste processo. Com a permanência dos papilomas por mais tempo, a

proliferação celular induzida pelo BPV-4 proveria um alvo amplificado para a ação dos co-carcinógenos químicos presentes na samambaia (CAMPO et al., 1994; CAMPO, 1997; 2002).

Quanto à distribuição dos CCEs nas regiões craniais, médias e caudais do TAS, observou-se alteração nas percentagens quando considerados somente os tumores de maior tamanho e quando considerou-se o número total de vezes em que CCEs de tamanhos variados foram diagnosticados nas diferentes regiões. A maior variação na percentagem foi observada na região média (de 16% para 26%) e as menores variações foram vistas nas regiões cranial (de 39% para 34%) e caudal (de 45% para 40%), respectivamente. Isto confirma que a distribuição dos CCEs no TAS não é constante, tendo sido observados diferentes percentuais de frequência de aparecimento deste tumor em diferentes estudos (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978; GAVA, 1993; GAVA et al., 2002). Revela também uma percentagem elevada de CCEs pequenos principalmente no esôfago, os quais possivelmente passam despercebidos, no caso de apenas serem colhidos e examinados os tumores de maiores proporções.

Microscopicamente, os CCEs examinados nos bovinos desse estudo tinham características semelhantes às descritas anteriormente (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; JARRETT, 1978; POLACK, 1990; TOKARNIA et al., 2000). A grande maioria era bem diferenciada e com abundante queratinização. Através da imunoistoquímica observou-se acentuada redução na imunomarcagem para esse filamento intermediário nos CCEs pouco diferenciados.

Um achado interessante foi a presença freqüente de infiltrado inflamatório eosinofílico no estroma conjuntivo dos CCEs. Esses infiltrados tinham sido observados anteriormente (POLACK, 1990), porém sua presença não foi discutida. Eosinófilos têm sido constantemente observadas em CCEs de laringe em humanos (ERCAN et al., 2005; SAID et al., 2005) e foram correlacionados com um maior potencial de invasão tumoral (SAID et al., 2005) ou com a idade dos pacientes, sendo mais freqüentes em pessoas com idade superior a 60 anos (ERCAN et al., 2005). O papel dos eosinófilos nos CCEs de bovinos intoxicados por samambaia não está definido e poderá vir a ser investigado.

Metástases de CCEs foram observadas independentemente do grau de diferenciação celular dos CCEs primários. A percentagem de metástases (60%) foi superior aos relatos anteriores que reportaram metástases em 20-40% dos casos (HEAD et al., 2000; JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978).

Somente em um bovino foi observada uma lesão nodular no intestino, correspondendo histologicamente a um adenoma. Lesões nodulares múltiplas (adenomas ou pólipos

adenomatosos; placas sésseis compostas de epitélio hiper Cromático; lesões marcadamente proliferativas na ampola de Vater; e adenocarcinomas) foram relatadas nos intestinos de 56% de 80 bovinos examinados com CCEs no TAS (JARRETT et al., 1978).

Um bovino tinha um papiloma na mucosa da bexiga, diferindo da literatura que relata a freqüente coexistência entre CCEs no TAS e tumores na bexiga relacionados a HEB (DÖBEREINER et al., 1967; JARRETT et al., 1978; POLACK, 1990; SOUZA & GRAÇA, 1993; TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 2000). Baseado no questionário epidemiológico, a ocorrência de HEB nas propriedades estudadas é bem menos expressiva naquela região do que a ocorrência de CCEs no TAS associada ao consumo de samambaia, concordando com os autores que observaram que as diferentes formas clínicas da intoxicação por samambaia não ocorrem com a mesma freqüência nas diversas regiões (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 2000).

