

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

**NEOPLASIAS DO TRATO ALIMENTAR SUPERIOR
DE BOVINOS ASSOCIADAS AO CONSUMO
ESPONTÂNEO DE SAMAMBAIA (*Pteridium aquilinum*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marione de Albuquerque Moreira Souto

**Santa Maria, RS, Brasil
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**NEOPLASIAS DO TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE
BOVINOS ASSOCIADAS AO CONSUMO ESPONTÂNEO DE
SAMAMBAIA (*Pteridium aquilinum*)**

por

Marione de Albuquerque Moreira Souto

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 obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof^a. Glaucia Denise Kommers

Santa Maria, RS, Brasil
2005

**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

**NEOPLASIAS DO TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE BOVINOS ASSOCIADAS
AO CONSUMO ESPONTÂNEO DE SAMAMBAIA (*Pteridium aquilinum*)**

elaborada por
Marione de Albuquerque Moreira Souto

como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Gláucia Denise Kommers, PhD
(Presidente/Orientadora)

Ana Lucia Schild, Dra. (UFPeI)

Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD (UFSM)

Santa Maria, 02 de dezembro de 2005

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Walter e Rogéria, alicerces da minha formação, pelo constante e valioso incentivo aos estudos, e, principalmente, por todo o apoio pessoal e profissional fundamentais à concretização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento mais que especial a Deus, por ter me delegado as forças fundamentais para seguir mais essa jornada, principalmente nos momentos mais difíceis, me fazendo sempre acreditar que “Tudo posso naquele que me fortalece” (Filipenses 4:13).

Aos meus irmãos, Ana Clara e Walter Júnior, por sempre me incentivarem a continuar lutando e se fazerem presentes, principalmente nos momentos em que a saudade mais apertava.

À minha filha, grande benção de Deus em minha vida.

À minha avó materna, Maria José, por todas as orações a mim dedicadas nos momentos mais difíceis dessa luta.

A todos da minha família, em especial a vovó Ione, tia Conceição, tia Cleomar e tio Marcos (*in memoriam*), que contribuíram grandemente para minha formação pessoal.

À minha orientadora e grande amiga, Glaucia Kommers, por todo o apoio, amizade e dedicação intensa a mim dispensados, que foram essenciais não só na elaboração desse trabalho, mas foram principalmente uma grande lição para a vida inteira.

À Prof^a Dominguita Graça, pelos ensinamentos transmitidos e por ser um grande exemplo de mulher, mãe e profissional, que seguirão comigo para toda a vida.

Ao Prof^o Claudio Barros, pelo exemplo de entusiasmo como patologista e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses dois anos de mestrado.

Ao Prof^o Luiz Francisco Irigoyen, por todos os ensinamentos transmitidos durante esse período.

Aos amigos da sala: Aline Viott, Adriano, Brenda e Eduardo, com os quais dividimos inúmeros momentos de estudo e descontração. Agradeço principalmente a Aline e ao Adriano pelo auxílio precioso durante a formatação dessa dissertação.

Ao Médico Veterinário José Vitor Piazer, pela grande colaboração à realização desse estudo.

Às pós-graduandas Raquel Rech e Tatiana Souza pela contribuição na documentação fotográfica desse trabalho.

Aos colegas que fazem (ou fizeram) parte do LPV: Ricardo, Márcia, Aline Rodrigues, Fighera, Daniel, Felipe, Fabiano, Simone, Margarida, e Didier, com os quais vivenciamos vários momentos “patológicos” que ficarão guardados na memória.

Aos técnicos Sérgio Perez e Sérgio Augusto, pela preparação das lâminas histológicas desse estudo.

Ao apoio técnico da Andréia Inkellman, pela confecção de cortes histológicos e pela realização da técnica de imuno-histoquímica.

Aos meus “primeiros mestres patológicos”, Franklin Riet-Correa e Ivon Tabosa, por terem acreditado no meu desejo de continuar a estudar Patologia e pelo incentivo constante a chegar até aqui.

À Dra. Ana Lúcia Schild, por ter estabelecido uma “ponte” entre a minha graduação na Paraíba e a realização do mestrado na UFSM.

E aos meus companheiros “jaguarienses” de apartamento: Andressa, Mileni e Alex, por termos compartilhado vários momentos juntos que se eternizarão em nossa memória.

RESUMO

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

NEOPLASIAS DO TRATO ALIMENTAR SUPERIOR EM BOVINOS ASSOCIADAS AO CONSUMO ESPONTÂNEO DE SAMAMBAIA (*Pteridium aquilinum*)

AUTOR: MARIONE DE ALBUQUERQUE MOREIRA SOUTO

ORIENTADORA: GLAUCIA DENISE KOMMERS

Data e local da defesa: Santa Maria, 02 de dezembro de 2005

Foram estudados 30 bovinos com neoplasias no trato alimentar superior (TAS) associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*) provenientes de 27 propriedades rurais, sendo 23 no município de Jaguari e quatro em Nova Esperança de Sul, Rio Grande do Sul. A população bovina total das 27 propriedades em que ocorreram os casos era de 1.090 bovinos e havia quantidade abundante de samambaia nas áreas de pastoreio dos animais. Vinte e seis bovinos eram vacas e quatro eram machos castrados. A idade variou de três a 13 anos, sendo o maior número de casos entre sete e oito anos (46,6%). Os sinais clínicos observados incluíram emagrecimento progressivo, atonia ruminal, tosse, disfagia, regurgitação, halitose, diarreia e timpanismo. Outros sinais clínicos menos frequentes foram apetite seletivo, dispnéia e salivação. Dois bovinos tiveram morte espontânea e 28 foram submetidos à eutanásia *in extremis* e necropsiados. Os principais achados macroscópicos e histológicos observados nos 30 bovinos localizavam-se nos mesmos locais do TAS e consistiam de papilomas, papilomas em transformação para carcinomas de células escamosas (CCEs) e CCEs. Vinte e nove bovinos tinham papilomas de diversos tamanhos, sendo a quantidade variável entre leve (45%), moderada (38%) e acentuada (17%). Nos papilomas examinados microscopicamente, foram observadas três fases de desenvolvimento: a) fase inicial de crescimento; b) fase de desenvolvimento; e c) fase de regressão; essa última era caracterizada por infiltrados linfocitários nos eixos fibrovasculares de sustentação. Em 16 bovinos, o exame histológico de lesões macroscópicas compatíveis com papilomas, porém alguns deles apresentando-se mais arredondados, com projeções digitiformes atenuadas ou ulceradas, revelou a transformação maligna desses papilomas em CCEs. Os CCEs eram únicos (12/30) ou múltiplos (18/30) e variaram quanto ao grau de diferenciação celular entre bem diferenciados, moderadamente diferenciados ou pouco diferenciados. Quando a distribuição dos CCEs de maior extensão foi agrupada em regiões cranial (base da língua, faringe/orofaringe, epiglote), média (terços cranial, médio e caudal do esôfago) e caudal (entrada do rúmen e rúmen) do TAS, observou-se que a localização era cranial em 39% dos casos, média em 16%, e caudal em 45%. Utilizando-se esse mesmo critério de agrupamento, porém considerando o número total de vezes em que CCEs (de extensões variadas) foram diagnosticados nas regiões cranial, média e caudal, os números alteraram-se para 34%, 26% e 40%, respectivamente. Metástases de CCEs para linfonodos regionais e outros órgãos como fígado e pulmão foram observadas em 18/30 bovinos. A técnica de imunoistoquímica para citoqueratina foi realizada em cortes selecionados de CCEs e metástases, observando-se células fortemente positivas nos CCEs bem e moderadamente diferenciados, e fraca imunomarcagem nos pouco diferenciados. As evidências epidemiológicas e histomorfológicas relatadas neste estudo reforçam as observações de uma estreita correlação entre a infecção pelo papilomavírus bovino tipo 4, causador da papilomatose digestiva, e a co-carcinogênese química dos princípios tóxicos da samambaia na patogênese dos CCEs do TAS de bovinos.

Palavras-chave: *Pteridium aquilinum*, papiloma, carcinoma de células escamosas, papilomavírus bovino tipo 4, BPV-4, doenças de bovinos, patologia veterinária.

ABSTRACT

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

NEOPLASMS OF THE UPPER DIGESTIVE TRACT OF CATTLE ASSOCIATED TO SPONTANEOUS INTAKE OF BRACKEN FERN (*Pteridium aquilinum*)

AUTHOR: MARIONE DE ALBUQUERQUE MOREIRA SOUTO
ADVISER: GLAUCIA DENISE KOMMERS
Santa Maria, December 02, 2005

Thirty bovine with neoplasms of the upper digestive tract (UDT) associated to the spontaneous consumption of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) were studied. They were from 27 farms, localized in the municipalities of Jaguari (23) and Nova Esperança do Sul (4), Rio Grande do Sul, Brazil. The total bovine population in those farms was 1,090 and large amounts of bracken fern were found in the pastures. Twenty-six were cows e four were castrated males. The age ranged from 3 to 13-years-old. Most of them were 7 to 8-years-old (46,6%). Clinical signs observed in the affected animals were progressive weight loss, absence of ruminal movements, cough, dysphagia, regurgitation, halitosis, diarrhea, and bloat. Less frequent signs were selective appetite, dyspnea, and salivation. Two bovines died and 28 were euthanatized *in extremis* and submitted to necropsy. The main gross and microscopic findings were found in the same areas of the UDT. They were digestive papillomatosis, transforming papillomas, and squamous cell carcinomas (SCC). Twenty-nine bovines had papillomas of various sizes in several areas of the UDT. The digestive papillomatosis ranged from mild (45%), to moderate (38%), to severe (17%). Three developing phases were observed microscopically in the examined papillomas: an early growing phase, a developing phase, and a regressing phase. The regressing phase was characterized by lymphocytic infiltrates at the base of the papilloma. In 16 cases, the microscopic examination of lesions grossly resembling papillomas (although some were slightly round, with lower or ulcerated finger-like projections) revealed malignant transformation of the papillomas into SCCs. The SCCs were solitary (12/30) or multiple (18/30) and were histologically characterized as well, moderately, or poorly differentiated. Grouping the distribution of SCCs of larger extension in the UDT into cranial region (base of the tongue, pharynx/oropharynx, and epiglottis), medial region (esophagus), and caudal region (cardia and rumen), the distribution was cranial in 39%, middle in 16%, and caudal in 45% of the cases. By the same grouping criteria, but considering the total number of times SCCs of varied extensions were diagnosed in the cranial, middle, and caudal regions, the percentages changed to 34%, 26%, and 40%, respectively. Metastases to regional lymph nodes and other organs, like liver and lungs, were observed in 18 cases. Immunohistochemistry for cytokeratin was performed in selected sections of SCCs and metastases, showing strong positive reaction in the well and moderately differentiated SCCs, but weak positive reaction in the poorly differentiated ones. The epidemiological and histomorphological evidences showed in this study are in agreement with the observations that point out the co-carcinogenesis between bovine papillomavirus type 4 infection and chemicals of bracken fern in the pathogenesis of the SCCs in the UDT of cattle.

Key-words: *Pteridium aquilinum*, papilloma, squamous cell carcinoma, bovine papillomavirus type 4, BPV-4, cattle diseases, veterinary pathology.

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – Representação diagramática da natureza multifatorial da progressão neoplásica dos papilomas do trato alimentar superior. Fonte: traduzido de Campo (2002).....	32
--	----

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Critérios para classificação do grau de diferenciação dos carcinomas de células escamosas..... 40
- TABELA 2 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Dados de resenha dos 30 bovinos e localização das propriedades..... 44
- TABELA 3 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Questionário epidemiológico sobre a ocorrência de carcinomas de células escamosas no trato alimentar superior de bovinos em 27 propriedades..... 47
- TABELA 4 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Classificação das categorias dos bovinos por propriedade..... 49
- TABELA 5 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Sinais clínicos em 30 bovinos intoxicados..... 51
- TABELA 6 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Correlação entre a distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior e os sinais clínicos observados em 30 bovinos (numerados de 1-30)..... 52
- TABELA 7 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos papilomas e dos papilomas em transformação para carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior

de 29 bovinos baseada nos exames macroscópicos e
histológicos..... 54

TABELA 8 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior e metástases observados de 30 bovinos baseada nos exames macroscópico e histológico..... 57

TABELA 9 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Grau de diferenciação celular dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior de 30 bovinos..... 60

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino controle. Região cranial do trato alimentar superior: a) base da língua; b) orofaringe; c) faringe; e d) epiglote..... 42
- FIGURA 2. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 4. Esôfago médio. Os retângulos identificados por letras minúsculas exemplificam os locais onde foram efetuadas seções histológicas para identificação das lesões (encaminhamento dirigido)..... 42
- FIGURA 3. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A e B. Espécimens de samambaia (*Pteridium aquilinum*) na propriedade W, na localidade de Chapadão, município de Jaguari, RS, em 21/12/2004..... 63
- FIGURA 4. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A e B. Vistas da localidade de Chapadão, município de Jaguari, RS, onde localizam-se três propriedades (A, G e W) de origem de bovinos intoxicados por samambaia, em 21/12/2004 65
- FIGURA 5. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Emagrecimento acentuado. A. Bovino 3. B. Bovino 6..... 67
- FIGURA 6. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 10. Tosse e distensão do pescoço..... 69

FIGURA 7. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). Bovino 13. Regurgitação do conteúdo alimentar.....	69
FIGURA 8. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). Timpanismo acentuado. A. Bovino 14. B. Bovino 19.....	71
FIGURA 9. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). Salivação intensa. A. Bovino 10. B. Bovino 3.....	73
FIGURA 10. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). 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.....	75
FIGURA 11. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). Papilomas na faringe. A. Bovino 24. Papiloma pedunculado. B. Bovino 26. Papilomas sésseis.....	77
FIGURA 12. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). 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.....	79
FIGURA 13. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>). Papilomatose acentuada na região cranial do trato alimentar superior. A. Bovino 4. B. Bovino 24.....	81

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..... 83

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..... 85

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)..... 87

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 89

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..... 91

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..... 93

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..... 95

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..... 97

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..... 99

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..... 101

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..... 103

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 infiltrando a parede ruminal..... 105

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..... 107

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..... 109

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..... 111

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..... 113

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..... 115

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..... 117

FIGURA 32. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Imunomarcação para pancitoqueratina bovina. A. Bovino 1. Linfonodo ruminal. Queratinócitos neoplásicos fortemente positivos para citoqueratina (200x). B. Magnificação de A (400x). IHQ, LSAB – peroxidase, contracoloração pela hematoxilina..... 119

LISTA DE MAPAS

MAPA 1 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Localização aproximada das 27 propriedades (A-Z) de origem dos 30 bovinos intoxicados por samambaia nos municípios de Jaguari e Nova Esperança do Sul, RS. A propriedade Z1 localiza-se fora da área de abrangência do mapa, no município de Nova Esperança do Sul..... 46

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) correlacionando o número total de vezes em que o tumor foi visto em determinado local com o número de CCEs de maior extensão naquele local..... 58
- GRÁFICO 2 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) de maior extensão nas regiões cranial, média e caudal do trato alimentar superior (TAS)..... 59
- GRÁFICO 3 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição do número total de vezes em que os carcinomas de células escamosas (CCEs) foram observados nas regiões cranial, média e caudal do trato alimentar superior (TAS)..... 59

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Protocolo de imunistoquímica (IHQ) para citoqueratina bovina.....	136
APÊNDICE B - Outras alterações macroscópicas e histológicas observadas em 30 bovinos com carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior.....	138

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ESQUEMAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE MAPAS.....	15
LISTA DE GRÁFICOS.....	16
LISTA DE APÊNDICES.....	17
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÃO.....	127
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
7. APÊNDICES.....	135

1. INTRODUÇÃO

A samambaia (*Pteridium aquilinum*) é uma planta perene, rizomatosa, herbácea, muito ramificada, com folhas grandes bi ou tripinadas. Esta planta daninha é comumente encontrada principalmente em solos ácidos e de baixa fertilidade, infestando pastagens, solos cultivados, beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI, 1991).

Um grupo de doenças que acometem animais de fazenda tem como característica epidemiológica comum o fato de ocorrerem em regiões onde as áreas de pastoreio dos animais estão altamente infestadas por samambaia. Essas doenças não são relatadas fora das regiões de ocorrência desta planta. Tem sido também observado que elas não ocorrem com a mesma frequência nas diversas regiões (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 2000). Este grupo de doenças inclui: 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 que incluem neoplasias da bexiga (hematúria enzoótica) e carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) (SMITH et al., 1999; TOKARNIA et al., 2000). Apesar da associação de algumas dessas enfermidades com o consumo de samambaia somente ter sido confirmada em décadas posteriores, os primeiros relatos desta intoxicação parecem reportar-se à década de 50 (BUENO, 1953; PLOWRIGHT, 1955).

A intoxicação crônica por samambaia na forma de CCEs no TAS de bovinos despertou o interesse de pesquisadores britânicos, os quais observaram uma alta incidência desta forma da doença somente em bovinos de corte das terras altas (“Highlands”) da Escócia e associaram este fato à presença abundante de samambaia nas fazendas onde a doença ocorria. Adicionalmente, relataram uma amplificação na papilomatose digestiva de origem viral nos bovinos destas mesmas áreas geográficas, e observaram que muitos papilomas sofriam transformação maligna para CCEs. Estes fatos despertaram a atenção para uma possível interação entre um carcinógeno ambiental (princípios tóxicos da samambaia) e um papilomavírus, posteriormente identificado como papilomavírus bovino do tipo 4 (BPV-4), na carcinogênese dos tumores do TAS de bovinos (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978). *P. aquilinum* possui vários princípios tóxicos os quais atuam como carcinógenos, mutágenos e imunossupressores (CAMPO, 1997; 2002).

Esse tema também tem despertado o interesse de pesquisadores de vários países onde a samambaia é consumida por pessoas (direta ou indiretamente) ou animais, principalmente com

o intuito de desvendar os efeitos diretos dos princípios tóxicos da planta (HIRONO et al., 1972; HIRONO et al., 1973; FENWICK, 1988; ALONSO-AMELOT et al., 1999; FREITAS et al., 1999; RECOUSO et al., 2003) e suas possíveis interações com o BPV-4 (CAMPO et al., 1994; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CAMPO, 1997; ANDERSON et al., 1997; BENISTON et al., 1999).

No Brasil, casos de intoxicação crônica por samambaia sob a forma de CCEs no TAS têm sido descritos e revisados por vários autores (TOKARNIA et al., 1967; DÖBEREINER et al., 1967; CAMPOS NETO et al., 1975; POLACK, 1990; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000; FRANÇA et al., 2002; GAVA et al., 2002), principalmente no que diz respeito à epidemiologia e descrição das lesões. Apesar da grande maioria desses trabalhos relatar a ocorrência simultânea de papilomas e CCEs ao longo do TAS dos bovinos afetados, as evidências morfológicas da co-carcinogenicidade samambaia-BPV-4 não têm sido, ou têm sido superficialmente abordadas nos trabalhos realizados em nosso país.

Na região do município de Jaguari, Rio Grande do Sul, essa forma de intoxicação por samambaia é freqüentemente observada. Os objetivos deste trabalho foram estudar os aspectos epidemiológicos, clínicos, macroscópicos e histológicos de 30 casos de CCEs no TAS de bovinos que consumiram samambaia espontaneamente, diagnosticados no período de setembro/2003 a agosto/2005 no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, com ênfase na descrição e distribuição dos papilomas e dos CCEs e nas evidências histomorfológicas da interação samambaia-papilomavírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Aspectos botânicos e biológicos de *Pteridium aquilinum*

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn (nomes comuns: samambaia; samambaia-do-campo; samambaia-das-taperas; pluma ou pluma-grande), pertence à família Polypodiaceae (LORENZI, 1991; TOKARNIA et al., 2000), é uma planta perene, herbácea, glabra, medindo 50-160 cm de altura, com reprodução por esporos ou por rizomas, com folhas (ou frondes) grandes, bipinadas ou tripinadas. Suas folhas formam touceiras densas ou se estendem ao longo dos rizomas (LORENZI, 1991; TOKARNIA et al., 1979).

O gênero *Pteridium* tem uma única espécie, *P. aquilinum*, compreendendo duas subespécies, *caudatum* e *aquilinum*, que são subdivididas dentro de quatro e oito variedades geográficas, respectivamente (FENWICK, 1988). *P. aquilinum* subesp. *caudatum* var. *arachnoideum* é a única identificada no Brasil (FREITAS et al., 1999; TOKARNIA et al., 2000). *P. aquilinum* é uma planta cosmopolita, presente em todos os continentes, sendo encontrada em capoeiras, matas ciliares, roçados abandonados, campos e pastagens (TOKARNIA et al., 1979). No Brasil, *P. aquilinum* ocorre principalmente em regiões montanhosas, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, porém também é invasora em áreas dos Estados do Amazonas, Acre, Mato Grosso e Pernambuco (TOKARNIA et al., 2000). A samambaia desenvolve-se melhor em regiões frias e de boa pluviosidade, com solos ácidos, arenosos e bem drenados (por ex., encostas de morros), adaptando-se a outros ambientes (GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 1979, TOKARNIA et al., 2000) conforme o estabelecimento de diferentes regimes de pastoreio e cultivo do solo (SMITH, 1999).

2.2 – Princípios tóxicos e intoxicação por *Pteridium aquilinum* em animais e humanos

Os dois princípios tóxicos pelos quais a samambaia atua são um princípio radiomimético, responsável por quadros patológicos observados principalmente em bovinos, e uma tiaminase tipo I, responsável pela doença que ocorre com maior frequência em animais monogástricos (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; FENWICK, 1988). Dentre os

princípios tóxicos isolados da samambaia e revisados por Fenwick (1988), vários não apresentaram evidências suficientes de serem agentes carcinogênicos ou mutagênicos incluindo o ácido chiquímico, ácido fumárico, ácido succínico, catecolaminas, taninos, pterquilina e tilirosídeo. O efeito imunossupressor em bovinos consumindo samambaia talvez seja induzido por pterosinas sesquiterpenas e por pterosídeos presentes na samambaia (EVANS et al., 1982 apud CAMPO, 1997).

Um dos compostos químicos isolados de *P. aquilinum* mais bem estudados é o ptaquilosídeo norsesquiterpeno (inicialmente também denominado aquilídeo A), que exerce comprovadamente as ações mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas (conforme revisões de FENWICK, 1988; SMITH et al., 1999). O ptaquilosídeo é degradado até pterosina B em solução aquosa e na presença de ácidos, bases ou calor (POTTER, 1999). Sob condições ácidas, o ptaquilosídeo produz pterosina B diretamente, porém sob condições alcalinas, uma dienona instável (potencialmente carcinógena-mutágena) é formada, a qual pode sofrer aromatização e liberar pterosina B. A exigência de condições alcalinas para a ativação do ptaquilosídeo ao composto carcinogênico-mutágeno tem o suporte de observações biológicas, sugerindo 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. Adicionalmente, os adenocarcinomas em ratos induzidos pela samambaia ou pelo ptaquilosídeo são preferencialmente encontrados nas regiões mais alcalinas do intestino, correspondendo aos 20 cm terminais (FENWICK, 1988).

O flavonóide quercetina também tem sido implicado como um agente carcinogênico presente na samambaia (PAMUKCU et al., 1980). Por haver controvérsias na literatura, o potencial carcinogênico a “anti-carcinogênico” da quercetina tem sido amplamente revisado. Concluiu-se através dos resultados de vários estudos que a quercetina exibe uma ampla variedade de efeitos biológicos incluindo: a) ações mutagênicas e carcinogênicas em certos sistemas de testes, possivelmente através da formação de oxigênio reativo; e b) em contraste, ação antioxidante, efeitos anti-mutagênicos e a capacidade de inibir a promoção tumoral induzida por vários agentes químicos (conforme revisão de MUSONDA & CHIPMAN, 1999). Entretanto, vários estudos *in vitro* têm demonstrado que a quercetina atua como agente mutagênico em sinergismo com o papilomavírus bovino tipo 4 (BPV-4), promovendo a transformação de células primárias bovinas (BENISTON et al., 1999; CAMPO et al., 1999; BENISTON et al., 2001). A co-carcinogenicidade entre a quercetina e o BPV-4 será abordada detalhadamente na seção de Etiopatogenia desta revisão de literatura.