A observação da estreita correlação na distribuição da papilomatose digestiva e dos CCEs alimentares (BUENO, 1953; PLOWRIGHT, 1955; JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978) bem como a ligação desta doença ao consumo de samambaia (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978) foi crucial para a elucidação de grande parte da patogenia desta forma de intoxicação por *P. aquilinum*. Os estudos experimentais *in vivo* também confirmaram o papel da samambaia na carcinogênese da HEB (ROSEMBERGER & HEESCHEN, 1960 apud DÖBEREINER et al., 1966) e dos CCEs do TAS (JARRETT, 1985; CAMPO et al., 1994). A etiologia viral dos papilomas alimentares foi confirmada pela demonstração de grandes corpúsculos de inclusão intranucleares em queratinócitos, pela evidência de partículas virais correspondentes a um papilomavírus na microscopia eletrônica (JARRETT, 1978), e pela detecção do DNA do BPV-4 (CAMPO et al., 1985; CAMPO et al., 1994).

A presença de papilomas em transformação (PTs) para CCEs em mais da metade dos bovinos estudados foi um dos achados mais importantes deste estudo. Os PTs estavam localizados próximos à papilomas ou CCEs e apresentavam aspectos histológicos convincentes da malignização desta neoplasia inicialmente benigna. Essas são evidências morfológicas indiscutíveis da transformação de papilomas em CCEs no TAS, como descritas anteriormente (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978), e foram a base para vários estudos moleculares já realizados (CAMPO et al., 1980; JARRETT, 1980; JENSON et al., 1980; CAMPO et al., 1985; GAUKROGER et al., 1989; GAUKROGER et al., 1991; ANDERSON et al., 1997). A presença do DNA do BPV-4 não é necessária para a manutenção do estado maligno dos CCEs (CAMPO et al., 1985; CAMPO et al., 1994), como comprovado por

técnicas moleculares avançadas (CAMPO et al., 1994; GAUKROGER et al., 1991), incluindo a técnica de *Southern blot*, que é considerada como padrão-ouro para a detecção de papilomavírus (WOSIACKI, 2002). Uma explicação para a ausência do DNA viral nos CCEs alimentares é a de que o papel do BPV-4 na carcinogênese estaria confinado aos primeiros estágios de transformação celular (CAMPO et al., 1994). Uma das grandes diferenças entre o potencial oncogênico do BPV-4 e do papilomavírus humano (HPV), é que o BPV-4 não possui o gene *E6* (JACKSON et al., 1991), o qual contribui grandemente para a transformação celular maligna observada na infecção pelo HPV-16 em humanos (PENNIE et al., 1993; CAMPO et al., 1985; DAS et al., 1993; SHOW-LI et al., 1993; LANCASTER, 1993).

O sinergismo entre a infecção por BPV-4 e a exposição à quercetina, um flavonóide carcinogênico presente na samambaia (PAMUCKU et al., 1980; MUSONDA & CHIPMAN, 1999), na transformação celular foi bem estabelecido em estudos *in vitro* (JAGGAR et al., 1990; CAMPO et al., 1999; PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CONNOLLY et al., 1998; BENISTON et al., 1999; BENISTON et al., 2001). A comprovação deste sinergismo *in vivo* não foi completa, não ocorrendo malignização dos papilomas em bovinos infectados pelo BPV-4 e tratados com quercetina, possivelmente porque estes eram imunocompetentes, eliminando qualquer célula maligna através de mecanismos de imunovigilância. Isto confirma também a necessidade da imunossupressão conferida por outros princípios tóxicos da samambaia na patogenia dos CCEs, pois a quercetina não é imunossupressora (CAMPO et al., 1994).

Adicionalmente, em outros estudos *in vivo* (JARRETT et al., 1978; JARRETT, 1980) foi difícil afirmar se todos os CCEs originavam-se de papilomas pré-existentes ou se também havia transformação maligna simultânea do epitélio previamente normal. Através do encaminhamento dirigido de áreas rugosas na mucosa do TAS, principalmente da mucosa esofágica, foi possível observar microscopicamente alterações pré-neoplásicas (áreas de displasia), áreas de CCE *in situ* e CCEs em fase inicial de crescimento, independentemente da presença de papilomas no local, mostrando claramente ser possível o desenvolvimento de CCEs diretamente do epitélio normal. Este aspecto é muito importante na patogenia dos CCEs, pois indica que além das interações BPV-4-quercetina propostas por alguns autores (PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CONNOLLY et al., 1998; BENISTON et al., 1999; BENISTON et al., 2001), deve haver uma ação direta da carcinogênese química da samambaia, possivelmente do ptaquilosídeo norsesquiterpeno (EVANS et al., 1961; HIRONO et al., 1973; FENWICK, 1988; POTTER, 1999; SMITH et al.,



1999; VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1999), no desenvolvimento pelo menos de parte dos CCEs digestivos.

## 5. CONCLUSÃO

1 – O diagnóstico da doença é baseado nos dados epidemiológicos (presença e consumo da samambaia), sinais clínicos, achados de necropsia e histológicos.

2 – A idade dos bovinos variou entre três e 13 anos, sendo mais frequentemente afetados os bovinos entre sete e oito anos.

3 – Os achados macroscópicos e histológicos consistiram de papilomatose digestiva, papilomas em transformação (PT) para CCEs, CCEs e metástases de CCEs.

4 – Os CCEs foram observados mais frequentemente nas regiões craniais (base da língua, faringe/orofaringe, epiglote) e caudais (entrada do rúmen e rúmen), e menos frequentemente no esôfago.

5 – A histologia dos papilomas revelou três fases de desenvolvimento: fase inicial de crescimento, fase de desenvolvimento e fase de regressão.

6 – A presença de PTs ao longo do TAS é a principal evidência histomorfológica da cocarcinogenicidade entre os princípios tóxicos da samambaia e a infecção pelo papilomavírus bovino tipo 4.

7 – A presença de áreas de displasia e de CCEs *in situ* no epitélio de revestimento de várias regiões do TAS demonstra que os CCEs também podem iniciar diretamente do epitélio prévia e aparentemente normal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**, v. 382, p. 587-588, 1996.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Milk as a vehicle for the transfer of ptaquiloside: a bracken carcinogen. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV.**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 86-90.

ANDERSON, R. A. et al. Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumors. **Veterinary Journal**, v. 154, p. 69-78, 1997.

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

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

BICUDO, F. Perigo à mesa: samambaia consumida em Minas Gerais favorece reprodução de vírus ligado a tumores. **Pesquisa FAPESP**, n. 80, p. 44-47, 2002.

BUENO, P. Papilomatose faringiana em bovinos. **O Biológico**, v. 19, n. 1, p. 8-10, 1953.

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

CAMPO, M. S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **Veterinary Journal**, v. 154, p. 175-188, 1997.

CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89, p. 249-261, 2002.

CAMPO, M. S. et al. The presence of bovine papillomavirus type 4 DNA is not required for the progression to, or the maintenance of the malignant state in cancers of the alimentary canal in cattle. **EMBO Journal**, v. 4, n. 7, p. 1819-1825, 1985.

CAMPO, M. S. et al. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, v. 286, p. 180-182, 1980.

CAMPO, M. S. et al. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 8, p. 1597-1601, 1994.

CAMPO, M. S. et al. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetina and cell transformation. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV.**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 116-122.

CAMPOS NETO, O.; BARROS, H. M.; BICUDO P. L. Estudo do carcinoma do trato digestivo superior e da hematúria enzoótica dos bovinos na região de Botucatu, Estado de São Paulo. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v. 27, p. 125-133, 1975.

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

DAS, B. C. et al. Human papillomavirus DNA sequences in adenocarcinoma of the uterine cervix in Indian women. **Cancer**, v. 72, n. 1, p. 147-153, 1993.

DÖBEREINER, J. et al. Metabolites in urine of cattle with experimental bladder lesions and fed bracken fern. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 189-199, 1966.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 489-504, 1967.

ERCAN, I. et al. Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in cancer of the larynx. In.: **PROCEEDINGS OF 27<sup>th</sup> NATIONAL OTORHINOLARYNGOLOGY AND HEAD AND NECK SURGERY CONGRESS**, 2005, Antalya, Turkey. Proceedings of 27<sup>th</sup> National Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Congress, Antalya, Turkey, 2005, p. 869-873.