Relata-se que a atividade carcinogênica da samambaia varia de acordo com a parte da planta examinada (FENWICK, 1988), e também que ela possa ser influenciada pelas condições geográficas e/ou ambientais (HIRONO et al., 1972). Todas as partes da samambaia são consideradas tóxicas (TOKARNIA et al., 2000). Alguns autores consideraram os rizomas como a parte mais tóxica da planta (EVANS et al., 1961; HIRONO et al., 1973). Entretanto, outros afirmam não ter conseguido demonstrar o ptaquilosídeo nos rizomas (SMITH et al., 1999). Com relação às partes aéreas, a toxicidade é maior na brotação (pontas dos brotos e folhas jovens) e decresce progressivamente com a maturação da planta, no que se refere às concentrações de ptaquilosídeo (EVANS, 1970 apud TOKARNIA et al., 2000; SMITH et al., 1999; VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1999). A planta dessecada na forma de feno também é considerada tóxica (TOKARNIA et al., 1979).

Todas as variedades taxonômicas de *P. aquilinum* examinadas continham ptaquilosídeo, porém com alta variação na concentração desse princípio tóxico (SMITH et al., 1999). A altitude afeta as concentrações de ptaquilosídeo das variedades *caudatum* e *arachnoideum*, sendo o efeito da altitude maior na var. *arachnoideum* quando a altitude acima do nível do mar aumentou de 1000 m para 1800 m. O efeito da altitude sobre a var. *caudatum* foi bem menor (VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1999). Altas concentrações de ptaquilosídeo foram associadas com latitudes mais elevadas na Austrália. Os níveis mais elevados de ptaquilosídeo na samambaia foram observados na primavera, diminuindo durante o inverno (SMITH et al., 1999).

A intoxicação por *P. aquilinum* acomete humanos e várias espécies animais. Em humanos, o consumo de toxinas da samambaia pode ocorrer direta ou indiretamente (SMITH et al., 1999; VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1999). A alta incidência de câncer de esôfago em humanos em várias partes do mundo tem sido relacionada ao consumo prolongado de samambaia (ALONSO-AMELOT et al., 1996; ALONSO-AMELOT et al., 1999; MARLIÈRE et al., 1999). No Brasil, particularmente no município de Ouro Preto, Minas Gerais, a samambaia é consumida principalmente por populações pobres na forma de refogados, com carnes ou ainda em chás (MARLIÈRE et al., 1998; BICUDO, 2002). No Japão, parte da população também consome os brotos e rizomas da samambaia como parte da dieta tradicional (HIRONO et al., 1972). Foi observado também, através de experimentos com camundongos e, mais tarde, com quantificação deste composto em humanos, que o ptaquilosídeo poderia exercer sua toxicidade naqueles que consumiam o leite produzido por vacas que ingeriram a planta durante um determinado período de tempo (EVANS et al., 1972; ALONSO-AMELOT et al., 1996). Outros autores correlacionaram a ocorrência do ptaquilosídeo no leite com a alta

incidência de câncer gástrico nas populações de fazendeiros que vivem em áreas na Costa Rica e de outros países da América do Sul em que há grande quantidade de samambaia nas pastagens (ALONSO-AMELOT et al., 1996). Tem sido cogitada também, a possibilidade de ingestão indireta de toxinas através da carne de bovinos que consomem samambaia (SMITH et al., 1999), porém não há estudos específicos nesta área.

Várias síndromes bem definidas em animais de fazenda têm sido associadas ao consumo espontâneo de samambaia. Estas incluem: 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 neoplásicas que incluem neoplasias da bexiga (hematúria enzoótica) e carcinomas de células escamosas no trato alimentar superior (SMITH et al., 1999; TOKARNIA et al., 2000).

Conforme revisão de Tokarnia et al. (2000), a deficiência de tiamina afeta animais monogástricos, principalmente eqüídeos, sendo caracterizada por incoordenação, batimentos cardíacos muito fortes após exercícios e numa fase mais tardia, aparecem tremores musculares seguidos por ataques convulsivos, opistótono e morte. Essa forma da intoxicação por samambaia deve-se a presença de uma tiaminase tipo I, enzima que inativa a tiamina. Suínos também adoecem de forma natural e a doença foi reproduzida experimentalmente em eqüinos, ratos, suínos e também em ovinos.

Uma degeneração progressiva do neuroepitélio da retina ocular, doença conhecida como “bright blindness”, foi relatada em ovinos na Inglaterra e reproduzida experimentalmente pela administração oral de *P. aquilinum* durante 63 semanas (TOKARNIA et al., 2000).

Em bovinos, a intoxicação espontânea por samambaia pode ocorrer sob três formas clínicas distintas, dependendo da dose diária da planta ingerida pelo animal e do período de tempo de ingestão, sendo sempre necessárias quantidades elevadas da planta para que ocorram os quadros clínicos (TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000).

A forma aguda ou SHA afeta bovinos jovens e adultos que ingerem quantidades diárias maiores que 10g/kg de peso vivo (10 a 30g/kg) durante semanas a poucos meses. Os principais sinais clínicos são febre, hemorragias na pele e mucosas visíveis e anemia. Os achados de necropsia consistem de hemorragias em todos os órgãos e tecidos. Histologicamente há rarefação do tecido hematopoético na medula óssea. Embora os ovinos sejam mais resistentes, a SHA também tem sido relatada em casos espontâneos e reproduzida experimentalmente nessa espécie (TOKARNIA et al., 2000).

Há duas formas crônicas da intoxicação por samambaia. A hematúria enzoótica bovina (HEB) afeta bovinos com idade a partir de dois anos, que ingerem quantidades menores que 10g/kg de peso vivo por dia da planta durante um ou mais anos. O principal sinal clínico é a hematúria intermitente ou crônica. Os achados de necropsia revelam tumores na bexiga que se caracterizam histologicamente por neoplasias de histogênese variada como hemangiomas, hemangiossarcomas, carcinomas de células escamosas, entre outros (TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000; PEIXOTO et al., 2003). Esta forma de intoxicação também tem sido menos freqüentemente relatada em ovinos nas formas espontânea e experimental (TOKARNIA et al., 2000).

A outra forma da intoxicação crônica por samambaia, a ocorrência de carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS), afeta bovinos pastoreando em áreas altamente infestadas por samambaia. Acredita-se que as quantidades diárias de samambaia necessárias para que ocorra essa forma da intoxicação sejam ainda menores do que aquelas necessárias para causar o quadro de HEB, sendo que a ingestão da planta ocorreria durante um período de tempo mais prolongado (TOKARNIA et al., 2000). As seções que se seguem desta revisão de literatura, referem-se somente a esta última forma de intoxicação por samambaia, que é o tema desta dissertação.

2.2.1 – Epidemiologia

A ocorrência de neoplasias no TAS em bovinos foi associada ao pastoreio de samambaia no Brasil (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; CAMPOS NETO et al., 1975), e na Grã-Bretanha (PIRIE, 1973; JARRETT et al., 1978). No Brasil os registros mais detalhados da intoxicação por samambaia são da década de 60, onde pesquisadores verificaram que existia uma alta incidência de CCEs do trato alimentar superior de bovinos que viviam em regiões onde os pastos eram severamente invadidos por *P. aquilinum*, e que tumores com essa localização anatômica eram raros em áreas onde essa planta não existia (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969).

Algumas condições são necessárias para que ocorra a intoxicação por samambaia em bovinos. A fome é o principal fator que leva os animais a ingerir a planta e está relacionada à escassez de alimento devido a fatores como a superlotação ou períodos de seca. Tem sido sugerido que o vício também pode condicionar a ingestão visto que, após consumir a planta durante certo período de tempo, os bovinos desenvolvem o hábito de ingeri-la mesmo havendo

disponibilidade de alimento. A ingestão de feno contaminado ou de cama contendo a planta e a necessidade de ingestão de fibra podem contribuir para a ocorrência da intoxicação (GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000). A intoxicação também tem sido observada em animais consumindo os rizomas expostos após a aração (TOKARNIA et al., 2000). O consumo da brotação da samambaia após os períodos de inverno, em que a pastagem é pobre tem sido mais relacionado com a ocorrência da forma aguda da doença (GAVA, 1993), mas possivelmente contribua para a ocorrência das demais formas da intoxicação.

Os CCEs no TAS de bovinos são considerados como a principal causa de mortes relacionadas ao consumo de samambaia no Estado de Santa Catarina. Nesse Estado, a doença tem sido observada o ano todo, com morbidade ao redor de 3% e letalidade de 100% (GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000).

Os bovinos afetados geralmente têm idade mais avançada, superior a cinco ou seis anos (GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000), com maior número de casos entre sete e oito anos (GAVA, 1993). Numa revisão de 103 casos de bovinos com CCEs no TAS diagnosticados em Santa Catarina, 7% tinham menos de quatro anos, 22% tinham entre quatro e cinco anos, 38% entre cinco e sete anos, 20% entre sete e nove anos, e 13% tinham mais de nove anos (GAVA et al., 2002).

2.2.2 – Etiopatogenia

Para um melhor entendimento sobre a patogenia da intoxicação por samambaia sob a forma de CCEs no TAS de bovinos, faz-se necessário relacionar alguns fatos que ilustram a seqüência de descobertas e teorias sobre a(s) sua(s) etiologia(s). Antes mesmo de ser estabelecida a etiologia desta doença, relatos de evidências morfológicas apontavam para uma correlação entre papilomatose digestiva e CCE no TAS.

Em um dos primeiros relatos da doença no Brasil (BUENO, 1953), foi observada a ocorrência de papilomatose da faringe, base da língua e epiglote de bovinos onde estes papilomas freqüentemente se transformavam em carcinomas. O autor associou essa malignização com agressões mecânicas e traumáticas aos papilomas e suspeitou da origem viral dos mesmos. Outro relato (PLOWRIGHT, 1955) descreveu casos de CCEs esofágico e ruminal associados à papilomatose oral e esofágica em bovinos no Quênia. A presença simultânea de papilomas e CCEs nos mesmo locais do TAS sugeriu que os papilomas

representassem um estágio de desenvolvimento dos CCEs. Foi também sugerida a presença de agentes carcinogênicos na vegetação.

Vários trabalhos revisados por Döbereiner et al., (1966), associaram a ocorrência de HEB com o consumo de *P. aquilinum* e essas evidências foram confirmadas pela reprodução experimental da HEB através do consumo da planta (ROSEMBERGER & HEESCHEN, 1960 apud DÖBEREINER et al., 1966). Paralelamente, a ocorrência de CCEs no TAS de bovinos também foi associada à característica comum de pastoreio somente em campos infestados por *P. aquilinum* (DÖBEREINER et al., 1967; PLOWRIGHT et al., 1971; PIRIE, 1973).

Na seqüência, foram apresentadas evidências epidemiológicas demonstrando que a alta incidência de CCEs alimentares em bovinos nas terras altas (“Western Highlands”) da Escócia estava associada com a presença de samambaia nas fazendas mais atingidas, e que muitos dos CCEs se originavam de papilomas pré-existentes induzidos por vírus. A etiologia viral dos papilomas alimentares foi confirmada pela demonstração de grandes corpúsculos de inclusão intranucleares em queratinócitos e pela evidenciação de partículas virais na microscopia eletrônica (JARRETT, 1978). Tornou-se evidente a possível interação entre um carcinógeno do meio ambiente (75% das fazendas eram infestadas por samambaia) e um papilomavírus, devido à observação de uma marcada concordância da localização anatômica dos CCEs e papilomas. Foi também observada uma acentuada amplificação no número de papilomas, o qual precedia o aparecimento dos CCEs, e havia evidências morfológicas indiscutíveis da transformação de papilomas em CCEs no TAS (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978). Foi demonstrado através de estudo experimental que a ingestão prolongada de samambaia pelos bovinos deprime o mecanismo de regressão espontânea dos papilomas permitindo que os mesmos permaneçam no TAS por vários anos (JARRETT, 1985).

Papilomatose ou CCEs no TAS não foram observados fora das áreas geográficas estritamente definidas como de alta infestação por samambaia na Escócia. Após examinada a cavidade oral e o esôfago de mais de 10.000 bovinos originários de todo tipo de fazenda e de região daquele país, os autores concluíram que 20% dos bovinos tinham papilomas, geralmente restritos a um papiloma por bovino. Raros animais tinham centenas de papilomas na boca, língua, faringe e esôfago. Por outro lado, nas fazendas com alta incidência de CCE alimentar em bovinos geralmente acima de sete anos, muitos animais tinham múltiplos papilomas desde jovens (JARRETT, 1985).

Estudos subseqüentes reuniram as evidências circunstanciais, morfológicas e moleculares da provável co-carcinogenicidade entre os princípios químicos da samambaia e a infecção por um papilomavírus (CAMPO et al., 1980; JARRETT, 1980; CAMPO et al., 1985).

Em um estudo preliminar, foi relatada a presença de uma seqüência de genoma viral, porém sem produção de partículas virais nas células de CCEs (CAMPO et al., 1980). Entretanto, em trabalho posterior publicado pelo mesmo grupo de pesquisa, ficou esclarecido que o genoma viral do papilomavírus bovinos tipo 4 (BPV-4) foi detectado somente em um papiloma em transformação para CCE no esôfago e em um CCE da língua, após analisar 70 casos espontâneos de CCEs no TAS através da técnica de hibridização por *Southern blot*. A ausência de DNA viral nas células do CCE foi também confirmada por hibridização *in situ*. Nesse mesmo estudo, o DNA do BPV-4 foi detectado em 91% dos papilomas (61/67 casos) através da técnica de hibridização por *Southern blot* (CAMPO et al., 1985). Esta técnica é considerada como o “padrão-ouro” para detecção do genoma viral dos papilomavírus, sendo capaz de detectar uma cópia de DNA viral por célula na amostra controle (CAMPO et al., 1994; WOSIACKI, 2002). Uma tentativa de detectar o DNA viral através da reação em cadeia de polimerase (PCR) em um CCE originado de um papiloma viral induzido por BPV-4 em camundongo “nude” foi negativa (GAUKROGER et al., 1991).

Os autores concluíram que, embora o BPV-4 seja sem dúvidas o agente etiológico da papilomatose digestiva bovina, a presença do DNA viral não é necessária para a progressão ou para a manutenção do estado transformado, ou seja, para a malignização dos queratinócitos (CAMPO et al., 1985). Explicação coerente para a ausência de DNA viral nos CCEs alimentares é a de que o papel do BPV-4 na carcinogênese estaria confinado aos primeiros estágios de transformação celular, e que 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).

É importante salientar que, em outros sistemas papiloma-carcinoma, como em pessoas infectadas com papilomavírus humano (HPV), o DNA viral pode persistir através da fase de progressão maligna e é freqüentemente encontrado nos carcinomas completamente transformados (CAMPO et al., 1985; DAS et al., 1993; SHOW-LI et al., 1993; LANCASTER, 1993).

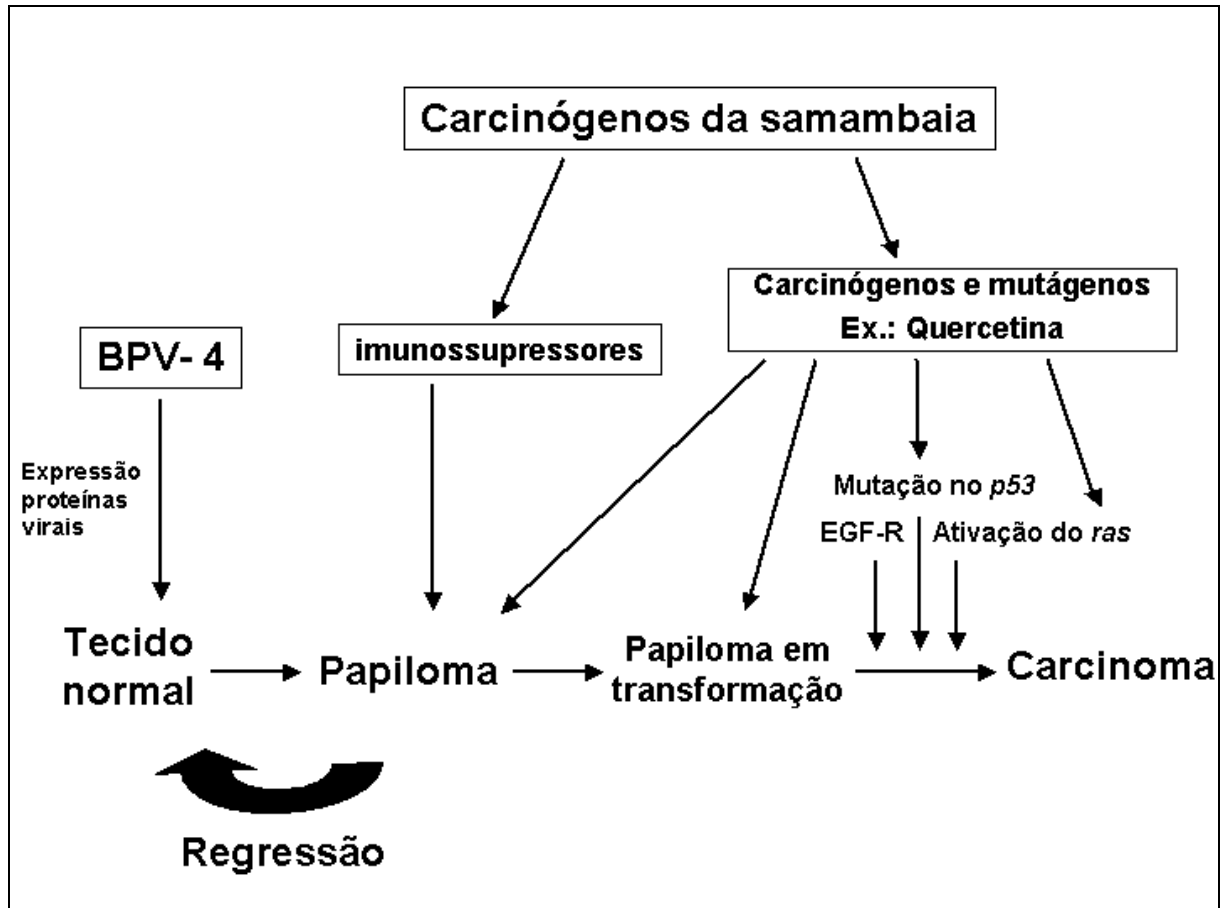
Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* contribuíram para esclarecer alguns aspectos da etiopatogenia complexa dos CCEs no TAS dos bovinos (CAMPO, 1997; 2002). Em experimentos com bovinos, observou-se que os animais ficavam cronicamente imunodeprimidos quando alimentados com samambaia, mas permaneciam imunocompetentes quando recebiam somente quercetina. Bovinos imunocompetentes infectados com BPV-4 desenvolveram papilomas no TAS em aproximadamente seis semanas, os quais regrediram espontaneamente dentro de um ano. Bovinos imunodeprimidos experimentalmente pela

samambaia e infectados com BPV-4 tiveram massiva papilomatose digestiva (semelhante aos casos a campo), sem ocorrência de regressão espontânea dos papilomas. Disseminação e persistência dos papilomas não ocorreram em bovinos imunocompetentes tratados somente com quercetina. Não houve também progressão maligna dos papilomas nestes casos, provavelmente porque os bovinos eram imunocompetentes eliminando qualquer célula transformada (maligna) através de mecanismos de imunovigilância, confirmando assim a necessidade de imunossupressão concomitante (CAMPO et al., 1994).

O sinergismo entre a infecção por BPV-4 e a exposição à quercetina na transformação celular foi estabelecido em estudos *in vitro* (PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CONNOLLY et al., 1998; BENISTON et al., 1999; BENISTON et al., 2001). O BPV-4 transforma as células primárias bovinas somente na presença do gene *ras* ativado. As células transformadas pelo BPV-4 são capazes de crescimento independente de ancoragem, mas não são imortais e são incapazes de induzir carcinomas em camundongos “nude” (JAGGAR et al., 1990), sugerindo que outros eventos sejam necessários para converter as células ao fenótipo completamente transformado. O tratamento dessas células com uma única dose de quercetina levou à completa transformação oncogênica das células transfectadas com BPV-4 (e com o gene *ras*), indicando a quercetina como um provável co-carcinógeno *in vivo*, o qual sinergisa com o BPV-4 para a progressão celular maligna (PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CONNOLLY et al., 1998). Foi também observado que o sinergismo quercetina – BPV-4 (oncogene *E7*) é mais forte quanto mais curto o intervalo entre os dois tratamentos (CAIRNEY & CAMPO, 1995). O BPV-4 não possui o gene *E6* (JACKSON et al., 1991), o que provavelmente o impede de malignizar sozinho as células primárias bovinas. O gene *E6* codifica uma proteína que se liga e degrada a proteína p53, contribuindo grandemente para a transformação celular maligna observada na infecção pelo HPV-16 em humanos (PENNIE et al., 1993).

Estudos epidemiológicos e moleculares permitiram determinar a provável seqüência de eventos durante a carcinogênese no TAS de bovinos (Esquema 1). Resumindo, o BPV-4 infecta a mucosa do TAS expressando suas proteínas transformantes e induzindo à formação de papilomas, que são lesões benignas proliferativas. Em bovinos saudáveis e imunocompetentes, os papilomas regridem geralmente dentro de um ano devido a uma resposta imune mediada por células. Entretanto, em bovinos consumindo samambaia, o sistema imune encontra-se cronicamente deprimido pelos agentes imunossupressores presentes na planta, não havendo resposta imune efetiva contra o BPV-4 ou contra as células por ele infectadas. Conseqüentemente, os papilomas disseminam-se representando um amplo

alvo para os carcinógenos químicos da samambaia. Os queratinócitos do papiloma em rápida divisão invadem as camadas teciduais subjacentes iniciando a transformação completa para



ESQUEMA 2 – Representação diagramática da natureza multifatorial da progressão neoplásica dos papilomas do trato alimentar superior. Fonte: traduzido de Campo (2002).

CCE (CAMPO, 2002). Apesar de haver evidências morfológicas irrefutáveis da transformação direta dos papilomas em CCEs, foi impossível afirmar em bases histológicas se cada CCE originou-se de um papiloma pré-existente ou também da transformação maligna simultânea do epitélio previamente normal devido à natureza destrutiva das lesões malignas (JARRETT et al., 1978; JARRETT, 1980).

Durante o processo de carcinogênese, o número de receptores teciduais para o fator de crescimento epidérmico (EGF) aumenta, o gene *ras* é ativado e o gene *p53* sofre mutações. Esses eventos de transformação são provavelmente devidos aos agentes químicos da samambaia, e embora esses fatos tenham sido comprovados *in vitro*, eles ainda devem ser mais amplamente estabelecidos *in vivo* (CAMPO, 2002).

2.2.3 – Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados nos bovinos com neoplasias no TAS devido ao consumo espontâneo de samambaia são tosse, regurgitação frequente de alimentos, timpanismo, diarreia e emagrecimento progressivo que evolui até a morte (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; POLACK, 1990; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000). Outros sinais clínicos descritos são halitose (odor pútrido do ar expirado) e disfagia. A dificuldade na deglutição é, muitas vezes, acompanhada pelo pescoço distendido. Papilomas podem ser muitas vezes observados ao exame clínico nas regiões craniais do TAS de bovinos com CCE alimentar (JARRETT, 1978; TOKARNIA et al., 2000). Ocasionalmente são descritos dispnéia, estertores (POLACK, 1990), febre e aumento de volume dos linfonodos submandibulares e/ou pré-escapulares (GAVA, 1993).

Nos primeiros estudos detalhados sobre esta doença no Brasil, foi relatada a ocorrência de duas formas clínicas distintas caracterizadas por tumores no TAS de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia. Essas doenças foram, na época, separadas de acordo com os sinais clínicos que produziam: a) doença caracterizada por “ronqueira” e dificuldade de deglutição, a qual estava relacionada com a presença de CCE na faringe; e b) doença caracterizada por regurgitação de alimentos e timpanismo crônico, relacionada com a presença de CCE no esôfago. Também foi relatado que, em bovinos nos quais havia coexistência das lesões, a lesão mais acentuada seria a responsável pela maioria dos sinais clínicos observados (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969).