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

EVANS, I. A.; JONES, R. S.; MAINWARING-BURTON R. Passage of bracken fern toxicity into milk. **Nature**, v. 237, n. 5350, p. 107-108, 1972.

EVANS, I. A. et al. Studies on bracken poisoning in cattle – part VII. The toxicity of bracken rhizomes. **Veterinary Record**, v. 73, n. 35, p. 852-853, 1961.

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

FRANÇA, T. N.; Tokarnia, C. H.; Peixoto, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 85-96, 2002.

FREITAS, R. N. et al. <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts in tissues obtained from rats treated with bracken fern (*Pteridium aquilinum* subsp. *caudatum*) from Brazil. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV.**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 132-135.

GAUKROGER, J. M. et al. Induction of virus producing tumours in athimic nude mice by bovine papillomavirus type 4. **Veterinary Record**, v. 125, p. 391-392, 1989.

GAUKROGER, J. M. et al. Malignant transformation of a papilloma induced by bovine papillomavirus type 4 in the nude mouse renal capsule. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1165-1168, 1991.

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

GAVA, A. et al. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, p. 362-365, 2002.

HEAD, K. W.; ELSE, R. W.; DUBIELZIG, R. R. Tumours of the alimentary tract. In: MEUTEN, D. J. **Tumours of domestic animals**. California: Iowa State Press, 4<sup>th</sup>, p. 444-448, 2002.

HIRONO, I. et al. Carcinogenic activity of processed bracken as human food. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 48, p. 473, 1972.

HIRONO, I. et al. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 50, n. 5, p. 1367-1371. 1973.

JACKSON, M. E. et al. The B subgroup bovine papillomaviruses lack an identifiable E6 open reading frame. **Molecular Carcinogenesis**, 4: 382-387. 1991.

JAGGAR, R. T. et al. Co-operation between bovine papillomavirus type 4 and ras in the morphological transformation of primary bovine fibroblasts. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 3041-3046, 1990.

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

JARRETT, W. F. H. Bracken fern and papillomavirus in bovine alimentary cancer. **British Medical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 79-81, 1980.

JARRETT, W. F. H. The natural history of bovine papillomavirus infections. **Advances in Viral Oncology**, v. 5, p. 83-102, 1985.

JARRETT, W. F. H. et al. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. **Nature**, v. 274, p. 215-217, 1978.

JENSON, A. B. et al. Immunological relatedness of papillomaviruses from different species. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 64, p. 495-500, 1980.

KNOWLES, G.; O'NEIL, B. W.; CAMPO, M. S. Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. **Journal of Virology**, v. 70, p. 8451-8458, 1996.

LANCASTER, W. D. Viral role in cervical and liver cancer. **Cancer Supplement**, v. 70, n. 6, p. 1794-1797, 1993.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 2º ed., p. 352, 1991.

MARLIÈRE, C. A. et al. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) consumption and oesophageal and stomach cancer in the Ouro Preto region, Minas Gerais, Brazil. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 144-149.

McKEE, P. H. **Essential Skin Pathology**. London: Mosby, p. 141-152, 1999.

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

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

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

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

PENNIE, W. D. et al. Analysis of the transforming functions of BPV-4. **Virology**, v. 193, p. 614-620, 1993.

PIRIE, H. M. Unusual occurrence of squamous carcinoma of the upper alimentary tract in cattle in Britain. **Research Veterinary Science**, v. 15, p. 135-138, 1973.

PLOWRIGHT, W. Malignant neoplasia of the oesophagus and rumen of cattle in Kenya. **Journal Comparative Pathology Therapeutics**, v. 65, p. 108-114, 1955

PLOWRIGHT, W.; LINSELL, C. A.; PEERS, F. G. A focus of ruminal cancer in Kenyan cattle. **British Journal of Cancer**, v. 25, p. 72-80, 1971.