Associa-se à presença do tumor, a ocorrência de graves distúrbios de ordem mecânica na ingestão (apreensão e deglutição) e ruminação dos alimentos (TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000), justificando assim o fato de a tosse ser mais frequentemente observada em bovinos com CCEs na base da língua ou faringe, enquanto que a regurgitação de alimento é mais frequente quando o CCE localiza-se no esôfago (TOKARNIA et al., 2000).

A regurgitação do conteúdo ruminal pela boca ou cavidades nasais nos ruminantes é considerada um evento excepcional e está mais associada com perda do tônus ou inflamação do cárdia, podendo ocorrer também em todas as doenças que causam disfagia ou paralisia da deglutição. Quando ocorre obstrução da faringe, esta é sempre acompanhada por estertores respiratórios, tosse e dificuldades na deglutição, que ocorrem por obstrução intermitente da passagem do ar expirado e dos alimentos, como nos casos de linfadenopatia ou presença de pólipos fibrosos e pediculares, os quais causam tração durante a deglutição. A obstrução

esofágica se caracteriza clinicamente por incapacidade física na deglutição, regurgitação de alimentos e água ou sialorréia contínua, impedindo a eructação e resultando em timpanismo por acúmulo de gases livres. Algumas causas menos comuns de timpanismo obstrutivo são estenose do esôfago e obstrução do cárdia, que podem ocorrer devido à presença de carcinomas e papilomas nesses locais (RADOSTITS et al., 2003).

A evolução clínica desta forma de intoxicação por samambaia é crônica, levando meses a anos e sempre culminando com a morte dos bovinos afetados (TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000). O longo curso clínico deve-se provavelmente ao fato de que esses bovinos têm que consumir pequenas quantidades da planta, menores ainda que aquelas que causam o quadro de HEB, durante tempo mais prolongado (TOKARNIA et al., 2000).

2.2.4 – Achados macroscópicos e histológicos

Os achados de necropsia correspondem a papilomas e CCEs, na maioria das vezes em associação, ao longo do TAS (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978; POLACK, 1990; SOUZA & GRAÇA, 1993; TOKARNIA et al., 2000). Em estudos realizados na Escócia, foi relatada também a presença constante de papilomas com áreas de transformação maligna (em transformação para CCE) nos mesmos locais do TAS onde havia papilomas com morfologia característica e CCEs (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978).

Papilomas do TAS de bovinos, são observados em qualquer localização entre a boca e o rúmen. Macroscopicamente medem entre 1 e 10 mm, podendo chegar entre 20 e 30 mm na orofaringe. Os papilomas menores (jovens) tendem a ser sésseis, achatados, brancos e com superfície irregular. Os maiores são pedunculados e marrom-esbranquiçados. Um aspecto digitiforme pode ser visto na superfície de corte (HEAD et al., 2002).

A histologia dos papilomas revela proliferação digitiforme irregular do epitélio com queratinização superficial variável dos tipos ortoqueratótica e paraqueratótica, sendo essa proliferação suportada por centros fibrosos estreitos. Poucas mitoses são vistas na camada basal (HEAD et al., 2002). Nas camadas logo abaixo da camada córnea, alguns corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser encontrados, tendo sido observados em cerca de 13% dos papilomas de bovinos de abatedouro (JARRETT et al., 1978). Queratinócitos infectados, chamados “células do papiloma” (JARRETT et al., 1978) ou coilócitos (do inglês “koilocytes”), têm sido descritos (HEAD et al., 2002). Esses queratinócitos são

freqüentemente observados logo abaixo da camada córnea, caracterizando-se por núcleos picnóticos e excêntricos circundados por um halo claro perinuclear (HEAD et al., 2002). Infiltrados multifocais linfocitários na lâmina própria da base dos papilomas são freqüentemente vistos nos papilomas em fase de regressão (KNOWLES et al., 1996).

Papilomas com morfologia característica foram observados em 96% de 80 bovinos com CCEs e estavam localizados estritamente nos mesmos locais do TAS (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978). Em 76% dos bovinos, havia papilomas em múltiplos locais, 85% tinham mais de 5 papilomas e 40% tinham mais de 15, sendo comum encontrar mais de 30 papilomas em um único caso. Uma marcada amplificação no número de papilomas fica óbvia nos bovinos de áreas com samambaia quando os números são comparados com 7.746 bovinos de matadouro, onde 95% apresentaram papilomas em um local e 5% em dois locais (JARRETT et al., 1978).

Papilomas em transformação (PTs) foram descritos muitas vezes como ulcerados, os quais demonstravam características histológicas de malignidade, ou seja, áreas de transformação maligna do epitélio que se projetavam em direção aos tecidos subjacentes (JARRETT, 1978). Nesses casos, há uma ruptura na membrana basal entre o epitélio e os centros fibrosos das digitações, permitindo a invasão dos tecidos subjacentes pelos queratinócitos malignos (HEAD et al., 2002). Bovinos com CCEs em estágios iniciais, apresentavam PTs com maior freqüência que nos casos mais avançados da doença (JARRETT, 1980). PTs estavam freqüentemente localizados contíguos a CCEs e a papilomas típicos (JARRETT, 1978).

Devido ao aspecto macroscópico dos CCEs, esses tumores foram denominados popularmente como “figueira da goela” ou “favo” quando localizados na faringe, ou ainda de “caraguatá”, pela suposição de que a doença fosse causada pela ingestão das folhas espinhentas do caraguatá (TOKARNIA et al., 1979).

Os CCEs podem ter tamanhos e formas variáveis, podendo ser vegetantes ou produzir depressões na mucosa (SOUZA & GRAÇA, 1993). Freqüentemente apresentam-se sob a forma de massas tumorais amarelo-acinzentadas e infiltrativas, ulceradas ou não, vistas na base da língua, esôfago, cárdia e rúmen (TOKARNIA et al., 2000). Os CCEs da base da língua e faringe geralmente têm ulcerações com material necrótico, retenção de conteúdo alimentar e odor pútrido (GAVA, 1993). Em alguns CCEs do esôfago foram descritos espessamentos da parede com estenose da luz esofágica (PIRIE, 1973; POLACK, 1990) ou lesões ulceradas (POLACK, 1990). À superfície de corte observava-se tecido firme, brancacento, com número

variável de áreas amareladas distribuídas aleatoriamente (GAVA, 1993; SOUZA & GRAÇA, 1993).

Os CCEs podem ter origem única ou frequentemente múltipla (TOKARNIA et al., 1979). Em dois estudos complementares sobre 80 bovinos com 165 CCEs no TAS associados ao consumo espontâneo de samambaia, os carcinomas localizavam-se em cinco locais específicos: a) região dorsolateral da língua; b) palato mole e orofaringe; c) esôfago; d) goteira esofágica; e e) uma área específica do rúmen (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978). Os CCEs ruminais ocorrem principalmente na parede anterior do saco dorsal do rúmen, onde não há papilas distintas, mas alguns deles estão presentes na goteira esofágica e nos pilares (HEAD et al., 2002).

A distribuição dos CCEs no TAS não é constante, tendo sido observados diferentes percentuais de frequência de aparecimento deste tumor em diferentes estudos. Em 80 bovinos na Escócia, os CCEs foram frequentemente encontrados em mais de um local, sendo 7% na língua, 4% no palato, 8% na faringe, 51% no esôfago e 30% no rúmen (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978). No Estado de Santa Catarina, Brasil, em 89 casos de bovinos com CCEs no TAS, 34 estavam localizados na base da língua/faringe, 20 no esôfago, 27 no rúmen, 4 tinham CCE simultaneamente no esôfago e rúmen, em 3 casos os CCEs estavam localizados no esôfago e língua e apenas um tinha CCE no rúmen e língua (GAVA et al., 2002), concordando com a afirmação de que os CCEs são encontrados, na maioria das vezes, na região faringeana e base da língua e, menos frequentemente nas regiões do cárdia e rúmen, e raramente no esôfago (GAVA, 1993).

O exame histológico das neoplasias malignas do TAS revelou características típicas de CCEs, como vistos em outras localizações (DÖBEREINER et al., 1967; JARRETT, 1978; POLACK, 1990; GAVA, 1993; SOUZA & GRAÇA, 1993; TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 2000). Os CCEs são geralmente bem diferenciados, com intensa queratinização, embora nem sempre arranjada sob a forma lamelar concêntrica (pérolas de queratina), e mostram frequentemente denso estroma de tecido conjuntivo, por vezes, acompanhados de acentuado infiltrado inflamatório linfocitário (POLACK, 1990; TOKARNIA et al., 2000) e calcificação da queratina (TOKARNIA et al., 1969). Em alguns CCEs foi observada a intensa presença de infiltrado eosinofílico e nos CCEs ulcerados era marcante a presença de infiltrado neutrofílico associado a colônias bacterianas e a fragmentos de fibras vegetais (POLACK, 1990). Alguns autores tem correlacionado a presença de infiltrados eosinofílicos em CCEs da laringe em humanos com o potencial de invasão tumoral (SAID et al., 2005). Entretanto, outros correlacionaram a maior presença de infiltrados

eosinofílicos nos CCEs com a idade dos pacientes, sendo mais freqüentes em pacientes acima dos 60 anos de idade (ERCAN et al., 2005). Os CCEs alimentares de bovinos são altamente invasivos (HEAD et al., 2002). Nos CCEs caracterizados por espessamento da parede com estenose da luz esofágica, foi marcante a infiltração da muscular e da adventícia pelos queratinócitos neoplásicos (PIRIE, 1973).

Metástases dos CCEs são relatadas em linfonodos regionais, fígado e pulmão, porém não são consideradas freqüentes (TOKARNIA et al., 1969; TOKARNIA et al., 2000). Entretanto, outros autores citam a ocorrência de metástases em 36% (JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978) ou em 20-40% dos casos examinados (HEAD et al., 2002). As metástases são vistas com maior freqüência nos linfonodos retrofaríngeos e raramente na pleura e pulmão (GAVA, 1993). O diagnóstico diferencial (macroscópico) das metástases nos linfonodos inclui actinobacilose e tuberculose (TOKARNIA et al., 1979).

Lesões pequenas e nodulares múltiplas, as quais correspondiam microscopicamente a alterações benignas (adenomas ou pólipos adenomatosos; placas sésseis compostas de epitélio hiper Cromático; ou lesões marcadamente proliferativas na ampola de Vater onde desembocam os ductos pancreático e colédoco) e malignas (adenocarcinomas) foram também relatadas nos intestinos de 56% de 80 bovinos examinados com CCEs no TAS (JARRETT et al., 1978).

A coexistência de lesões neoplásicas no TAS e lesões de hematuria enzoótica na bexiga também tem sido relatada (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; JARRETT et al., 1978; POLACK, 1990; TOKARNIA et al., 2000; FRANÇA et al., 2002), chegando a 30% em 80 bovinos estudados (JARRETT et al., 1978). Num estudo realizado no Rio Grande do Sul com 18 bovinos provenientes de várias regiões, foram observados CCEs no TAS de oito deles, seis apresentaram tumores no TAS e bexiga simultaneamente, e quatro tiveram apenas tumores na bexiga (SOUZA & GRAÇA, 1993).

2.2.5 – Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da intoxicação crônica por samambaia na forma de CCEs no TAS de bovinos é confirmado pela epidemiologia (presença abundante de samambaia nas áreas de pastoreio), sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas (GAVA, 1993).

Conforme revisado por Wosiacki (2002), os diferentes tipos de papilomavírus não podem ser cultivados em sistemas de cultivos celulares de rotina, sendo o diagnóstico baseado na identificação do DNA viral. A eficácia de três dos principais métodos de detecção do

genoma viral do BPV-4 (hibridização por *Southern blot*, hibridização *in situ* e PCR) em papilomas e CCEs foi amplamente revisada na secção de Etiopatogenia desta revisão de literatura.

Partículas virais foram detectadas em papilomas do TAS através da microscopia eletrônica de transmissão (JARRETT, 1978) e as proteínas virais foram detectadas através da técnica de imunistoquímica (IHQ; GAUKROGER et al., 1989; ANDERSON et al., 1997). Em um estudo de IHQ realizado com anticorpos tipo-específicos (anti-BPV-4) para detecção das proteínas E4, E7, E8 e L2 (anticorpos não disponíveis comercialmente), E8 e E4 foram detectadas somente como antígenos citoplasmáticos nas camadas diferenciadas e não diferenciadas dos papilomas, respectivamente. L2 foi detectada somente como antígeno nuclear nas camadas diferenciadas, enquanto E7 estava presente tanto no núcleo quanto no citoplasma, conforme o estágio de diferenciação dos queratinócitos. Estes antígenos virais não foram detectados em papilomas em regressão ou em CCEs do TAS (ANDERSON et al., 1997). Apesar da proteína L1 do BPV-4 mostrar um alto grau de homologia com as proteínas análogas dos outros papilomavírus, o BPV-4 não tem o antígeno (epítipo) gênero-específico comum aos papilomavírus (JENSON et al., 1980). Isto explica a falha de um estudo em detectar a infecção pelo BPV-4 em tumores dos TAS de bovinos intoxicados espontaneamente por samambaia utilizando um anticorpo comercial anti-BPV-1 (marcador do antígeno gênero-específico comum aos papilomavírus). Entretanto, o autor atribuiu a falha na detecção do antígeno viral a possíveis problemas na técnica de IHQ como baixa sensibilidade, pequeno número de amostras testadas, ou influências da técnica de fixação do material (POLACK, 1990).

A IHQ também é utilizada para marcação de linfócitos (CD4+; CD8+) freqüentemente observados nas camadas suprabasais de papilomas (induzidos por BPV-4) em regressão espontânea (KNOWLES et al., 1996).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No período de setembro/2003 a agosto/2005, foram estudados 30 casos de intoxicação crônica por samambaia sob a forma clínica de neoplasias no trato alimentar superior (TAS) de bovinos no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais eram provenientes de 27 propriedades rurais (denominadas de A-Z1) dos municípios de Jaguari (23) e Nova Esperança do Sul (4), Rio Grande do Sul. Da propriedade F foram estudados dois bovinos, e da propriedade H, três bovinos. A localização das propriedades nos dois municípios foi determinada por coordenadas do Sistema de Posicionamento Global (GPS).

Nas propriedades estudadas, foi aplicado um questionário epidemiológico, sendo investigados os seguintes aspectos: a) número de casos da doença no ano em curso; b) número de casos da doença em anos anteriores; c) época do ano de maior ocorrência da doença; e d) ocorrência de outras formas clínicas de intoxicação por samambaia (síndrome hemorrágica aguda e hematúria enzoótica bovina). A população bovina de cada propriedade foi determinada por categorias (vacas, touros, bois, novilhos e bezerros). O número total de propriedades e a população bovina total dos municípios de Jaguari e Nova Esperança do Sul, bem como a confirmação da presença da planta nas propriedades e o tipo de solo da região foram informados por um médico veterinário da Inspeção Veterinária de Jaguari - RS.

Trinta bovinos (identificados por números de 1-30) com sinais clínicos indicativos da presença de neoplasias do TAS foram avaliados clinicamente, através de necropsias e exames histopatológicos. Vinte e um bovinos foram necropsiados por docentes e pós-graduandos do LPV-UFSM. Nove bovinos foram necropsiados pelo médico veterinário local, que aplicou a mesma técnica de necropsia, e o material foi enviado ao LPV para avaliação macroscópica e histopatológica e documentação fotográfica.

Foram coletados fragmentos de tecidos do TAS incluindo palato duro, palato mole, base da língua, epiglote, faringe/orofaringe (Figura 1), esôfago (terços cranial, médio e caudal), entrada do rúmen (cárdia) e rúmen nos quais foram observadas alterações macroscópicas compatíveis com o quadro de intoxicação crônica por *P. aquilinum* (forma clínica de neoplasias no TAS), assim como linfonodos regionais e outros órgãos com possíveis metástases. Em alguns bovinos, observaram-se lesões macroscópicas pouco definidas (se eram alterações hiperplásicas, displásicas ou neoplásicas) no TAS. Nesses casos, procedeu-se um encaminhamento dirigido, identificando-se com letras minúsculas do alfabeto a área exata

onde se localizavam na fotografia da peça e no material encaminhado (Figura 2). A bexiga foi sempre avaliada para verificação da ocorrência simultânea de lesões compatíveis com hematúria enzoótica bovina (HEB). O sistema nervoso central foi examinado como parte da avaliação para o Sistema de Vigilância das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. As amostras foram fixadas em formol a 10% e processadas rotineiramente para histopatologia, com coloração pela hematoxilina-eosina (H&E).

A distribuição dos CCEs nas diferentes regiões do TAS foi determinada de acordo com dois critérios: a) presença de CCE de maior extensão em centímetros; e b) presença de CCE de menores proporções. No estudo histológico, os CCEs encontrados nos diferentes órgãos foram classificados de acordo com o grau de diferenciação celular como: a) bem diferenciados (BD); b) moderadamente diferenciados (MD); ou c) pouco diferenciados (PD). Os critérios utilizados para essa classificação basearam-se nas descrições de McKee (1999) e Head et al. (2002), e estão demonstrados na Tabela 1.

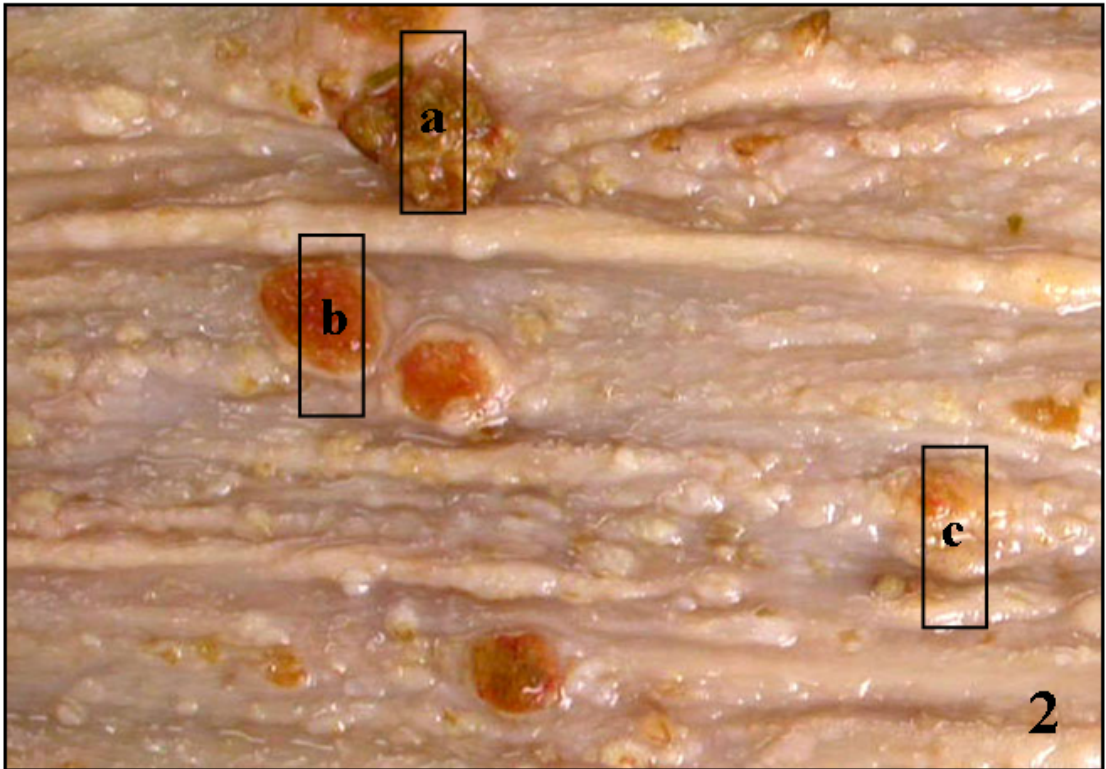
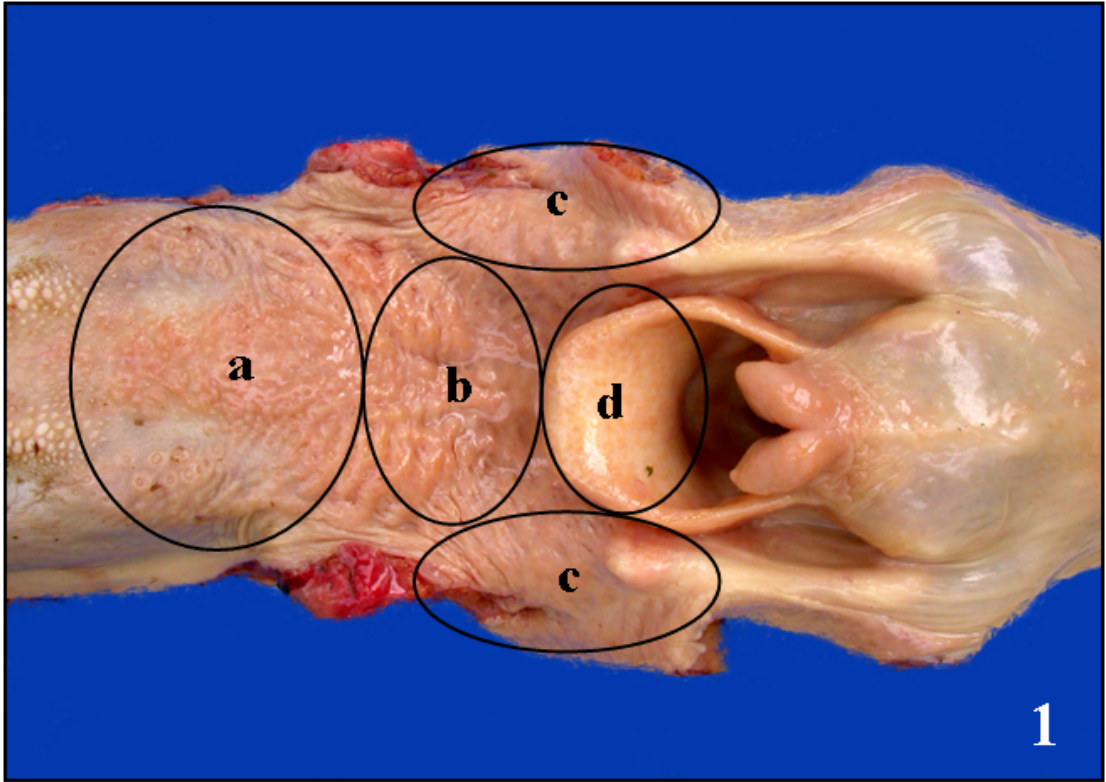
Tabela 1 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Critérios para classificação do grau de diferenciação celular dos carcinomas de células escamosas.

Critérios	Graus de diferenciação		
	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado
Atividade mitótica	Baixa	Moderada	Alta
Pleomorfismo celular	Ausente ou leve	Moderado	Acentuado
Pleomorfismo nuclear	Ausente ou leve	Moderado	Acentuado
Queratinização	Acentuada	Individual ou multifocal	Ausente ou leve

Amostras selecionadas de CCEs de diversos locais do TAS foram fixadas em formol neutro a 10% por 24 a 72 horas e processados rotineiramente para realização da técnica de imunoistoquímica (IHQ). Para imunomarcagem de citoqueratina em queratinócitos neoplásicos foi utilizado o anticorpo primário policlonal anti-(pan)citoqueratina bovina (DakoCytomation – Código Z0622) produzido em coelho. O detalhamento do protocolo de IHQ encontra-se no Apêndice A.

Figura 1. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino controle. Região cranial do trato alimentar superior: a) base da língua; b) orofaringe; c) faringe; e d) epiglote.

Figura 2. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 4. Esôfago médio. Os retângulos identificados por letras minúsculas exemplificam os locais onde foram efetuadas seções histológicas para identificação das lesões.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

4.1.1 Epidemiologia

A localização exata das propriedades nos dois municípios onde foram estudados os 30 bovinos com neoplasias no TAS associados ao consumo de samambaia (Figuras 3A e B) é apresentada na Tabela 2. A localização aproximada das propriedades nas localidades dos dois municípios encontra-se no Mapa 1.