POLACK, E. W. **Toxicidade da *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn no Estado do Paraná: estudo epidemiológico e anátomo-patológico e utilização da técnica de peroxidase-antiperoxidase na pesquisa do papilomavírus em lesões atribuídas à ingestão da planta em**

bovinos. 1990.102f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

POTTER, D. M. The *Pteridaceae* as a source of compounds with pharmaceutical activity. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV.**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 60-67.

RADOSTITS, O. M. et al. **Doenças do trato alimentar – II.** In\_\_\_\_: Clínica Veterinária. Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003, cap. 6, p. 235-310.

RECOUSO, R. C. et al. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 22, 2003.

SAID, M. et al. Tissue eosinophilia: a morphologic for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. **BMC Clinical Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2005.

SHOW-LI, C. et al. Identification and typing of human papillomavirus in cervical cancers in Taiwan. **Cancer**, v. 72, p. 1939-1945, 1993.

SMITH, R. T. The spread of bracken: An end-of-century assessment of factors, risks and land use realities. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV.**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 2-8.

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

SOUZA, M. V.; GRAÇA, D. L. Intoxicação crônica por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Polypodiaceae) em bovinos. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 203-207, 1993.



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

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J; da SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1979, p. 48-57.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000, 310 p.

VILLALOBOS-SALAZAR, J. et al. Factors which may affect ptaquiloside levels in milk: effects of altitude, bracken fern growth stage, and milk processing. In: **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL BRACKEN GROUP CONFERENCE - BRACKEN FERN: TOXICITY, BIOLOGY AND CONTROL. IV.**, 1999, Manchester. Proceedings of the International Bracken Group Conference - Bracken fern: toxicity, biology and control. Manchester: International Bracken Group, 1999. p. 68-74.

WOSIACKI, S.R. **Papilomavírus tipo 2 em bexiga de bovinos com hematúria enzoótica: detecção usando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico**. 2002. 114f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Sanidade Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

Protocolo de imunohistoquímica (IHQ) para citoqueratina bovina.

### 1) Preparação das lâminas

- Corte histológico de 3 µm em lâmina silanizada

### 2) Protocolo de IHQ

- Xilol por 30 min (na estufa 60° C)
- Xilol (frio) por 5 min
- Álcool absoluto (banho rápido para retirar o excesso de xilol)
- Álcool 96° GL por 1 min
- Álcool 90° GL por 30 seg
- Álcool 80° GL por 30 seg
- Álcool 70° GL por 1 min
- Água corrente por 3 min
- Água destilada por 1 min
- Peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) – 2 vezes de 10 min (pingar sobre os cortes individualmente)
- Lavar em água corrente por 10 min
- Água destilada por 1 min
- Lavar em água destilada em 2 vezes por 5 min
- Levar ao microondas no tampão TRIS-EDTA (pH 9,0) – 4 vezes por 2,5 minutos (preenchendo o recipiente quando necessário)
- Deixar esfriar em temperatura ambiente
- Água corrente por 5 min; água destilada por 1 min
- Clara de ovo (1 clara em 100 ml de água) em água destilada por 15 min
- Água corrente por 5 min; água destilada por 1 min
- Leite em pó desnatado a 5% em PBS por 20 min
- Água corrente por 3 min; água destilada por 1 min
- PBS por 5 min
- Anticorpo primário: - pingar o Ac diluído a 1:1000 (em diluente de anticorpo) sobre os cortes

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

## APÊNDICE B

Outras alterações macroscópicas e histológicas observadas em 30 bovinos com carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior.

Bovino	Alterações
01	<b>Língua:</b> múltiplos cistos de <i>Sarcocystis</i> sp. <b>Útero:</b> endometrite fibrinopurulenta subaguda difusa moderada. <b>Encéfalo - Meninges:</b> hemorragias multifocais. <b>Ponte:</b> leucocitostase leve.
02	<b>Língua:</b> múltiplos cistos de <i>Sarcocystis</i> sp. <b>Rim:</b> infarto subagudo focal. <b>Encéfalo - Mesencéfalo:</b> vacuolização neuronal moderada no núcleo vermelho.
03	<b>Pele hirsuta:</b> dermatite eosinofílica e linfo-histioplasmocitária associada a organismos com morfologia compatível com larvas de <i>Dermatobia hominis</i> . <b>Pulmão:</b> enfisema intersticial e interlobular difuso acentuado com fibrose multifocal. <b>Rúmen:</b> numerosos exemplares de trematódeos compatíveis morfologicamente com <i>Paramphistomum</i> sp. <b>Pâncreas:</b> múltiplos nódulos de hiperplasia. <b>Rim:</b> atrofia da gordura perirrenal. <b>Fígado:</b> atrofia do lobo esquerdo. <b>Encéfalo - Córtex telencefálico e cerebelo:</b> manguitos perivasculares discretos.
04	<b>Fígado:</b> telangiectasia multifocal e leve infiltrado inflamatório linfocitário periportal. <b>Encéfalo - Córtex telencefálico, hipocampo, núcleos da base:</b> melanócitos nas leptomeninges. <b>Tálamo:</b> melanócitos nas leptomeninges e vacuolização de neurônio do núcleo habenular.
05	<b>Tegumento e tecido subcutâneo:</b> moderada infestação por <i>Boophilus microplus</i> e <i>Dermatobia hominis</i> .
06	<b>Encéfalo - Tronco encefálico:</b> hemorragia subdural focalmente extensa. <b>Cápsula interna:</b> presença de um exemplar de <i>Sarcocystis</i> sp.
07	<b>Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> vacuolização neuronal moderada. <b>Bulbo na altura do óbex e mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> presença de lipofuscina.
08	<b>Tegumento e tecido subcutâneo:</b> atrofia serosa da gordura. <b>Pulmão:</b> pneumonia granulomatosa com áreas de agudização multifocal acentuada. <b>Fígado:</b> telangiectasia multifocal moderada.
09	<b>Tegumento e tecido subcutâneo:</b> atrofia serosa da gordura. <b>Coração:</b> presença de petéquias no sulco coronário.
10	<b>Tegumento e tecido subcutâneo:</b> atrofia serosa da gordura. <b>Coração (epicárdio):</b> área focalmente extensa de hemorragia.
12	<b>Encéfalo - Rete mirabile carotídea:</b> presença de sangue nos seios venosos. <b>Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> vacúolos no citoplasma de neurônios do núcleo vermelho.
13	<b>Útero:</b> presença de um feto fêmea com 25 cm de comprimento da nuca ao sacro. <b>Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> vacúolos no citoplasma de neurônios do núcleo vermelho. <b>Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares:</b> lipofuscinosose multifocal.
14	<b>Tegumento e tecido subcutâneo:</b> atrofia serosa da gordura. <b>Intestino delgado:</b> múltiplos nódulos de <i>Oesophagostomum</i> sp. <b>Fígado:</b> atrofia do lado esquerdo. Histo: infiltrado neutrofílico e linfocitário periportal moderado. <b>Vesícula biliar:</b> presença de concreção arenosa de 3 cm de diâmetro. <b>Encéfalo - Rete mirabile carotídea:</b> presença de sangue nos seios venosos. <b>Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> vacúolos no citoplasma de neurônios do núcleo vermelho.
16	<b>Fígado:</b> abscessos multifocais. Fibrose periportal acentuada. <b>Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> lipofuscinosose multifocal.
17	<b>Traquéia:</b> edema moderado. <b>Pulmão:</b> enfisema e congestão multifocal moderada. <b>Coração:</b> atrofia serosa da gordura. <b>Rim:</b> atrofia da gordura perirrenal.