O detalhamento das respostas ao questionário epidemiológico encontra-se na Tabela 3. Das 27 propriedades, 11 já tinham tido entre um e quatro casos de CCEs no TAS de bovinos no mesmo ano em que foi aplicado o questionário. Em quatorze propriedades ocorreram casos de bovinos com CCEs no TAS em anos anteriores. Em oito propriedades a doença foi mais observada na primavera e no verão, porém em duas a maior ocorrência foi no inverno, e em uma propriedade a ocorrência da doença foi durante todo o ano. Seis propriedades tiveram casos de hematúria enzoótica bovina. A ocorrência de síndrome hemorrágica aguda não foi relatada pelos proprietários. A presença abundante de samambaia nas áreas de pastoreio dos bovinos estudados foi relatada pela grande maioria dos proprietários (25/27). Em duas propriedades (Propriedades C e P) onde a planta não foi observada, os bovinos foram adquiridos de propriedades onde a planta era abundantemente encontrada nos campos. Nas 25 propriedades onde a samambaia era observada nas áreas de pastoreio, foi relatada a ocorrência de solos ácidos e arenosos, sendo a planta abundante principalmente nas encostas de morro comuns naquela região (Figuras 4A e B). Foi relatado também pelos proprietários que a samambaia era consumida durante todo o ano, porém o consumo tornava-se mais freqüente em épocas de escassez de alimentos.

A população bovina total nas 27 propriedades no período analisado foi de 1.090 bovinos, sendo a taxa de morbidade para CCEs no TAS de 2,7%. A distribuição por categorias de bovinos em cada uma das propriedades encontra-se na Tabela 4. Deve-se ressaltar que as populações bovinas total e por categorias computadas nas propriedades F e H foram as do último censo. Segundo dados da Inspeção Veterinária de Jaguari, o município de

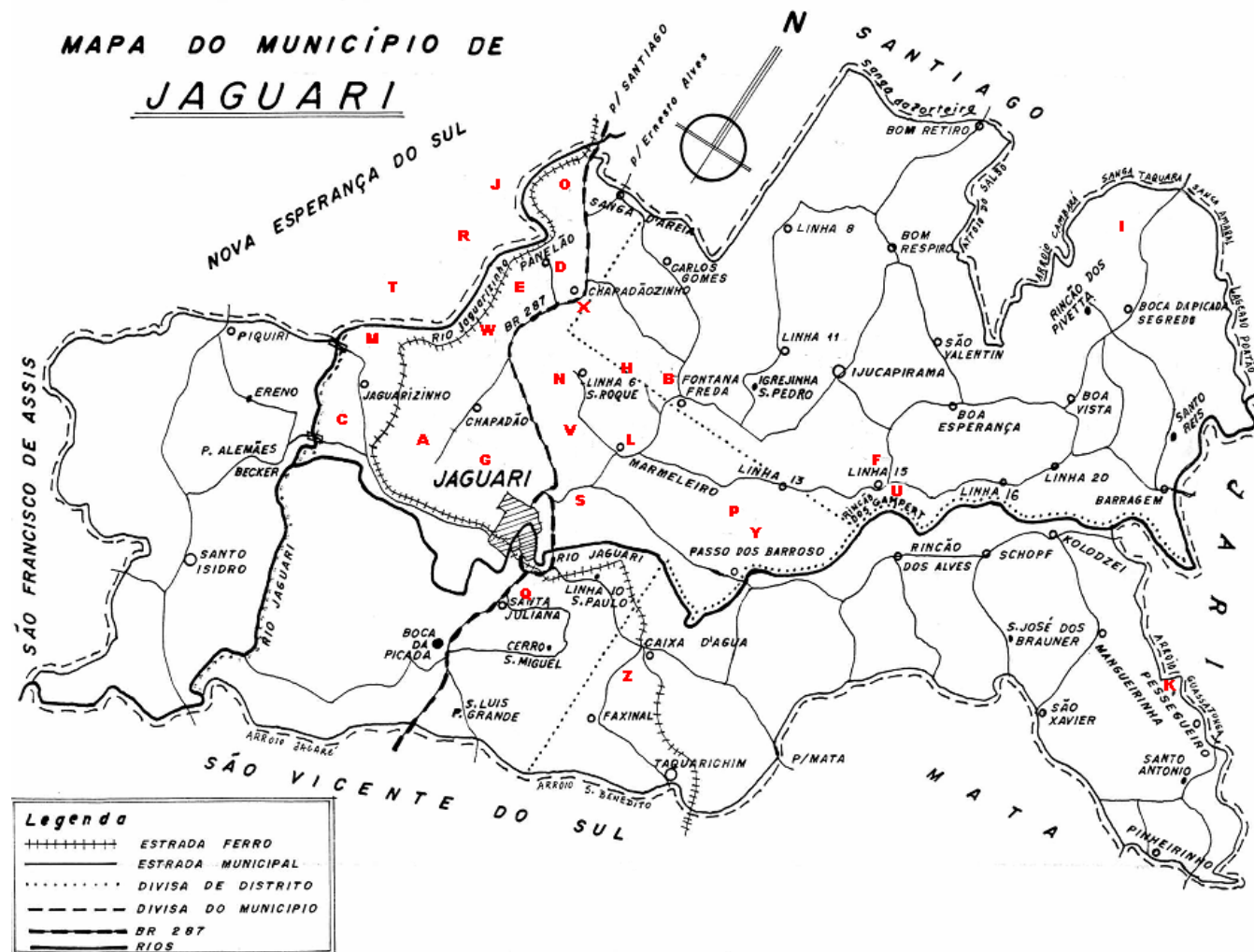
Tabela 2 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Dados de resenha dos 30 bovinos e localização das propriedades.

Bovino nº (protocolo)	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tipo e data da morte	Propriedade de origem	Localidade/ Município	Coordenadas (GPS)
01 (Vn-263-03)	4	F	Cruza Holandês	ESP 24/09/03	A	Chapadão, Jaguari	S 29°28'33.3'' W 054°44'17.9'' Alt.= 430 m
02 (Vn-264-03)	7	F	Mista	EUT 25/09/03	B	Fontana Freda, Jaguari	S 29°25'44.7'' W 054°40'51.9'' Alt.= 290 m
03 (Vn-357-03)	13	F	Mista	EUT 20/11/03	C	Jaguarizinho Jaguari	S 29°29'39.2'' W 054°45'45.6'' Alt.= 113 m
04 (Vn-401-03)	7	F	Cruza Charolês	EUT 19/12/03	D	Panelão, Jaguari	S 29°24'39.9'' W 054°44'53.1'' Alt.= 133 m
05 (Vn-11-04)	6	F	Mista	EUT 15/01/04	E	Panelão, Jaguari	S 29°25'50.1'' W 054°45'00'' Alt.= 122 m
06 (Vn-29-04)	8	MC	Mista	EUT 17/02/04	F*	Linha 15, Jaguari	S 29°25'19.3'' W 054°36'00.6'' Alt.= 138 m
07 (Vn-30-04)	8	F	Holandês	EUT 17/02/04	G	Chapadão, Jaguari	S 29°28'36.8'' W 054°42'35.7'' Alt.= 417 m
08 (V-138-04)	11	F	Mista	EUT 02/03/04	H*	Fontana Freda, Jaguari	S 29°28'36.8'' W 054°42'35.7'' Alt.= 417 m
09 (V-165-04)	9	F	Mista	EUT 05/03/04	I	Boca da Picada, Jaguari	S 29°19'13.3'' W 054°34'18.9'' Alt.= 331 m
10 (Vn-50-04)	5	F	Mista	EUT 11/03/04	H*	Fontana Freda, Jaguari	S 29°28'36.8'' W 054°42'35.7'' Alt.= 417 m
11 (Vn-51-04)	5	F	Mista	EUT 11/03/04	F*	Linha 15, Jaguari	S 29°25'19.3'' W 054°36'00.6'' Alt.= 138 m
12 (Vn-78-04)	6	F	Cruza Nelore	EUT 30/03/04	J	Rincão dos Cadó, Nova Esperança do Sul	S 29°26'12.8'' W 054°46'36.1'' Alt.= 230 m
13 (Vn-80-04)	8	F	Cruza Nelore	EUT 30/03/04	K	Santo Antônio, Jaguari	S 29°25'24.4'' W 057°27'57.2'' Alt.= 237 m
14 (Vn-113-04)	7	MC	Mista	EUT 24/04/04	L	Marmeleiro, Estrada Fontana, Jaguari	S 29°25'10.7'' W 054°40'12.3'' Alt.= 142 m
15 (V-495-04)	3	MC	Cruza Nelore	EUT 08/06/04	M	Jaguarizinho Jaguari	S 29°27'56.9'' W 054°45'32.5'' Alt.= 121 m
16 (Vn-185-04)	7	F	Mista	EUT 17/06/04	N	Linha 6, Jaguari	S 29°26'27.4'' W 054°42'29.3'' Alt.= 180 m

Tabela 2 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Dados de resenha dos 30 bovinos e localização das propriedades.

Bovino nº (protocolo)	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tipo e data da morte	Propriedade de origem	Localidade/ Município	Coordenadas (GPS)
17 (Vn-221-04)	7	F	Cruza Charolês	EUT 13/07/04	O	Sanga D'areia, Jaguari	S 29°24'37.7'' W 054°43'50.1'' Alt.= 260 m
18 (V-637-04)	11	MC	Mista	EUT 26/07/04	P	Linha 13, Jaguari	S 29°26'52.8'' W 054°37'49.4'' Alt.= 160 m
19 (Vn-300-04)	7	F	Mista	EUT 08/09/04	Q	São Miguel, Jaguari	S 29°30'48.3'' W 054°40'29.1'' Alt.= 108 m
20 (Vn-302-04)	10	F	Mista	EUT 08/09/04	R	São João, Nova Esperança do Sul	S 29°25'38.2'' W 054°45'15.7'' Alt.= 127 m
21 (Vn-305-04)	8	F	Mista	EUT 14/09/04	S	Marmeleiro Jaguari	S 29°28'46.0'' W 054°40'51.4'' Alt.= 157 m
22 (Vn-366-04)	10	F	Mista	EUT 04/11/04	T	São Luiz, Nova Esperança do Sul	S 29°28'19.5'' W 054°46'59.7'' Alt.= 115 m
23 (Vn-367-04)	8	F	Mista	ESP 05/11/04	U	Linha 15, Jaguari	S 29°25'42.4'' W 054°35'43.9'' Alt.= 150 m
24 (Vn-373-04)	9	F	Mista	EUT 08/11/04	V**	Linha 06, Jaguari	S 29°27'38.4'' W 054°41'37.3'' Alt.= 171 m
25 (Vn-428-04)	9	F	Mista	EUT 21/12/04	W	Chapadão, Jaguari	S 29°27'00.5'' W 054°44'14.3'' Alt.= 237 m
26 (V-431-05)	8	F	Jersey	EUT 04/05/05	X	Chapadão-zinho Jaguari	S 29°25'48.7'' W 054°43'16.2'' Alt.= 320 m
27 (V-475-05)	13	F	Mista	EUT 18/05/05	H*	Fontana Freda, Jaguari	S 29°28'36.8'' W 054°42'35.7'' Alt.= 417 m
28 (V-476-05)	8	F	Mista	EUT 16/05/05	Y	Linha 13, Jaguari	S 29°26'59.0'' W 054°37'26.4'' Alt.= 127 m
29 (V-507-05)	6	F	Mista	EUT 24/05/05	Z	Caixa d'Água, Jaguari	S 29°30'30.4'' W 054°37'35.2'' Alt.= 143 m
30 (V-666-05)	8	F	Mista	EUT 01/08/05	Z1	Rincão do Ouro, N. E. do Sul	S 29°30'51.9'' W 054°37'49.7'' Alt.= 355 m

F = fêmea; MC = macho castrado; ESP = espontânea; EUT = eutanásia; * = propriedade com mais de um bovino remetido; ** = bovino foi recentemente adquirido da propriedade M; GPS = Sistema de Posicionamento Global; S = latitude; W = longitude; Alt. = altitude; m = metros.



Mapa 1 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Localização aproximada das 27 propriedades (A-Z) de origem dos 30 bovinos intoxicados por samambaia nos municípios de Jaguari e Nova Esperança do Sul, RS. A propriedade Z1 localiza-se fora da área de abrangência do mapa, no município de Nova Esperança do Sul.

Tabela 3 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Questionário epidemiológico sobre a ocorrência de carcinomas de células escamosas no trato alimentar superior de bovinos em 27 propriedades.

Propriedade	Ano	Casos no ano	Casos em anos anteriores	Época em que mais ocorre	Já houve casos de SHA ou HEB
A	2003	0	0	nsp	não
B	2003	0	1 há 5 anos	nsp	não
C	2003	0	0	nsp	não
D	2003	2	sim ^b	nsp	não
E	2004	0	1 a cada 2 anos (em 30 anos)	ano inteiro	1 a cada 3 anos (HEB)
F ^a	2004	0	2 em 2003	primavera-verão	1 há 4 anos (HEB)
G	2004	1	1 por ano	primavera-verão	1 há 2 anos (HEB)
H ^a	2004	0	3 em 2003; 2 em 2002	primavera-verão	não
I	2004	0	0	nsp	não
H	2004	1	3 em 2003; 2 em 2002	primavera-verão	não
F	2004	1	2 em 2003	primavera-verão	1 há 4 anos (HEB)
J	2004	1	0	nsp	não
K	2004	0	0	nsp	não
L	2004	0	1 há 10 anos	verão	1 em 2002 (HEB)
M	2004	0	0	nsp	não
N	2004	0	1 em 2003	verão	não
O	2004	1	6 nos últimos 4 anos	nsp	não
P ^c	2004	0	0	nsp	não
Q	2004	2	1-2 por ano	nsp	não
R	2004	0	0	nsp	não
S	2004	0	0	nsp	1 há 1 ano (HEB)
T	2004	0	0	nsp	não
U	2004	0	0	nsp	não
V	2004	0	0	nsp	2 há 4 anos (HEB)
W	2004	1	1 em ano não informado	nsp	não
X	2005	0	2 nos últimos anos	verão	não
H	2005	0	2 (2004); 3 (2003); 2 (2002)	primavera-verão	não
Y	2005	1	1 em 2004	2 no inverno	não
Z	2005	sim ^b	15 em 8 anos; 6 em 2003	primavera	não
Z1	2005	4	0	2 no verão	não

^a = propriedade com mais de um bovino remetido ao Laboratório de Patologia Veterinária; ^b = não soube precisar quantos; ^c = o bovino estudado tinha sido adquirido de propriedade com samambaia; nsp = não soube precisar a época do ano; SHA = síndrome hemorrágica aguda; HEB = hematúria enzoótica bovina.

Jaguari tem 1.559 propriedades cadastradas, com uma população bovina total de 50.699 divididos por categorias em 17.510 vacas, 563 touros, 13.292 bois, 11.666 novilhos e 7.668 bezerros. Em Nova Esperança do Sul, há 415 propriedades cadastradas, com uma população bovina total de 12.633 animais, divididos por categorias em 4.592 vacas, 201 touros, 3.157 bois, 2.757 novilhos e 1.926 bezerros.

Os dados referentes à resenha dos bovinos estudados encontram-se na Tabela 2. Dois bovinos tiveram morte espontânea e 28 foram submetidos à eutanásia durante estágios avançados da doença e necropsiados. A idade variou entre três e 13 anos, sendo dois (6,6%) com idade igual ou inferior a quatro anos, cinco (16,6%) tinham cinco ou seis anos, 14 (46,6%) tinham sete ou oito anos, cinco (16,6%) tinham nove ou 10 anos e quatro (13,3%) tinham idade superior a 10 anos.

4.1.2 – Sinais clínicos, achados macroscópicos e histológicos

Os sinais clínicos apresentados pelos 30 bovinos incluíram, em ordem decrescente de frequência, emagrecimento progressivo, atonia ruminal, tosse, disfagia, regurgitação, halitose, diarreia, timpanismo, apetite seletivo, dispnéia e salivação (Tabela 5). A correlação entre a distribuição dos CCEs de maior extensão no TAS e os sinais clínicos observados nos 30 bovinos encontra-se na Tabela 6.

O emagrecimento progressivo acentuado (30/30; Figuras 5A e B) foi o sinal clínico apresentado constantemente pelos bovinos examinados o qual era, na grande maioria dos casos, acompanhado de fraqueza. Não foi estabelecido o peso exato de cada bovino, mas ao exame clínico observava-se que os bovinos intoxicados tinham peso vivo muito abaixo do esperado quando comparados a outros da mesma idade e rebanho.

Atonia ruminal (20/30) foi um sinal clínico freqüente e com duração variável. Apesar de ter sido observada em bovinos com CCE em várias localizações no TAS (ver Tabela 6), na metade dos casos (10/20) o CCE localizava-se na entrada do rúmen e rúmen. Bovinos com CCEs na base da língua (3/20), faringe/orofaringe (3/20), epiglote (1/20) e esôfago (4/20) também tiveram atonia ruminal.

Tabela 4 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Classificação das categorias dos bovinos por propriedade.

Propriedade	Categorias de bovinos					Total
	Vacas	Touros	Bois	Novilhos ^a	Bezerros	
A	12	1	0	7	6	26
B	8	0	0	7	6	21
C	8	1	2	7	5	23
D	35	1	0	22	17	75
E	1	0	0	2	1	4
F ^b	4	1	3	8	1	17
G	8	0	0	13	3	24
H ^b	17	0	0	4	22	43
I	1	0	0	0	0	1
J	12	1	0	7	6	26
K	2	0	2	8	0	12
L	6	0	2	5	1	14
M	10	1	2	41	0	54
N	11	0	0	23	1	35
O	29	1	0	10	11	51
P	17	0	2	10	4	33
Q	8	0	0	23	2	33
R	16	0	0	15	14	45
S	79	1	0	27	21	128
T	1	1	0	5	1	8
U	12	0	0	2	12	26
V ^c	13	1	0	1	0	15
W	13	0	0	31	6	50
X	6	0	0	2	2	10
Y	65	3	0	18	112	198
Z	21	1	0	0	28	50
Z1	32	0	0	25	11	68
Total	447	14	13	323	293	1090
(%)	41,0%	1,3%	1,2%	29,6%	26,9%	100%

^a = inclui novilhas entre 1-3 anos e novilhos entre 1-4 anos; ^b = propriedade com mais de um bovino remetido (dados do último censo); ^c = o bovino foi recentemente adquirido da propriedade M.

A tosse (17/30) foi observada freqüentemente em bovinos com CCEs na base da língua, faringe/orofaringe, esôfago e epiglote (10/17). Esse sinal clínico era muitas vezes acompanhado por distensão do pescoço (Figura 6). Bovinos com CCEs em outras localizações, (como por exemplo o bovino quatro, que tinha CCE no rúmen) porém com papilomatose acentuada nas áreas mais craniais do TAS (base da língua, faringe/orofaringe e epiglote), também tiveram tosse.

A disfagia (12/30) foi observada principalmente nos bovinos com CCEs na base da língua e faringe/orofaringe (6/12), mas também foi vista, com menor freqüência, em bovinos com CCEs em outras localizações (ver Tabela 6). Regurgitação freqüente (12/30; Figura 7) foi vista em bovinos com CCEs localizados principalmente no esôfago e entrada do rúmen (8/12).

Halitose (hálito com odor pútrido; 10/30) foi observada em bovinos com CCEs localizados principalmente na base da língua e faringe/orofaringe (7/10), sendo detectada com menor freqüência quando o CCE localizava-se na epiglote (1/10), esôfago (1/10) e rúmen (1/10). Freqüentemente observou-se extensa necrose da massa tumoral e impactação de alimento nas áreas afetadas.

A ocorrência de timpanismo (8/30; Figuras 8A e B) de intensidade e duração variáveis, foi mais marcada em bovinos com CCEs na entrada do rúmen (5/8), muitas vezes associados com acentuado edema da mucosa da região levando à obstrução parcial da entrada do rúmen. Os outros três bovinos com timpanismo tinham espessamentos estenosantes anelares da parede (correspondentes a CCEs) no esôfago cranial (Bovinos 9 e 23) ou tinham CCE associado com impactação de alimento no esôfago caudal (Bovino 13).

Diarréia (9/30) foi mais freqüentemente vista em bovinos com CCEs localizados na entrada do rúmen (5/9). Sinais clínicos menos freqüentes incluíram: apetite seletivo (7/30), dispnéia (3/30) e salivação (3/30; Figuras 9A e B).

Os principais achados macroscópicos e histológicos observados nos 30 bovinos localizavam-se no TAS e consistiam de papilomatose digestiva, papilomas em transformação para CCEs, CCEs e metástases de CCEs para linfonodos regionais e outros órgãos. Outras lesões esporádicas secundárias à intoxicação crônica por samambaia ou achados incidentais estão listadas no Apêndice B.

Vinte e nove dos trinta bovinos tinham papilomas de tamanhos variados (entre 0,2 e 2 cm de diâmetro), únicos ou múltiplos, sésseis ou pedunculados, com projeções digitiformes conspícuas e queratinização superficial variável distribuídos ao longo do TAS (Tabela 7).

Tabela 5 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Sinais clínicos em 30 bovinos intoxicados.

<i>Sinais clínicos</i>	Bovino																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Apetite seletivo	-	-	-	◆	-	-	-	-	◆	-	◆	-	-	-	-	◆	◆	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atonia ruminal	◆	-	-	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	-	-	-	-	-	◆	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	-	◆	◆	◆	◆	
Diarréia	-	-	-	-	-	-	-	◆	◆	-	-	-	◆	-	◆	◆	-	-	-	◆	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	◆	◆
Disfagia	◆	◆	◆	◆	-	◆	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	◆	◆	◆	-	◆	-	-	
Dispnéia	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Emagrecimento	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	
Halitose	-	-	◆	◆	◆	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Regurgitação	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	◆	◆	-	◆	◆	-	-	-	-	◆	-	◆	-	◆	-	◆	◆	-	◆	-	-	
Salivação	-	-	◆	◆	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Timpanismo	-	◆	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	◆	◆	-	◆	-	-	◆	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	◆
Tosse	◆	◆	-	◆	◆	-	-	◆	-	◆	◆	-	-	-	-	-	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	-	◆	-	◆	◆	

- = ausente. ◆ presente;

Tabela 6 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Correlação entre a distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior e os sinais clínicos observados em 30 bovinos (numerados de 1-30).

Sinal clínico	Localização dos CCEs					
	Base da língua	Faringe/orofaringe	Epiglote	Esôfago	Entrada do rúmen	Rúmen
Apetite seletivo	17	11	-	9	16; 19	4 ^b ; 18
Atonia Ruminal	17; 21; 24 ^b	6; 8; 23 ^a ;	10	9; 23; 25; 28	1; 16; 19; 20; 22; 29; 30	4; 7; 27
Diarréia	-	8	-	9;13	16; 20; 22; 29; 30	15
Disfagia	3; 17; 24	6; 8; 26	-	25; 28	1; 2	4; 7
Dispneia	12	5; 11	-	-	-	-
Emagrecimento	3; 12; 17; 21; 24	5; 6; 8; 11; 23; 26	10	9; 13; 23; 25; 28	1; 2; 14; 16; 19; 20; 22; 29; 30	4; 7; 15; 18; 27
Halitose	3; 12; 17	5; 6; 8; 11	10	9	-	4
Regurgitação	21	11; 23; 26	10	13; 23; 25; 28	1; 2; 14; 19	-
Salivação	3	-	10	-	-	4
Timpanismo	-	23	-	9; 13; 23	2; 14; 16; 19; 30	-
Tosse	17; 21; 24	5; 8; 11; 23; 26	10	23; 28	1; 2; 19; 20; 22; 30	4

^a = bovino com CCE de maior extensão na faringe/orofaringe e esôfago cranial; ^b = bovinos com papilomatose acentuada na base da língua, faringe/orofaringe e epiglote.

O Bovino 1 não tinha papilomas no TAS. Os papilomas foram observados no palato duro (3/29; Figura 10 A), palato mole (18/29; Figuras 10A-C), base da língua (20/29; Figura 10C), faringe/orofaringe (24/29; Figuras 11A e B), epiglote (8/29), esôfago cranial (15/29; Figura 12A), esôfago médio (14/29; Figura 12B), esôfago caudal (14/29), entrada do rúmen (26/29; Figura 12C) e rúmen (6/29). Fora do TAS, apenas um bovino (Bovino 30) tinha um papiloma na mucosa da bexiga.