	<p><b>Fígado:</b> atrofia difusa moderada do parênquima hepático.  <b>Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> vacuolização neuronal no núcleo vermelho.</p>
18	<p><b>Pulmão:</b> hemorragia, congestão e edema multifocal acentuado.  <b>Encéfalo - Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares e mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> lipofuscinose. <b>Cerebelo:</b> congutinação cerebelar.</p>
19	<p><b>Rim:</b> ausência da gordura perirrenal.  <b>Encéfalo - Mesencéfalo:</b> há um manguito perivascular linfo-histiocitário.</p>
20	<p><b>Rim:</b> ausência da gordura perirrenal.  <b>Encéfalo - Córtex frontal:</b> melanose meníngea multifocal leve.</p>
21	<p><b>Pulmão:</b> pneumonia fibrinosuprativa e linfo-histiocitária com fibrose multifocal moderada (pneumonia por aspiração).  <b>Fígado:</b> numerosos exemplares de trematódeos compatíveis morfológicamente com <i>Fasciola hepatica</i>.  <b>Rim:</b> ausência da gordura perirrenal.</p>
22	<p><b>Rúmen:</b> numerosos exemplares de trematódeos compatíveis morfológicamente com <i>Paramphistomum</i> sp.  <b>Encéfalo - Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares:</b> manguito perivascular. <b>Rete mirabile carotídea:</b> sangue nos seios venosos. <b>Hipófise:</b> microcistos.</p>
23	<p><b>Fígado:</b> abscessos multifocais.  <b>Rim:</b> ausência da gordura perirrenal.</p>
24	<p><b>Úbere:</b> mastite purulenta multifocal moderada.  <b>Pulmão:</b> pneumonia fibrinosuprativa e linfo-histiocitária com fibrose multifocal moderada (pneumonia por aspiração).  <b>Rim:</b> ausência da gordura perirrenal.</p>
25	<p><b>Coração:</b> exemplares de <i>Sarcocystis</i> sp.  <b>Encéfalo - Bulbo na altura do óbex e mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> lipofuscinose multifocal moderada. <b>Córtex telencefálico:</b> melanose nas meninges. <b>Cerebelo:</b> congutinação cerebelar e hemorragia subdural leve a moderada.</p>
26	<p><b>Encéfalo - Bulbo na altura do óbex, mesencéfalo na altura dos colículos rostrais, cerebelo:</b> congutinação cerebelar. <b>Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares:</b> lipofuscinose multifocal leve.</p>
27	<p><b>Encéfalo - Bulbo na altura do óbex:</b> lipofuscina acentuada predominantemente nos núcleos dorsais dos nervos vago e trigêmeo. <b>Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares:</b> lipofuscinose acentuada. <b>Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> lipofuscinose acentuada e presença de vacúolos intracitoplasmáticos em neurônios do núcleo vermelho. <b>Cerebelo:</b> congutinação cerebelar. <b>Córtex telencefálico frontal e parietal:</b> melanócitos nas leptomeninges. <b>Tálamo:</b> vacúolos intracitoplasmáticos em neurônios do núcleo habenular. <b>Hipocampo:</b> hialinização dos vasos do plexo coróide e presença de melanócitos leptomenígeais. <b>Núcleos da base:</b> melanócitos leptomenígeais.</p>
28	<p><b>Encéfalo - Bulbo na altura do óbex:</b> lipofuscinose moderada. <b>Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares:</b> hemorragia subdural e lipofuscinose moderada. <b>Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> lipofuscinose acentuada nos neurônios do núcleo vermelho e oculomotor e neurônios ao redor do aqueduto. Há vacúolos intracitoplasmáticos no núcleo vermelho. <b>Córtex telencefálico frontal e parietal e hipocampo:</b> há moderada quantidade de macrófagos carregados com hemossiderina ao redor dos vasos da substância branca e leptomeninges.</p>
29	<p><b>Encéfalo - Bulbo na altura do óbex, ponte na altura dos pedúnculos cerebelares, mesencéfalo na altura dos colículos rostrais:</b> hemorragia perivascular leve.</p>
30	<p><b>Encéfalo - Bulbo na altura do óbex:</b> hemorragia subdural. <b>Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares:</b> lipofuscinose discreta. <b>Cerebelo:</b> há hemorragia subdural multifocal moderada e congutinação cerebelar. Alguns neurônios de Purkinje estão finamente vacuolizados. <b>Tálamo:</b> hemorragia no III ventrículo. <b>Córtex telencefálico frontal e parietal, hipocampo e núcleos da base:</b> presença de melanócitos leptomenígeais.</p>