A quantidade de papilomas nos diferentes locais do TAS examinados era variável entre leve (até 10 papilomas), moderada (10 a 20 papilomas) e acentuada (mais de 20 papilomas; Figuras 13A e B). A papilomatose digestiva foi leve em 13 (45%) bovinos, moderada em 11 (38%) e acentuada em cinco (17%) bovinos.

Histologicamente, os papilomas com aspecto macroscópico característico eram compostos por projeções digitiformes (Figura 14A) constituídas principalmente por epitélio escamoso estratificado hiperplásico com queratinização superficial variável (hiperqueratose ortoqueratótica e paraqueratótica; Figura 14B), sustentadas por eixos fibrovasculares centrais. Nas camadas superiores do estrato espinhoso havia células morfológicamente compatíveis com coilócitos, as quais tinham núcleos pequenos, hiper cromáticos e excêntricos, circundados por um halo claro perinuclear (Figuras 14C e D).

Foram observadas pelo menos três fases distintas de desenvolvimento dos papilomas microscopicamente: a) fase inicial de crescimento; b) fase de desenvolvimento; e c) fase de regressão. Os papilomas em fase inicial de crescimento (Figura 15A) caracterizavam-se por hiperplasia das células epiteliais com queratinização superficial leve a moderada formando projeções digitiformes atenuadas, os quais correspondiam macroscopicamente a pequenas elevações rugosas na mucosa. Os papilomas em fase de desenvolvimento (Figuras 15B e C) caracterizavam-se por marcada hiperplasia epitelial com tumefação celular e marcada hiperqueratose e paraqueratose, os quais correspondiam macroscopicamente aos papilomas com projeções digitiformes conspícuas e características desta neoplasia. Os papilomas em fase de regressão (Figuras 15D e E) apresentavam acentuado infiltrado linfocitário no estroma fibrovascular de sustentação (Figura 15E) e, na maioria das vezes, não apresentavam características macroscópicas distinguíveis dos papilomas em desenvolvimento ou apresentavam atenuação das digitações (Figura 15D).

Tabela 7 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos papilomas e dos papilomas em transformação para carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior de 29 bovinos baseada nos exames macroscópicos e histológicos.

Lesão	Bovino																												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Palato duro	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palato mole	◆	◆	◆	-	-	-	◆	◆	-	◆	◆	-	◆	◆	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	-	-	-	-	◆	-
Base da língua	-	◆	●	-	-	-	-	◆	◆	◆	◆	-	◆	-	◆	●	-	◆	◆	◆	◆	◆	●	◆	◆	-	◆	●	◆
Orofaringe/Faringe	●	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	●	-	◆	-	◆	◆	-	-	◆	◆	◆	◆	●	●	◆	◆	◆	◆	-
Epiglote	◆	◆	●	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	◆	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	●	-	◆	-	-	-	-
Esôfago cranial	-	◆	●	-	-	◆	◆	◆	-	-	●	-	-	◆	◆	◆	-	◆	◆	◆	-	◆	◆	-	-	-	-	●	-
Esôfago médio	-	●	●	◆	-	◆	◆	◆	-	-	-	-	-	●	◆	◆	-	◆	◆	-	-	◆	◆	-	-	-	-	◆	-
Esôfago caudal	-	◆	◆	-	-	◆	●	●	◆	-	-	-	-	◆	◆	◆	-	-	●	-	-	◆	◆	◆	-	-	-	●	-
Entrada do rúmen	◆	●	◆	◆	●	◆	◆	●	●	◆	●	◆	●	◆	-	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	●	◆	◆	◆	-	◆	-
Rúmen	-	-	◆	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	◆	-	◆	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆

- = papiloma ausente; ◆ = papiloma presente; ● = presença de papilomas e papilomas em transformação para CCEs.

Em 16 bovinos (Tabela 7), o exame histológico de lesões macroscopicamente compatíveis com papilomas (colhidos aleatoriamente), porém alguns deles apresentando-se mais arredondados, com projeções digitiformes atenuadas ou ulceradas (Figuras 16A-C), revelou proliferação de queratinócitos neoplásicos malignos bem diferenciados a partir da camada basal das projeções digitiformes (Figuras 17A-E), formando ilhas que invadiam o estroma fibrovascular estendendo-se à lâmina própria (Figuras 17B, C e E) e a outras camadas subjacentes. Várias dessas ilhas apresentavam acentuada queratinização lamelar central (pérolas de queratina). Infiltrado inflamatório linfocitário multifocal moderado era freqüentemente observado na base desses papilomas em transformação (PTs) para CCEs. Remanescentes de projeções digitiformes podiam ser observadas (Figura 17E) ou não (Figura 17 D) na superfície dos PTs, os quais eram únicos ou múltiplos e foram observados, em ordem decrescente de freqüência, no esôfago (10/16), entrada do rúmen (7/16), base da língua (4/16), faringe/orofaringe (4/16) e epiglote (2/16).

Em alguns bovinos, pequenas lesões observadas no TAS que eram macroscopicamente compatíveis ou suspeitas de serem CCEs foram avaliadas histologicamente através do encaminhamento dirigido (Figura 18).

O aspecto macroscópico dos CCEs era bastante variável (Figuras 19-25), principalmente consistindo de massas tumorais exuberantes, sésseis ou pedunculadas e de crescimento exofítico, áreas rugosas ulceradas ou não e de crescimento endofítico ou de espessamentos anelares estenosantes (estes últimos observados somente na parede do esôfago). Outros aspectos macroscópicos consistiam de áreas irregulares salientes na mucosa associadas a edema (vistas principalmente na entrada do rúmen) ou pequenas áreas rugosas e elevadas ou ulceradas e deprimidas com cerca de 0,5-2 cm de diâmetro (vistas principalmente na mucosa esofágica; ver Figura 18). A superfície de corte da maioria dos CCEs revelou áreas irregulares de consistência firme, brancas ou com pontos amarelo-ouro. Papilomas e PTs foram freqüentemente observados próximos aos CCEs nas diferentes regiões do TAS (Figura 26A e B).

A distribuição detalhada dos CCEs únicos (12/30) ou múltiplos (18/30) no TAS dos 30 bovinos encontra-se na Tabela 8. Quando o número total de vezes em que CCEs de tamanhos variados foram vistos em determinada localização no TAS foi correlacionado ao número de CCEs de maior extensão naquele mesmo local (Gráfico 1), a correlação foi, respectivamente: base da língua (9/5), faringe/orofaringe (11/6), epiglote (6/1), esôfago cranial (6/2), esôfago médio (8/1), esôfago caudal (6/2), entrada do rúmen (18/9) e rúmen (12/5).

Quando a distribuição dos CCEs de maior extensão foi agrupada em regiões cranial (incluindo base da língua, faringe/orofaringe, epiglote), média (incluindo os terços cranial, médio e caudal do esôfago) e caudal (incluindo entrada do rúmen e rúmen) do TAS (Gráfico 2), observou-se que em 12 bovinos a localização era cranial (39%), em cinco era média (16%), e em 14 bovinos era caudal (45%). Utilizando-se esse mesmo critério de agrupamento, porém considerando o número total de vezes em que CCEs (de menor e maior extensão) foram diagnosticados nas regiões cranial, média e caudal (Gráfico 3), os números alteraram-se para 26 (34%), 20 (26%) e 40 (40%), respectivamente.

Histologicamente, os CCEs eram constituídos por queratinócitos neoplásicos dispostos em ninhos, cordões ou ilhas. Essas células tinham núcleos vesiculares, redondos, ovóides ou pleomórficos e com um ou mais nucléolos evidentes. O citoplasma era eosinofílico e abundante. Algumas células neoplásicas exibiam queratinização individual e, em algumas ilhas, havia queratinização concêntrica e lamelar (pérolas de queratina). Os CCEs foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 1 (Materiais e Métodos) como bem diferenciados, moderadamente diferenciados ou pouco diferenciados (Figuras 27A-C). De acordo com a Tabela 9, em 18 bovinos os CCEs eram bem diferenciados, em quatro eram moderadamente diferenciados, e em dois bovinos eram pouco diferenciados.

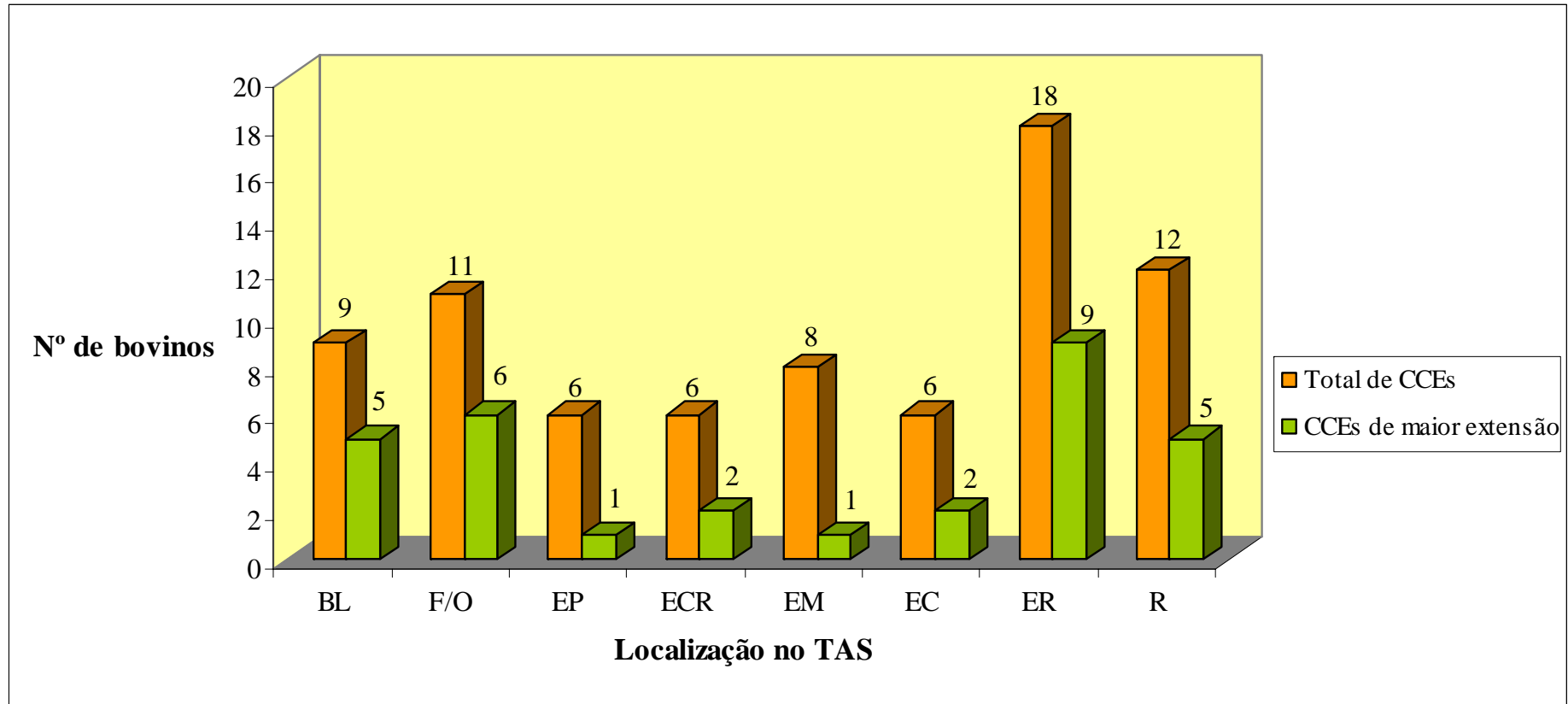
Em seis bovinos com CCEs em múltiplas localizações, alguns deles eram bem diferenciados, e outros moderadamente diferenciados. Independentemente do grau de diferenciação celular e da localização no TAS, os CCEs eram moderada a acentuadamente invasivos (Figuras 28A e B). Nos espessamentos estenosantes anelares esofágicos, os CCEs apresentavam marcada infiltração das camadas muscular (Figura 28B) e adventícia, sendo a mucosa muitas vezes afetada em menor intensidade. A desmoplasia foi geralmente acentuada nesses casos.

Outras alterações histológicas vistas nos CCEs consistiam de calcificação, desmoplasia, infiltrado inflamatório, necrose, edema e hemorragia. A calcificação, observada geralmente sobre a queratina livre, que estava circundada por infiltrado inflamatório, onde predominavam células gigantes multinucleadas (reação tipo corpo estranho), foi vista em CCEs de quatro bovinos (Bovino 2, 13, 15 e 18). Desmoplasia leve a acentuada, caracterizada histologicamente por proliferação de tecido conjuntivo ao redor dos agrupamentos de queratinócitos neoplásicos (Figuras 28B e C), foi observada em CCEs de 26 bovinos, sendo que em alguns deles, o grau acentuado de desmoplasia conferiu aspecto esquirroso ao tumor primário ou às metástases. O infiltrado inflamatório foi um achado constante nos CCEs de todos os bovinos.

Tabela 8 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior e metástases observados em 30 bovinos baseada nos exames macroscópico e histológico.

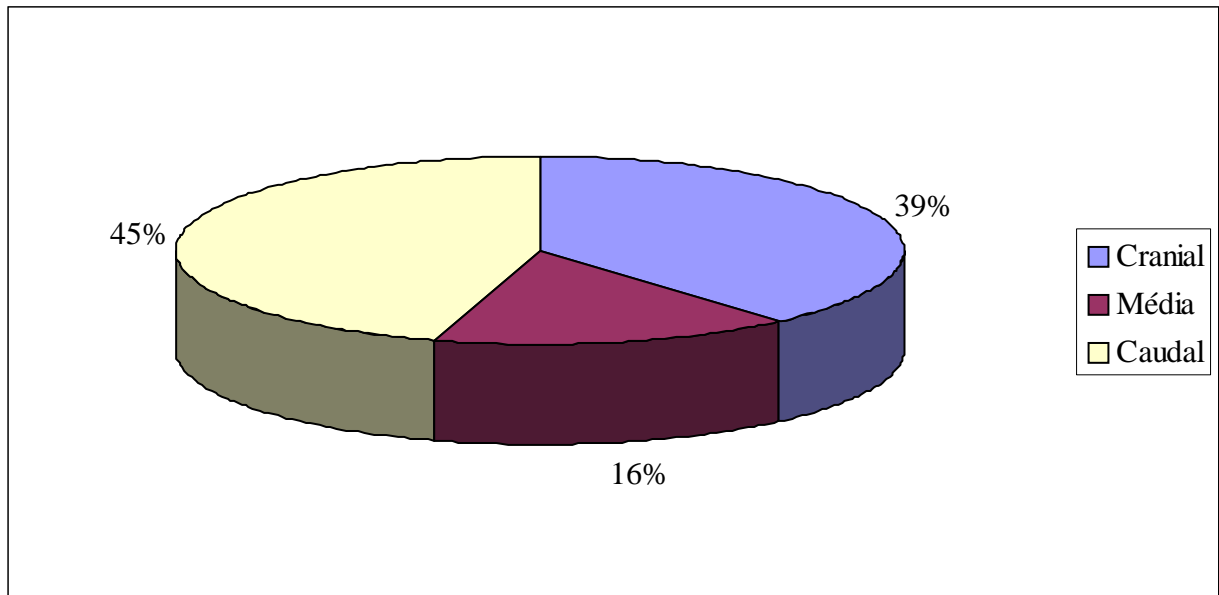
Lesão	Bovino																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Base da língua	-	-	●	○	-	◆	-	◆	-	-	-	●	-	-	-	-	●	-	-	-	●	-	◆	●	-	-	-	-	-	-
Faringe/orofaringe	-	◆	-	◆	●	●	-	●	-	○	●	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	○	-	●	-	-	-	
Epiglote	-	◆	-	◆	-	◆	-	◆	-	●	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Esôfago cranial	-	-	-	◆	-	-	-	-	●	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	●	-	-	○	-	-	-	
Esôfago médio	-	-	○	◆	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	◆	-	◆	-	-	-	-	-	○	-	●	-	-	◆	-	
Esôfago caudal	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	◆	●	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	○	-	●	-	
Entr. rúmen	●	●	◆	◆	-	◆	-	-	-	-	◆	○	◆	●	-	●	-	-	●	●	-	●	-	-	○	◆	-	○	●	●
Rúmen	-	-	-	●	-	-	●	◆	-	-	-	◆	◆	-	●	-	-	●	◆	◆	-	-	-	◆	-	○	●	-	-	-
LN1	-	-	◆	◆	◆	◆	-	-	-	◆	◆	○	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	◆	-	-	◆	-
LN2	◆	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LN3	◆	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-
LN4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LN5	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LN6	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LN7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-
Pulmão	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	◆	-	◆	-
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-
Omento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bexiga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Intestino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	◆	-	-	-

◆ = CCE presente; - = CCE ausente; ● = CCE de maior extensão; ○ = CCE diagnosticado somente microscopicamente; LN1 = linfonodos retrofaríngeos; LN2 = linfonodos mediastínicos; LN3 = linfonodos ruminais; LN4 = linfonodos hepáticos; LN5 = linfonodos paravertebrais; LN6 = linfonodos mesentéricos; LN7 = linfonodos retroesofágicos.



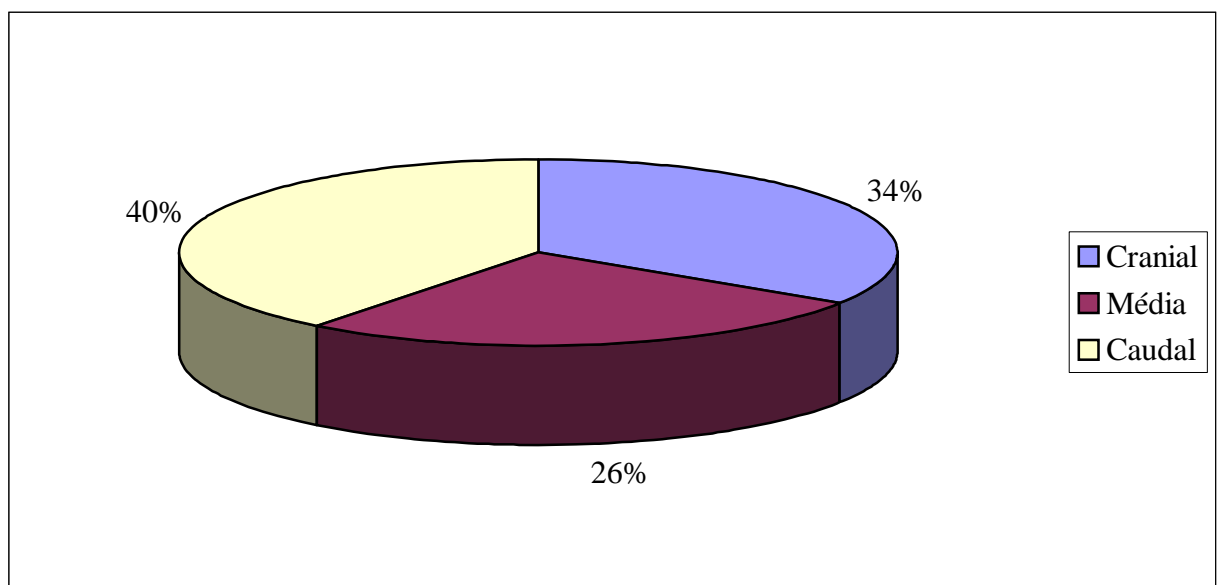
BL = Base da língua; F/O = faringe/orofaringe; EP = epiglote; ECR = esôfago cranial; EM = esôfago médio; EC = esôfago caudal; ER = entrada do rúmen; R = rúmen.

Gráfico 1 – Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) correlacionando o número total de vezes em que o tumor foi visto em determinado local com o número de CCEs de maior extensão naquele local.



Região cranial = base da língua, faringe/orofaringe e epiglote; Região média = esôfago (terços cranial, médio e caudal); Região caudal = entrada do rúmen e rúmen.

Gráfico 2 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição dos carcinomas de células escamosas de maior extensão nas regiões cranial, média e caudal do trato alimentar superior.



Região cranial = base da língua, faringe/orofaringe e epiglote; Região média = esôfago (terços cranial, médio e caudal); Região caudal = entrada do rúmen e rúmen.

Gráfico 3 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Distribuição do número total de vezes em que os carcinomas de células escamosas foram observados nas regiões cranial, média e caudal do trato alimentar superior.

Tabela 9 - Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Grau de diferenciação celular dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior de 30 bovinos.

Localização	Bovino																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Base da língua	-	-	B	B	-	B	-	B	-	-	-	B	-	-	-	-	B	-	-	-	B	-	B	B	-	-	-	-	-	-
Faringe/Orofaringe	-	B	-	B	M	B	-	B	-	B	B	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B	-	B	-	-	-	-
Epiglote	-	M	-	B	-	B	-	B	-	B	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esôfago cranial	-	-	-	B	-	-	-	-	M	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	B	-	-	B	-	-	B	-	-	-	-
Esôfago médio	-	-	B	B	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-	B	-	B	-	-	-	-	-	M	-	B	-	-	B	-	-
Esôfago caudal	-	-	-	B	-	-	-	-	-	-	-	B	B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	B	-	M	-	-
Entrada do rúmen	M	B	B	B	-	B	-	-	-	-	B	B	B	M	-	B	-	-	B	M	-	B	-	-	B	M	-	M	P	B
Rúmen	-	-	-	B	-	-	P	B	-	-	-	B	B	-	B	-	-	B	B	M	-	-	-	M	-	B	B	-	-	-

- = CCE ausente; B = CCE bem diferenciado; M = CCE moderadamente diferenciado; P = CCE pouco diferenciado.

Nos CCEs com superfície ulcerada, intenso infiltrado neutrofilico era observado, na maioria das vezes, associado a fibrina e aglomerados de bactérias intralesionais e, menos freqüentemente, a edema e hemorragia. Em planos mais profundos, infiltrados multifocais que variavam de leves a acentuados, eram constituídos por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e por quantidades variáveis de eosinófilos (Figura 28D). Áreas de necrose, variando de leves a acentuadas, foram observadas em CCEs de 18 bovinos. Áreas de hiperplasia epitelial, de displasia epitelial (lesões pré-neoplásicas; Figura 28E), CCEs *in situ* e CCEs em fase inicial de desenvolvimento (Figura 28F) foram freqüentemente observados no epitélio distante ou adjacente aos papilomas e PTs nas diferentes localizações do TAS.

Metástases de CCEs foram observadas, independentemente do grau de diferenciação celular do tumor primário, em 18/30 bovinos, sendo que em 9/18 bovinos as metástases tinham localização única e nos demais 9/18, múltipla. Em 16 casos as metástases foram observadas em linfonodos regionais (Figuras 29A e B) e em seis casos foram vistas em outros órgãos como fígado (Figuras 30A), pulmão (Figuras 30B), intestino (Figuras 30C), omento, baço, e bexiga. As raras metástases vistas no intestino, omento, baço e bexiga foram de implantação. A distribuição detalhada das metástases por bovino consta na Tabela 8, as quais eram, na maioria das vezes, caracterizadas por áreas brancas e firmes, muitas vezes com acentuada necrose e com pontos ou áreas amarelas de distribuição aleatória (Figuras 29A e B). Microscopicamente, o grau de diferenciação celular dos queratinócitos neoplásicos das metástases geralmente correspondiam ao do tumor primário (Figuras 31A-D).

Um bovino (Bovino 22) tinha um nódulo no intestino delgado que correspondia microscopicamente a um adenoma.

4.1.3 – Imunoistoquímica (IHQ)

Os queratinócitos neoplásicos que constituíam os CCEs em diferentes localizações no TAS e nas metástases (Figuras 32A e B) foram fortemente positivos para pancitoqueratina, detectada através da técnica de IHQ, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-citoqueratina bovina. Observou-se acentuada redução na intensidade de imunomarcção para citoqueratina em CCEs pouco diferenciados, quando comparados aos bem ou moderadamente diferenciados.

Figura 3. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A e B. Espécimens de samambaia (*Pteridium aquilinum*) na propriedade W, na localidade de Chapadão, município de Jaguari, RS, em 21/12/2004.



Figura 4. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A e B. Vistas da localidade de Chapadão, município de Jaguari, RS, onde localizam-se três propriedades (A, G, W) de origem de bovinos intoxicados por samambaia, em 21/12/2004.



Figura 5. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Emagrecimento acentuado. A. Bovino 3. B. Bovino 6.



Figura 6. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 10. Tosse e distensão do pescoço.

Figura 7. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 13. Regurgitação do conteúdo alimentar.



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.

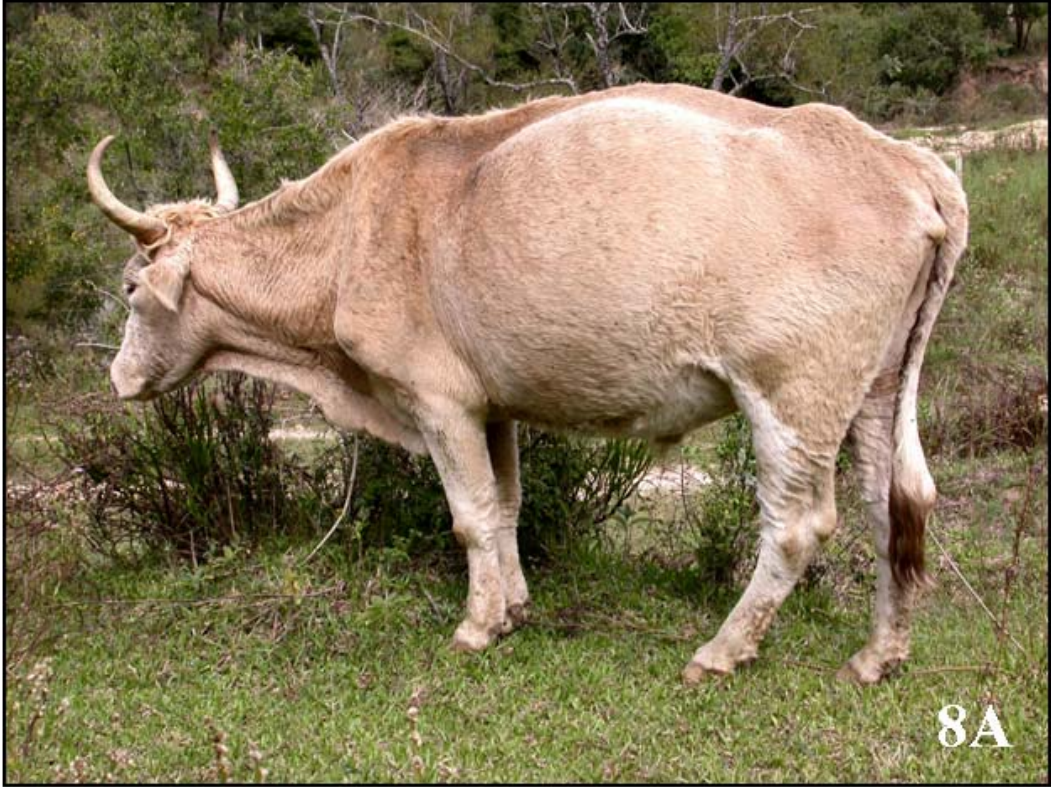


Figura 9. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Salivação intensa. A. Bovino 10. B. Bovino 3.

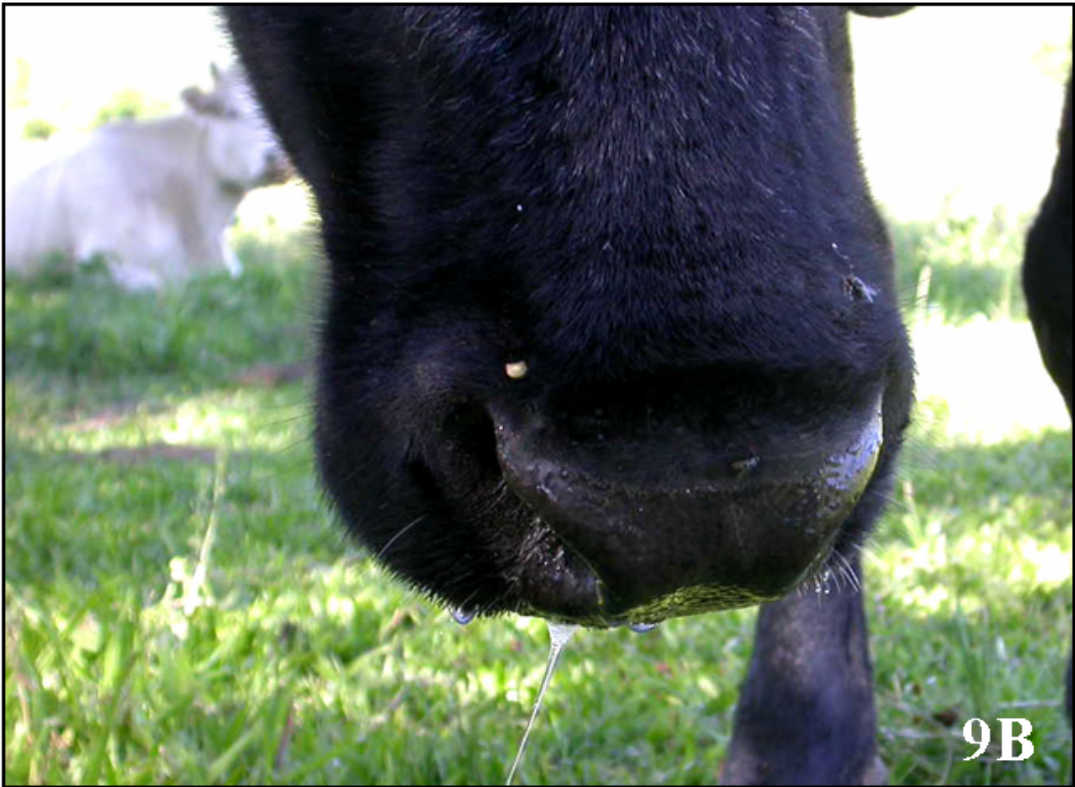


Figura 10. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 11. Papilomas multifocais nos palatos mole e duro. B. Bovino 2. Múltiplos papilomas jovens no palato mole. C. Bovino 14. Papilomas de tamanhos variados no palato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

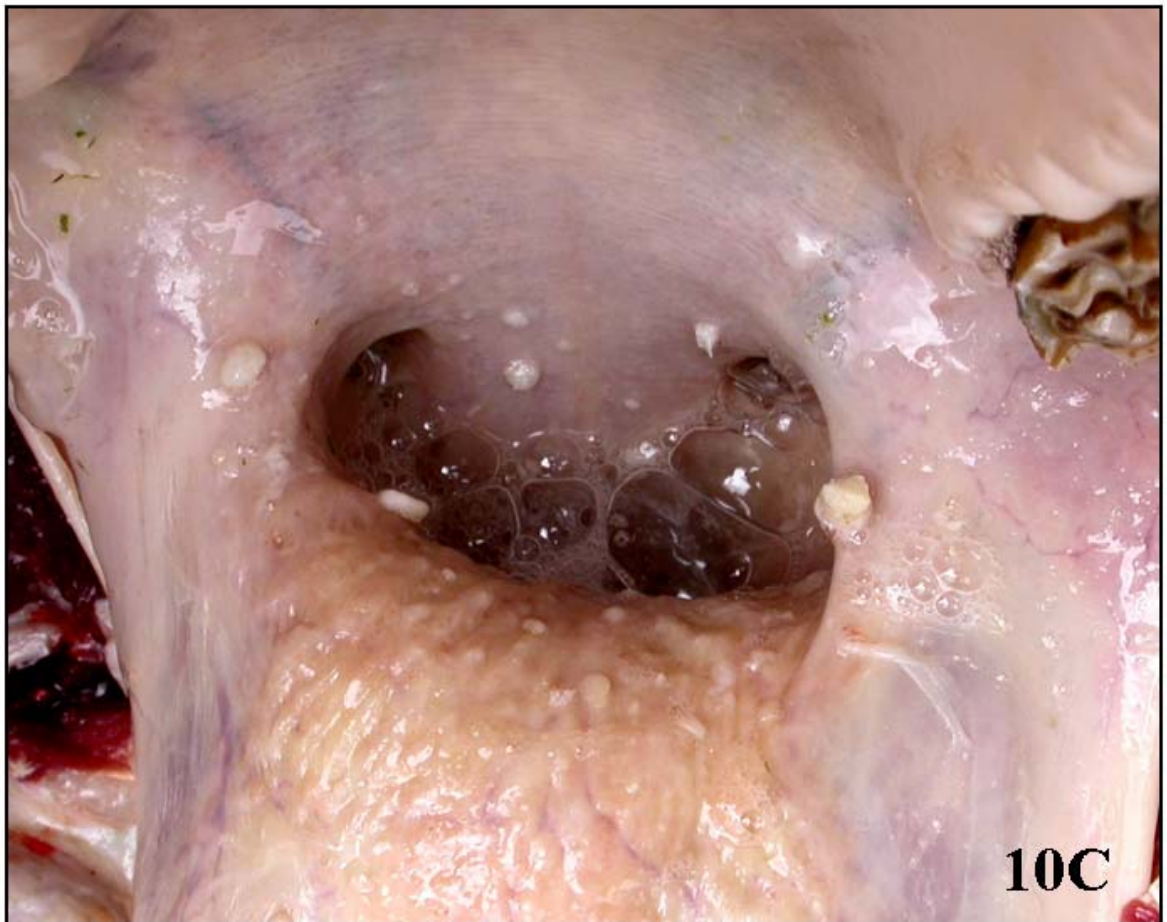
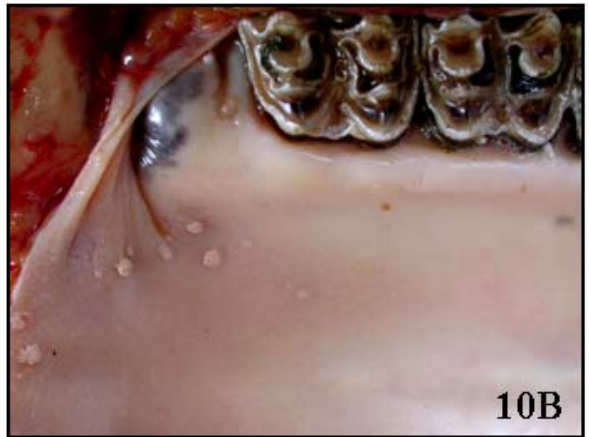


Figura 11. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomas na faringe. A. Bovino 24. Papiloma pedunculado. B. Bovino 26. Papilomas sésseis.



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.

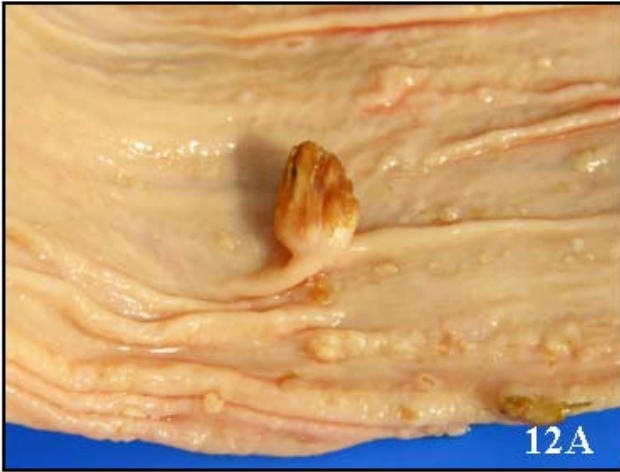


Figura 13. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomatose acentuada na região cranial do trato alimentar superior. A. Bovino 4. B. Bovino 24.

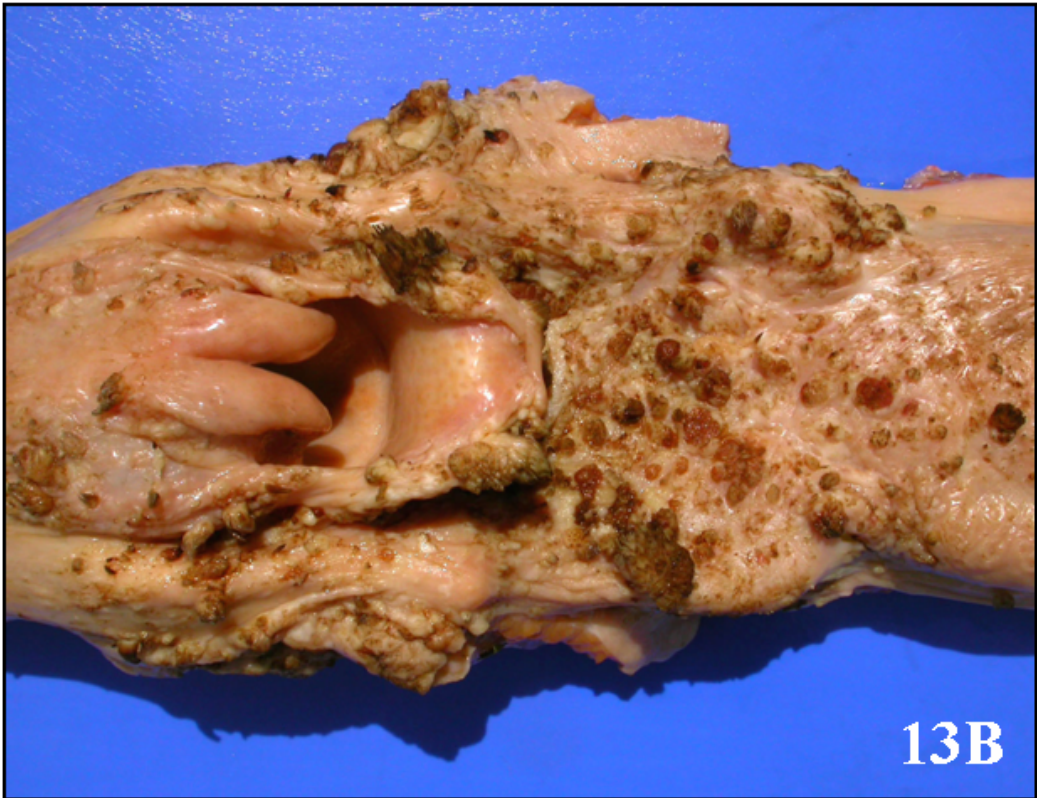


Figura 14. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Aspectos histológicos dos papilomas. A. Bovino 4. Projeções digitiformes características dos papilomas (40x). B. Bovino 2. Epitélio escamoso estratificado hiperplásico com 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.

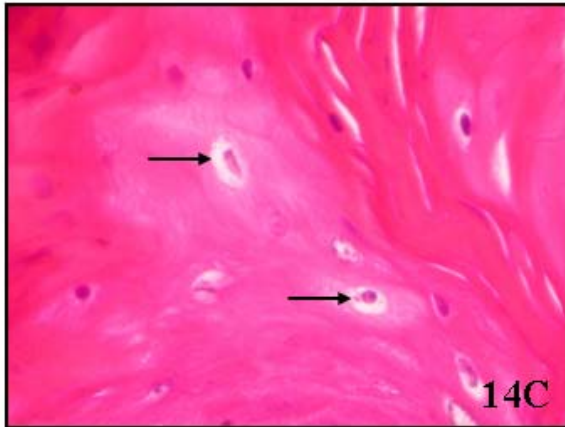
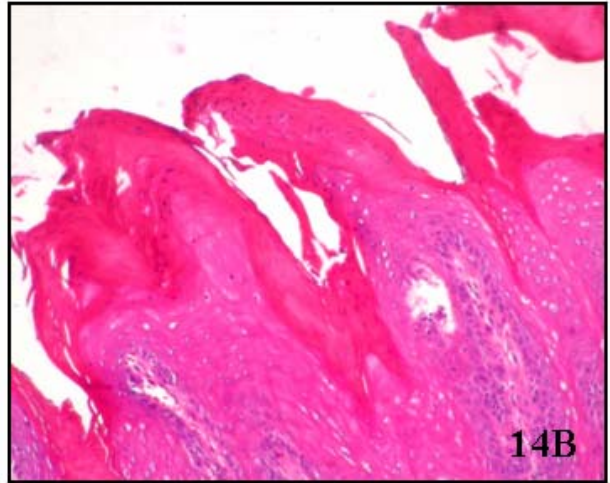
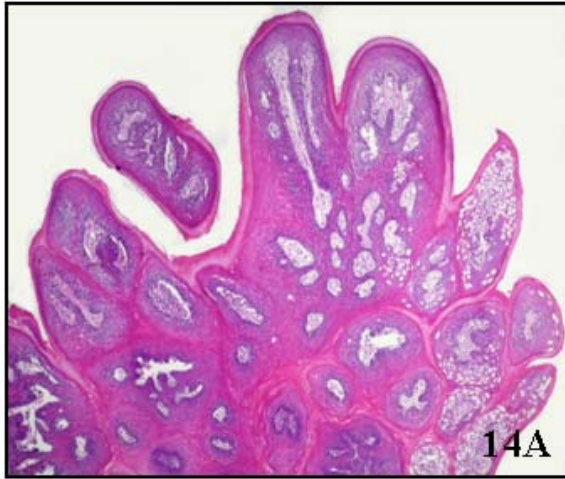


Figura 15. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Fases de desenvolvimento dos papilomas. A. Bovino 26. Papiloma em fase inicial de crescimento (40x). B. Bovino 28. Fase de desenvolvimento de um papiloma pedunculado (submacroscópica). 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.

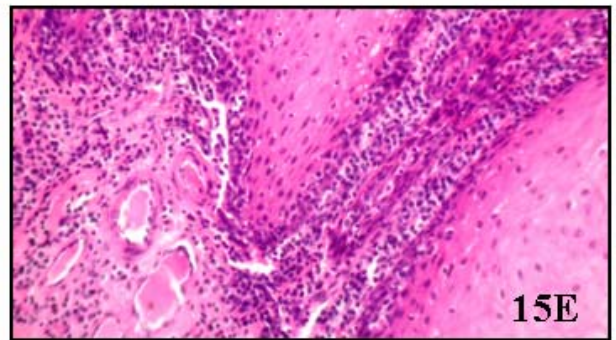
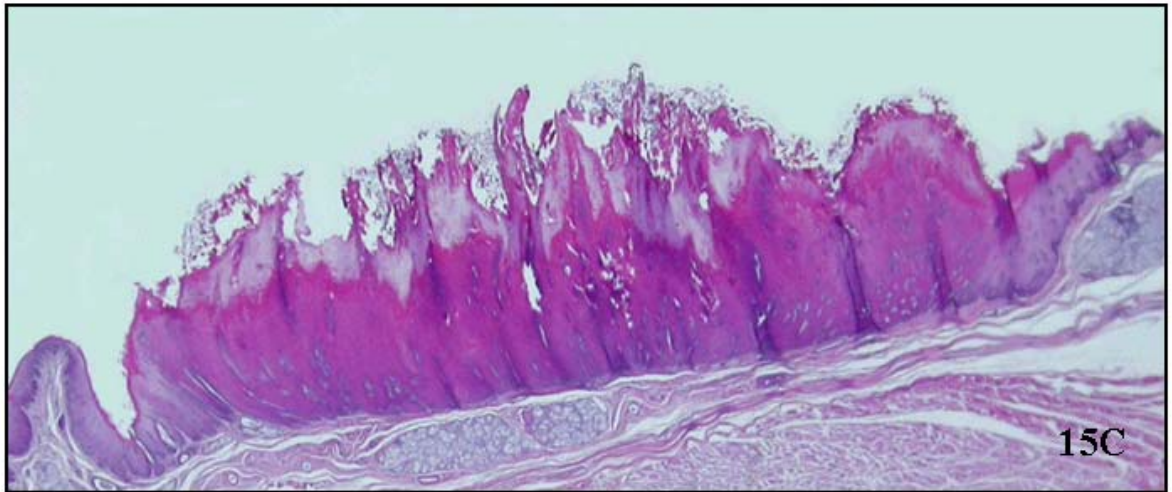
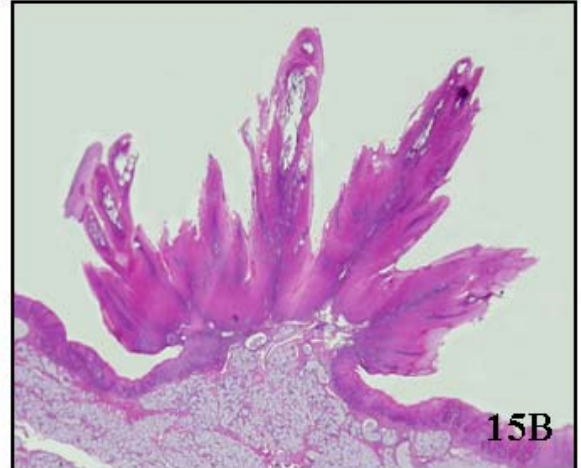
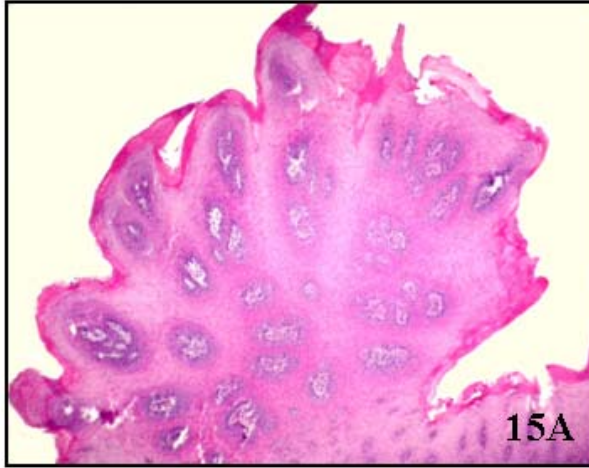


Figura 16. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Papilomas em transformação (PTs) para carcinoma de células escamosas. A. Bovino 4. Esôfago médio. PT com projeções digitiformes arredondadas. B. Bovino 8. PT de contorno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

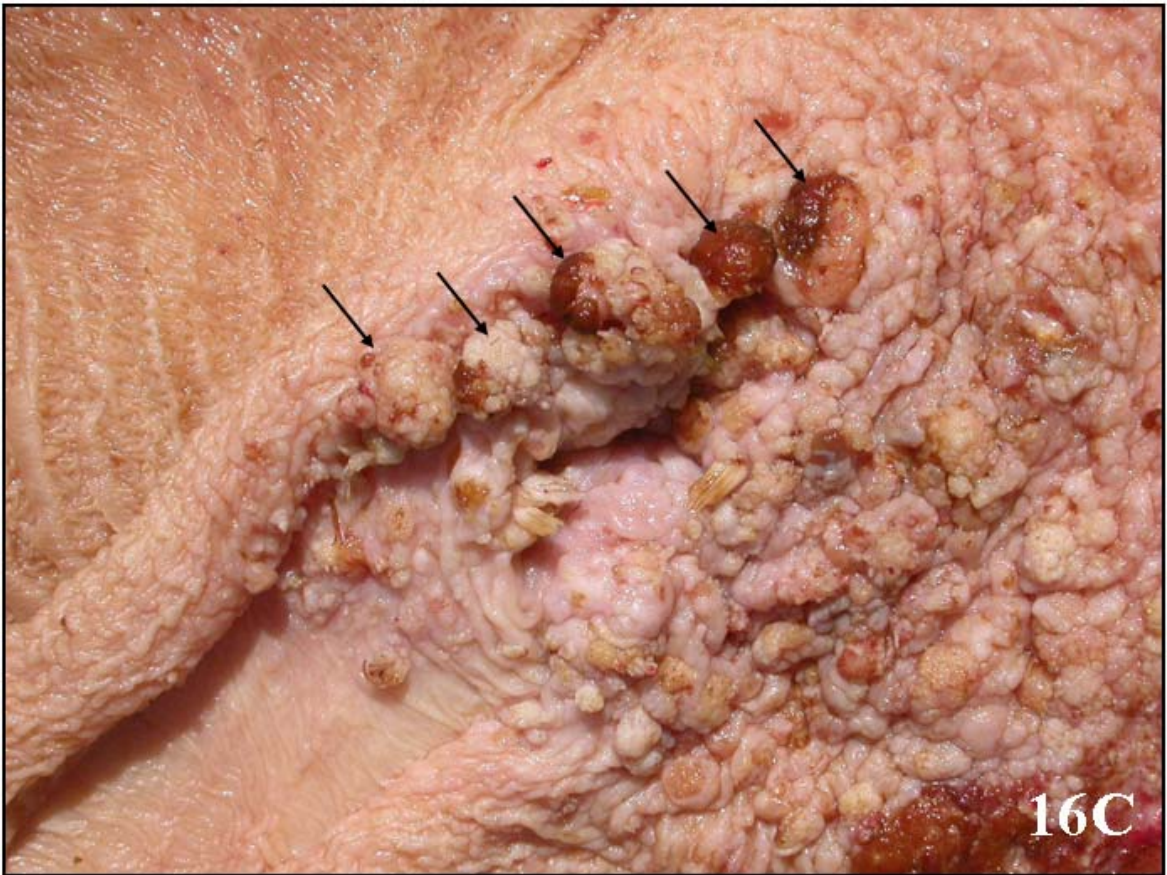
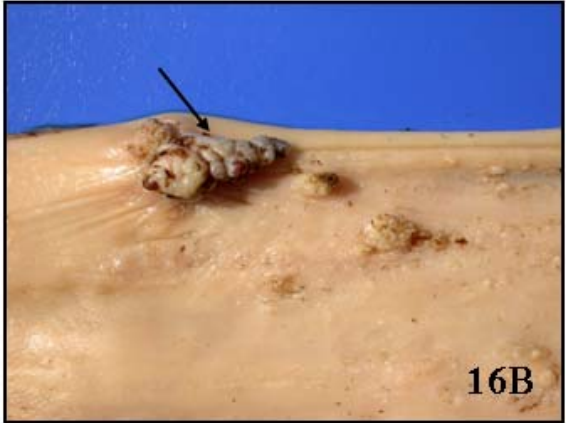


Figura 17. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Aspectos histológicos de papilomas em transformação (PTs) para carcinoma de células escamosas. A. Bovino 4. Ilustração submacroscópica de um papiloma em transformação (PT) 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 .

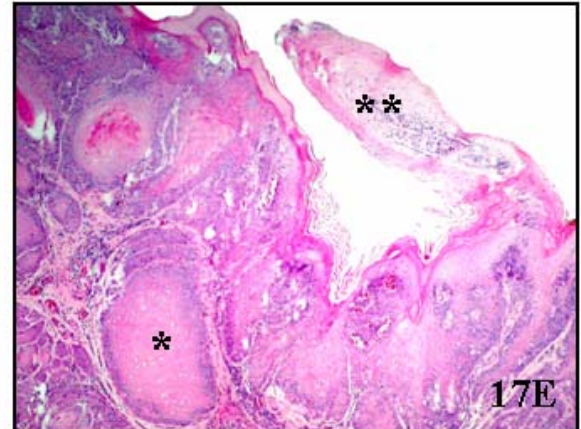
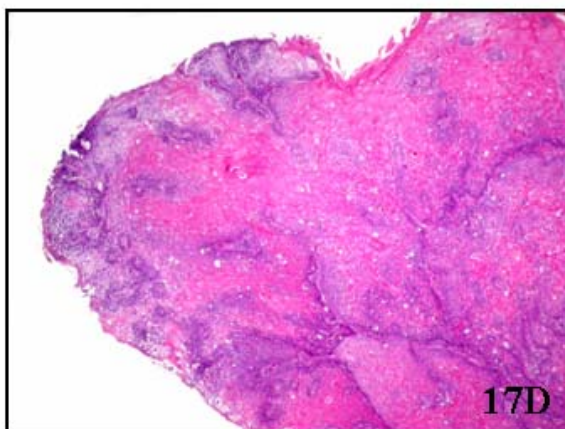
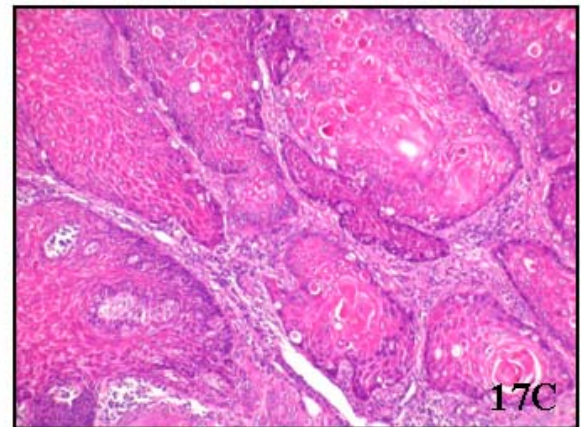
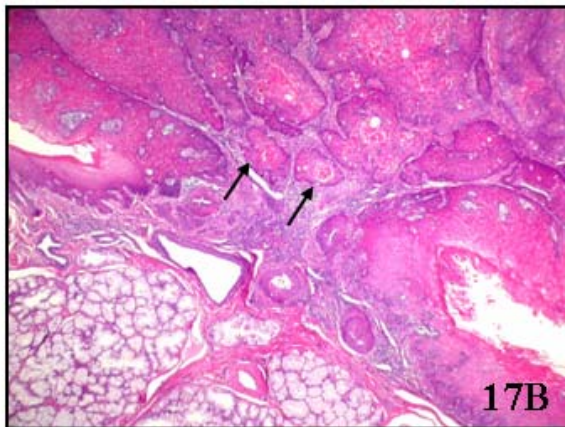
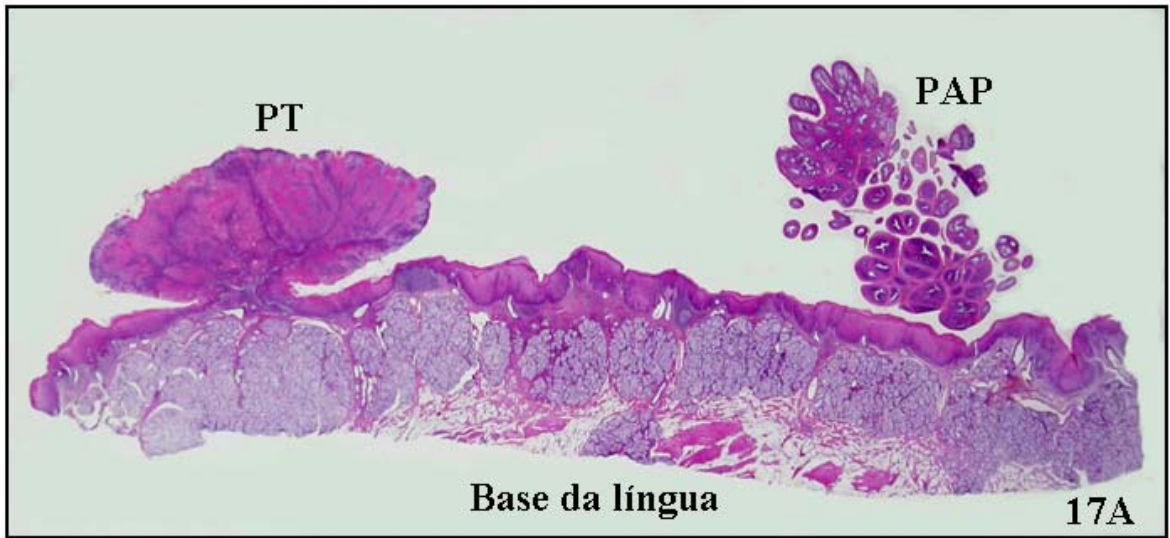


Figura 18. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Encaminhamento dirigido de lesões macroscopicamente compatíveis ou suspeitas de serem carcinomas de células escamosas (CCEs). Bovino 4. a. Papiloma em transformação para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

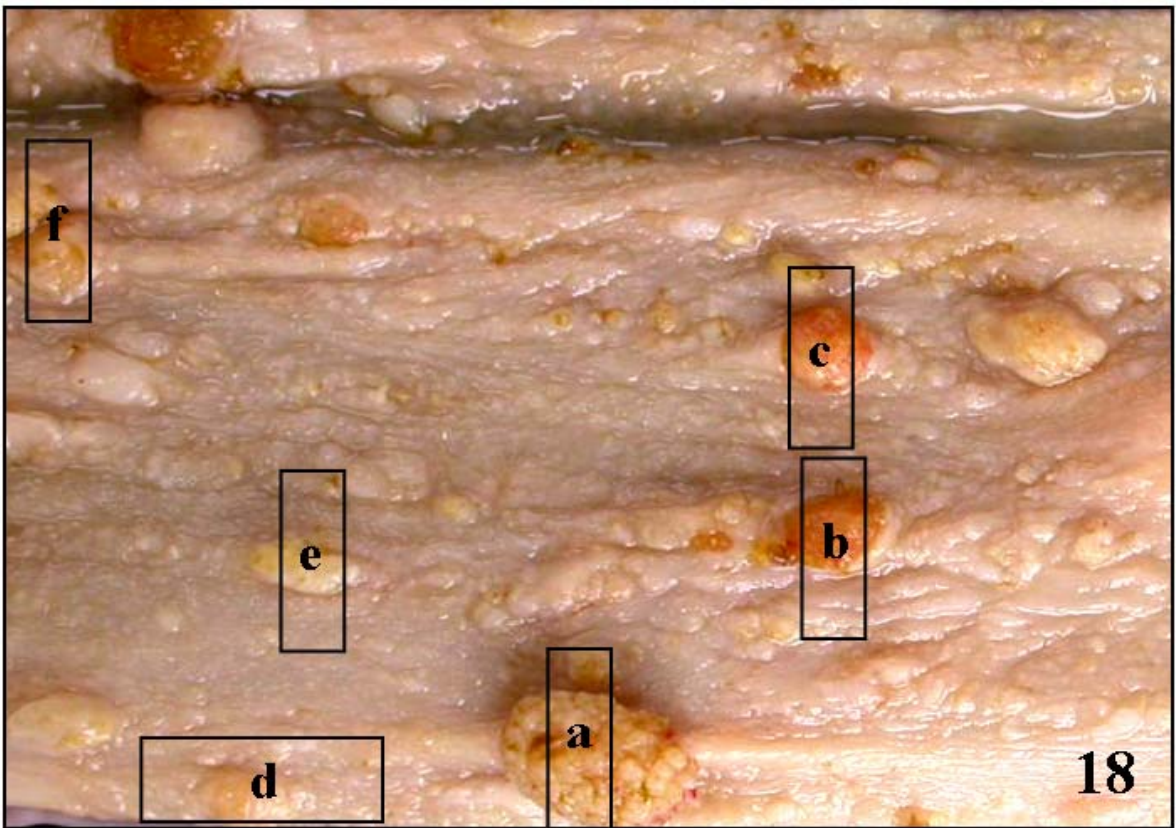


Figura 19. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior. A. Bovino 21. CCE endofítico na base da língua. No detalhe, observam-se áreas amarelas na superfície 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.

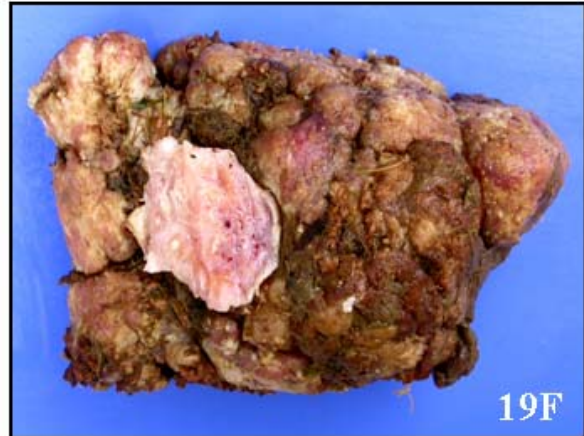
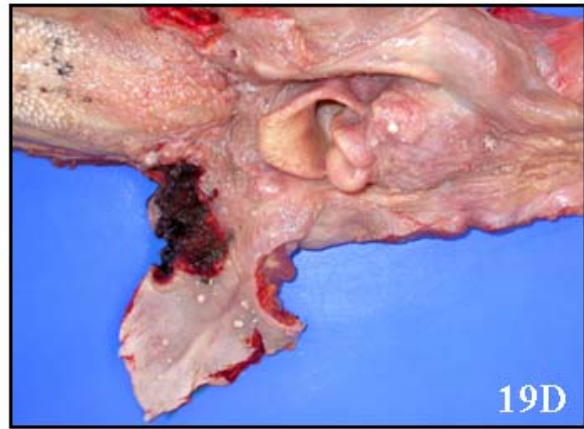


Figura 20. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Bovino 17. Carcinoma de células escamosas (CCE) exofítico e pedunculado na base da língua. Observam-se também papilomas cranialmente ao CCE.



20

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.

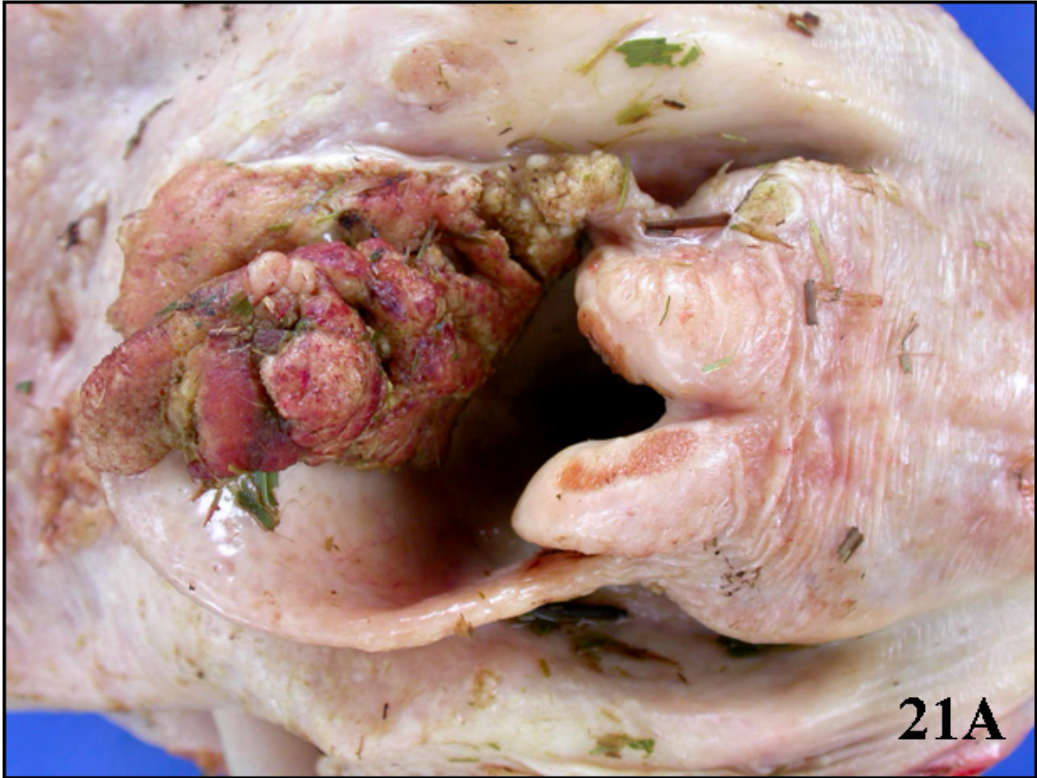


Figura 22. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Espessamentos estenosantes anelares esofágicos que correspondiam microscopicamente a carcinomas de células escamosas. A. Bovino 23. Área rugosa não ulcerada no esôfago cranial.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

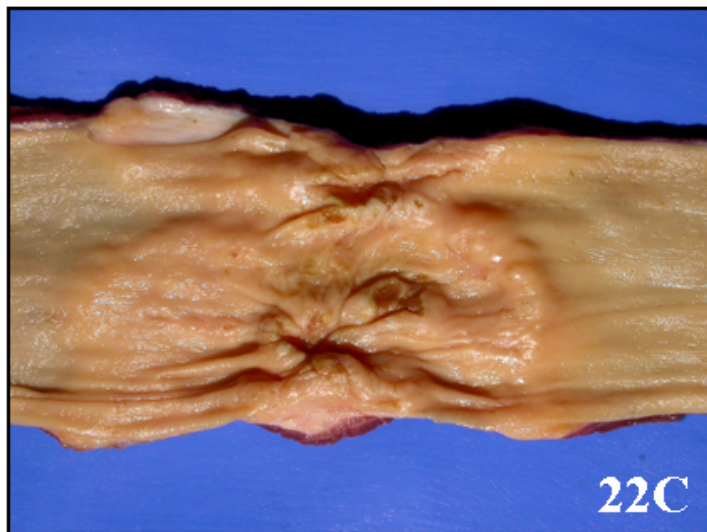


Figura 23. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas (CCEs) no esôfago caudal. A. Bovino 28. CCE ulcerado. B. Bovino 13. Espessamento da parede esofágica por CCE com impactação do conteúdo alimentar.

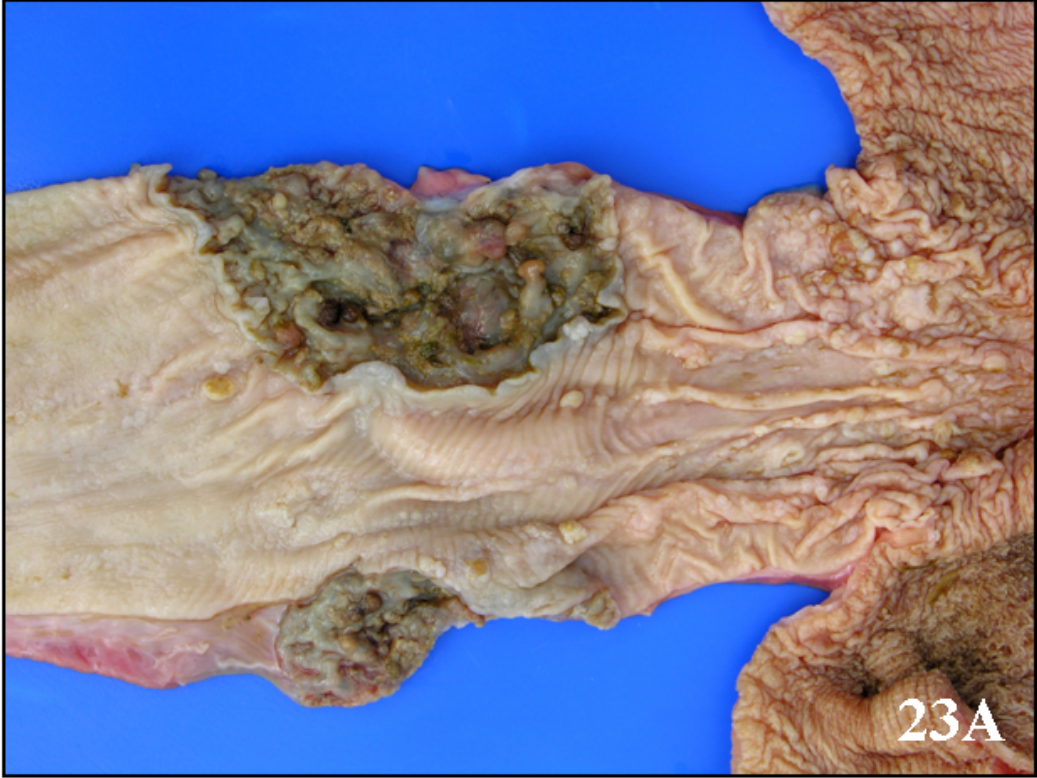


Figura 24. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas ulcerados na entrada do rúmen (ambos causaram timpanismo). A. Bovino 2. B. Bovino 16.

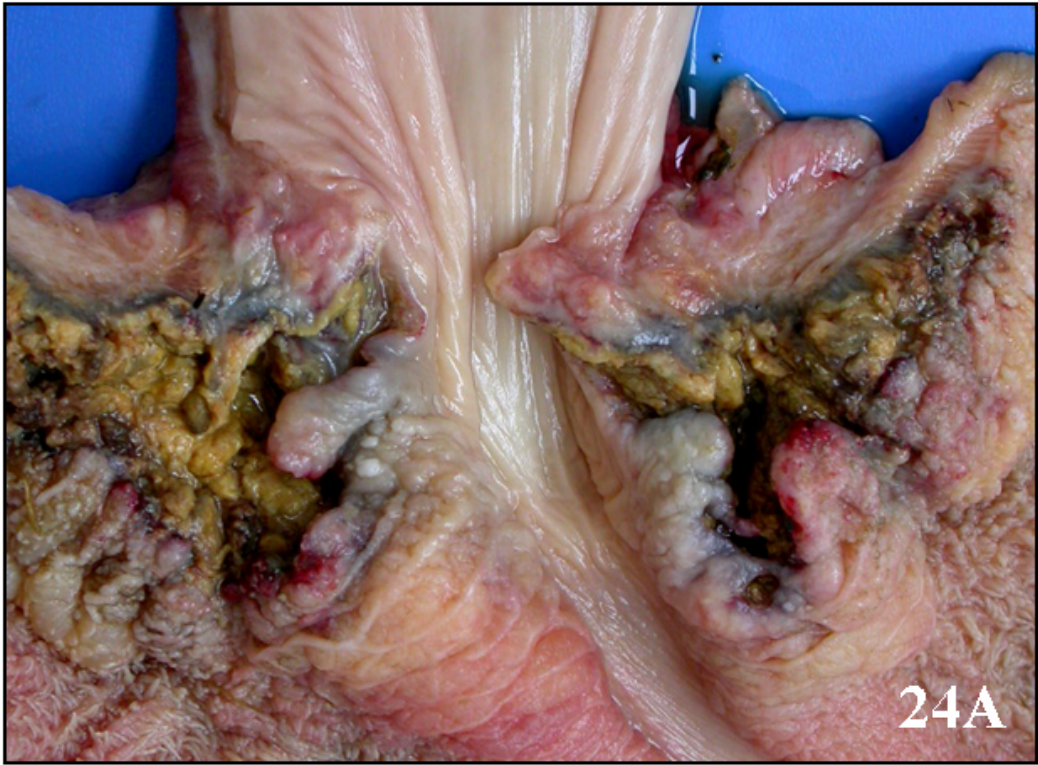


Figura 25. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Carcinomas de células escamosas (CCEs) no rúmen. A. Bovino 22. Extenso CCE ulcerado na goteira esofágica. B. Bovino. 7. Extenso CCE ulcerado. C. Bovino 18. Há nodulações 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.

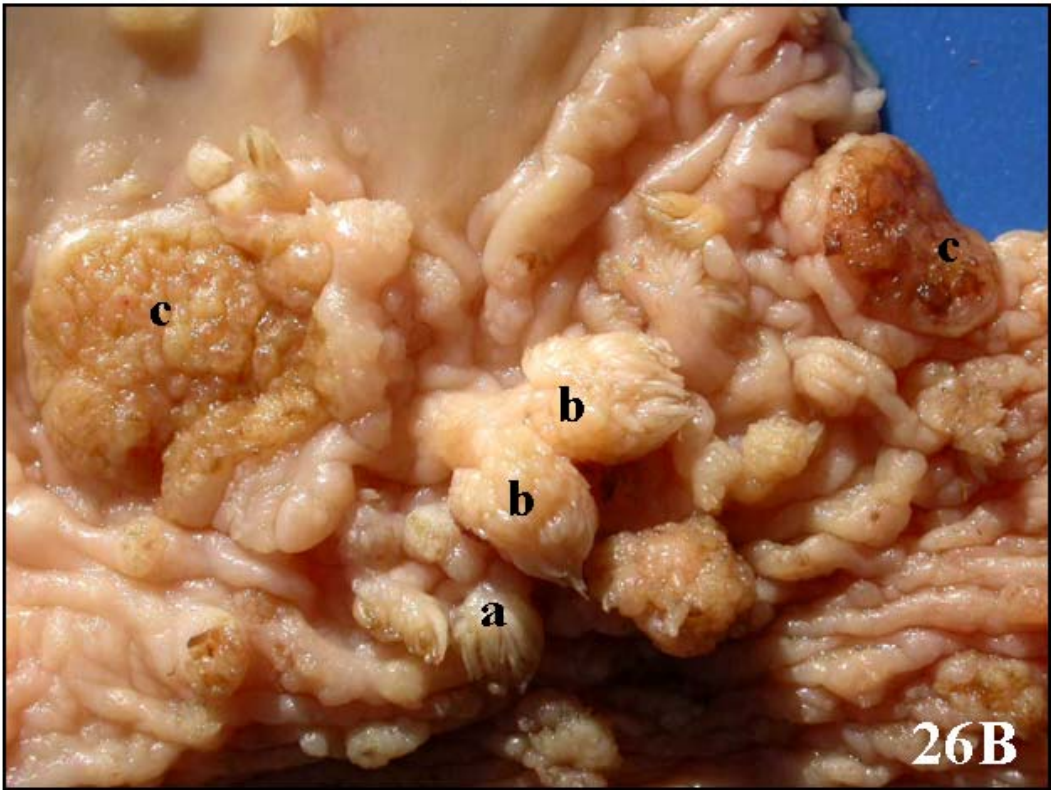


Figura 27. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Aspectos histológicos dos graus de diferenciação celular dos carcinomas de células escamosas (CCE). A. Bovino 15. CCE bem diferenciado. Observam-se ilhas de queratinócitos 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.

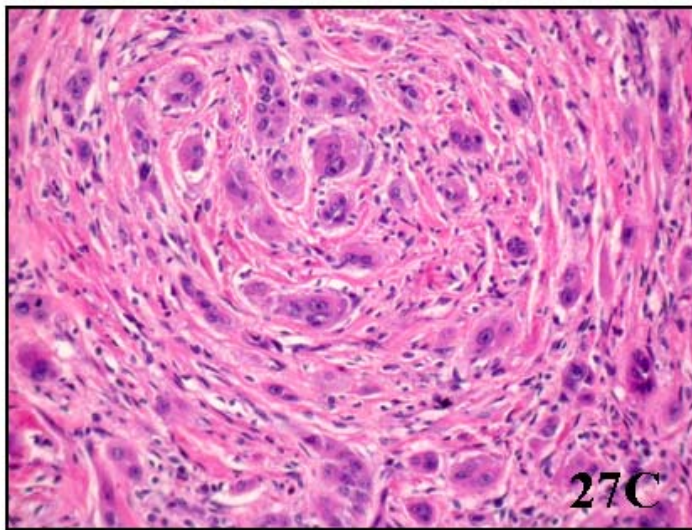
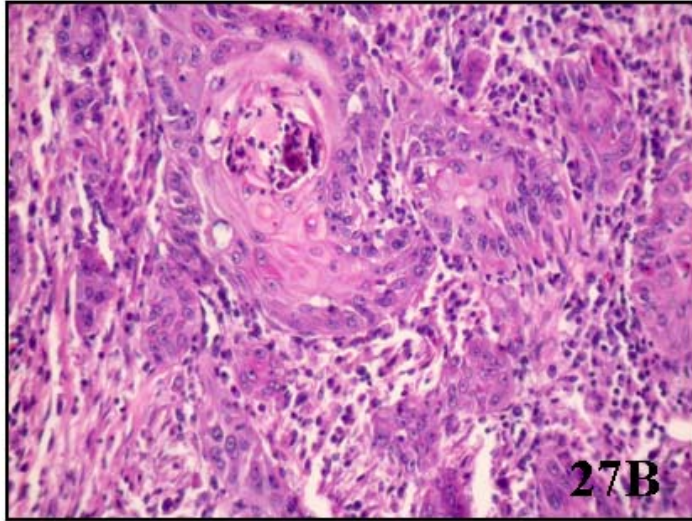
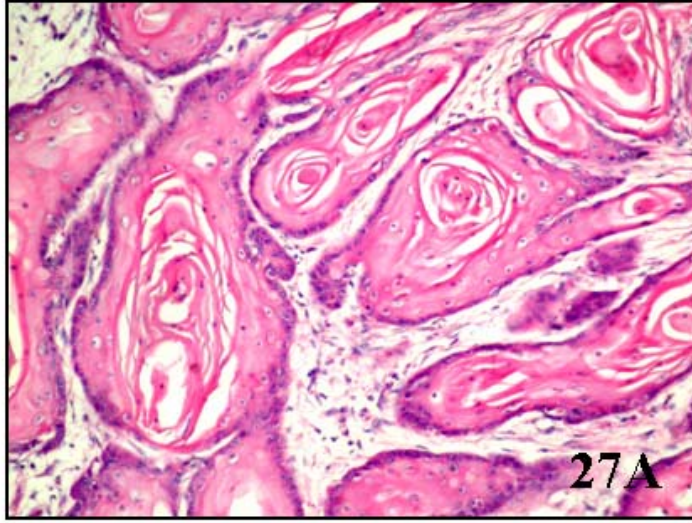


Figura 28. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 4. Carcinoma de células escamosas (CCE) bem diferenciado e invasivo na base da língua (100x). B. Bovino 23. Ilhas de queratinócitos neoplásicos bem diferenciados 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.

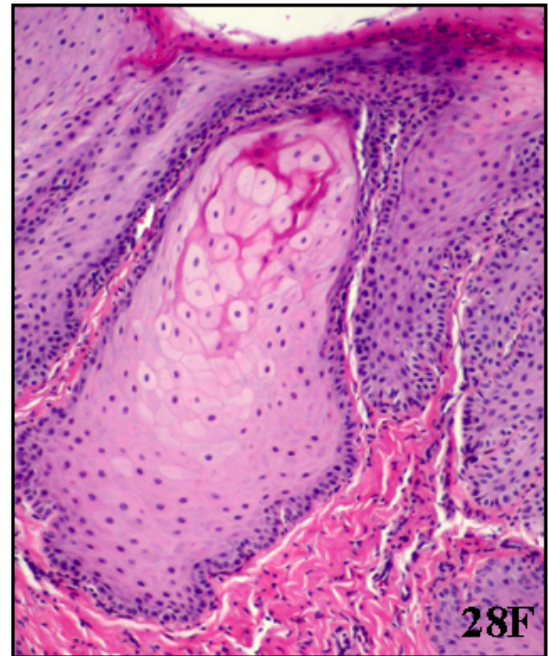
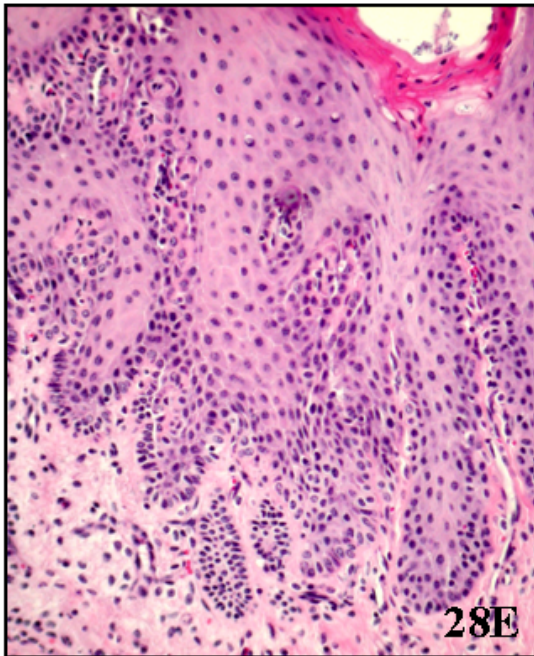
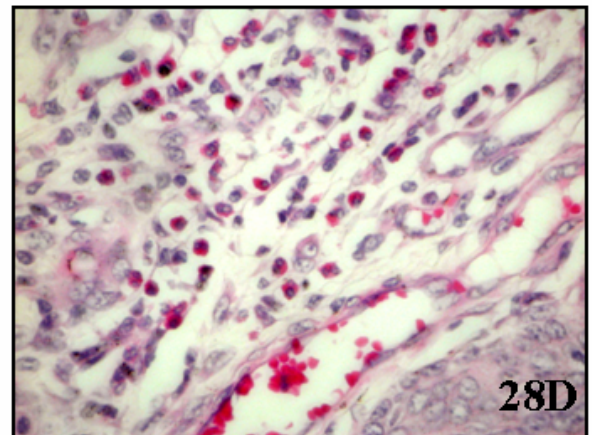
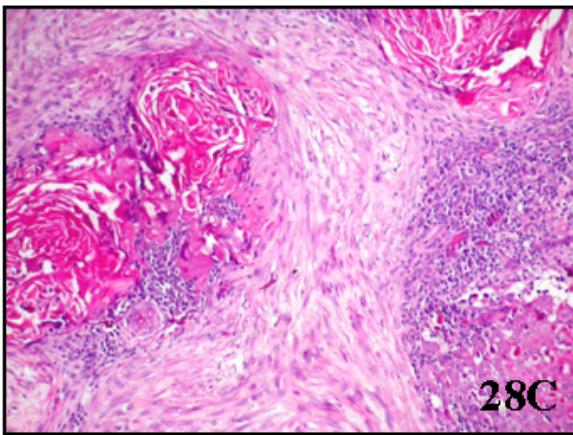
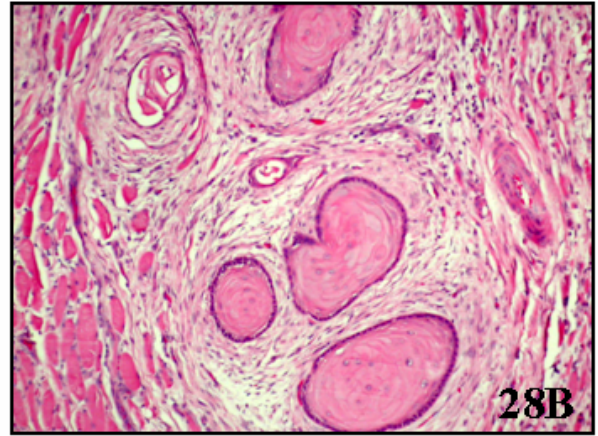
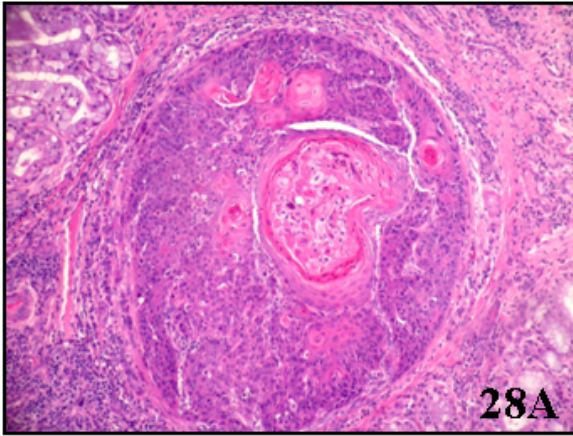


Figura 29. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Metástases de carcinomas de células escamosas nos linfonodos. A. Bovino 1. Linfonodo ruminal mostrando áreas multifocais amarelas correspondendo microscopicamente a intensa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

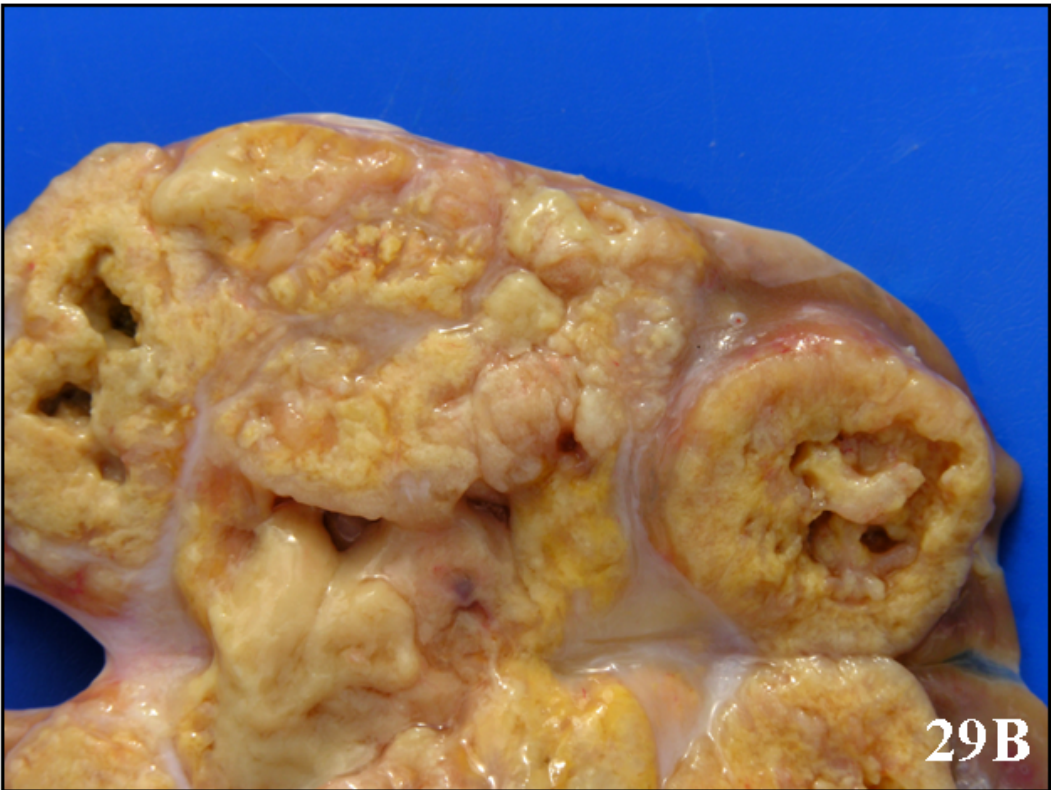


Figura 30. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Metástases de carcinomas de células escamosas (CCEs). A. Bovino 1. Áreas amarelas multifocais nodulares no bordo do fígado. B. Bovino 7. Áreas amarelas subpleurais. C. Bovino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

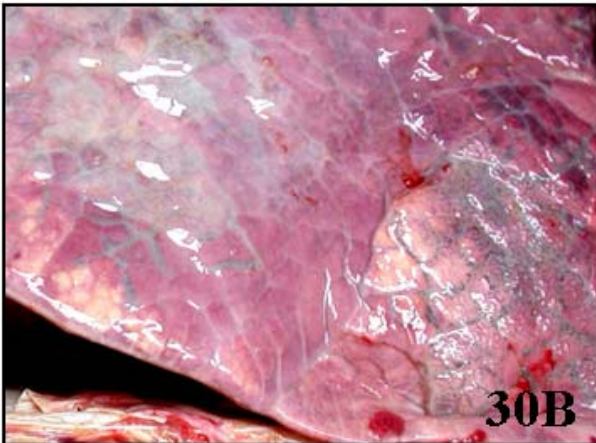


Figura 31. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). A. Bovino 26. Metástase de carcinoma de células escamosas (CCE) bem diferenciado no linfonodo retrofaríngeo esquerdo (200x). B. Bovino 29. Metástase de CCE pouco diferenciado 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.

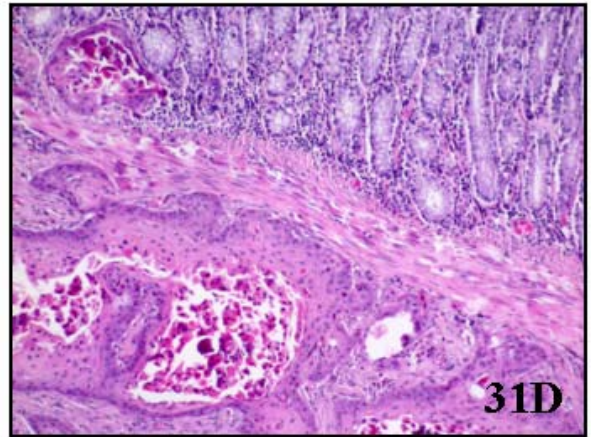
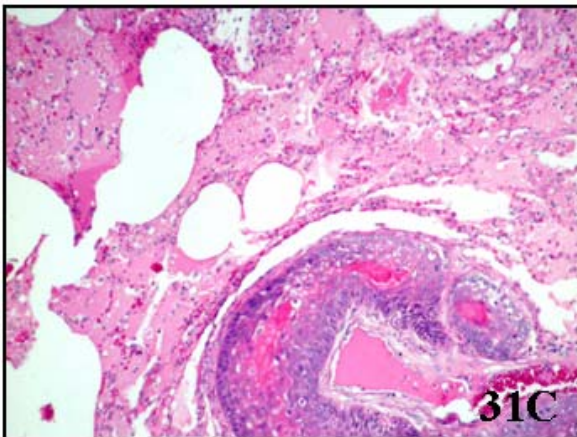
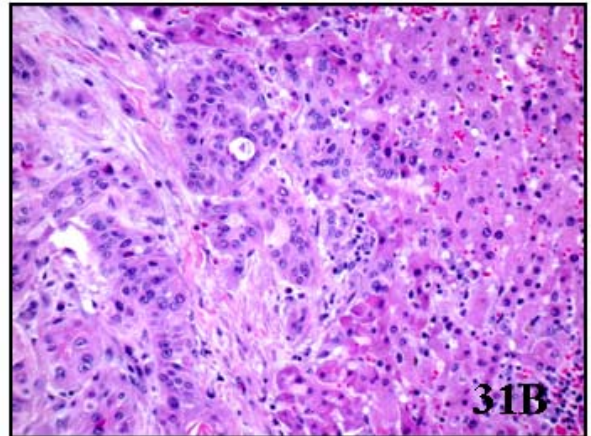
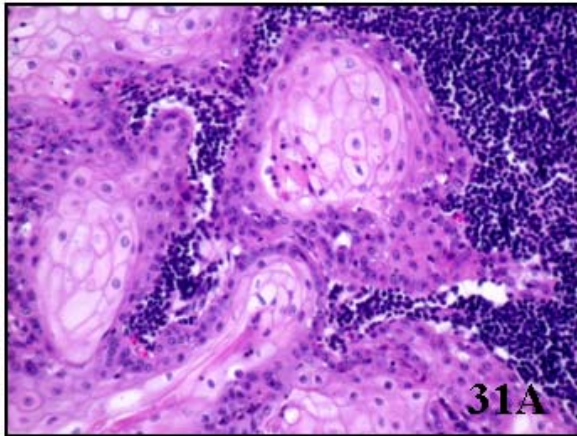
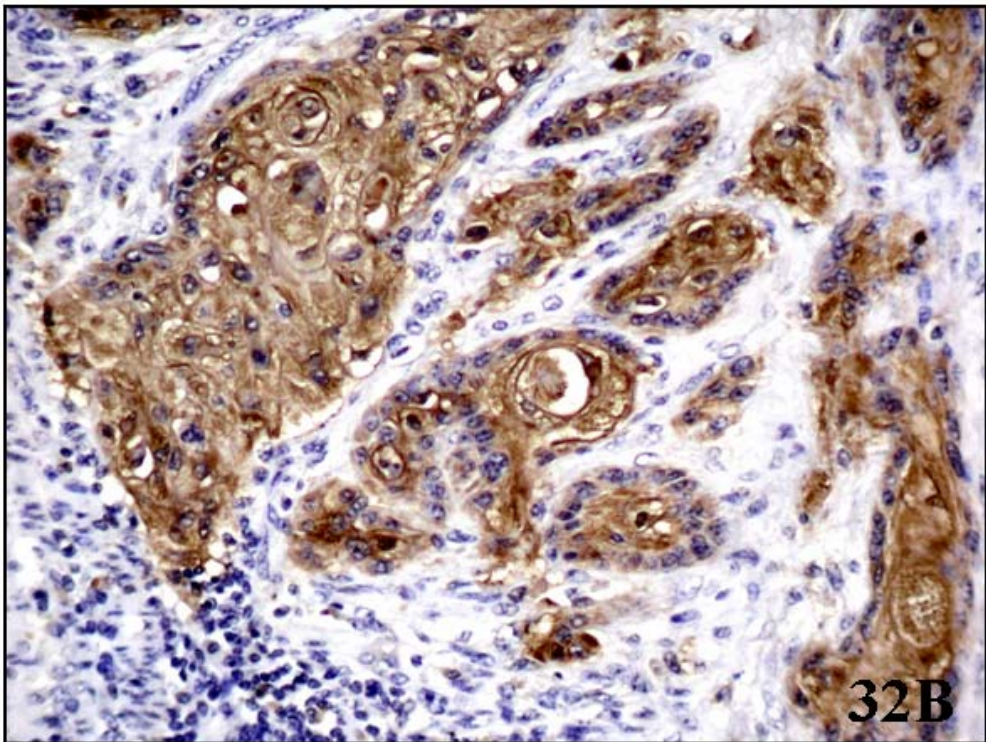
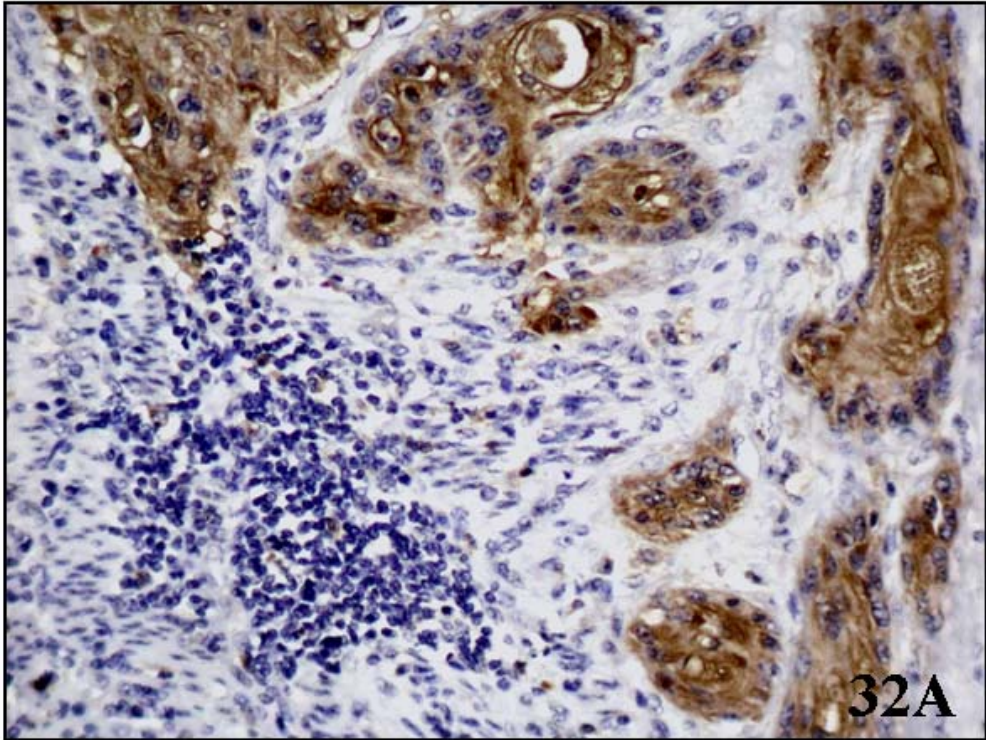


Figura 32. Neoplasias do trato alimentar superior em bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Imunomarcção para pancitoqueratina bovina. A. Bovino 1. Linfonodo ruminal. Queratinócitos neoplásicos fortemente positivos para citoqueratina (200x). B. Magnificação de A (400x). IHQ, LSAB – peroxidase, contracoloração 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 27th NATIONAL OTORHINOLARYNGOLOGY AND HEAD AND NECK SURGERY CONGRESS**, 2005, Antalya, Turkey. Proceedings of 27th 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. ³²P-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, 4th, 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	Língua: múltiplos cistos de <i>Sarcocystis</i> sp. Útero: endometrite fibrinopurulenta subaguda difusa moderada. Encéfalo - Meninges: hemorragias multifocais. Ponte: leucocitostase leve.
02	Língua: múltiplos cistos de <i>Sarcocystis</i> sp. Rim: infarto subagudo focal. Encéfalo - Mesencéfalo: vacuolização neuronal moderada no núcleo vermelho.
03	Pele hirsuta: dermatite eosinofílica e linfo-histioplasmocitária associada a organismos com morfologia compatível com larvas de <i>Dermatobia hominis</i> . Pulmão: enfisema intersticial e interlobular difuso acentuado com fibrose multifocal. Rúmen: numerosos exemplares de trematódeos compatíveis morfologicamente com <i>Paramphistomum</i> sp. Pâncreas: múltiplos nódulos de hiperplasia. Rim: atrofia da gordura perirrenal. Fígado: atrofia do lobo esquerdo. Encéfalo - Córtex telencefálico e cerebelo: manguitos perivasculares discretos.
04	Fígado: telangiectasia multifocal e leve infiltrado inflamatório linfocitário periportal. Encéfalo - Córtex telencefálico, hipocampo, núcleos da base: melanócitos nas leptomeninges. Tálamo: melanócitos nas leptomeninges e vacuolização de neurônio do núcleo habenular.
05	Tegumento e tecido subcutâneo: moderada infestação por <i>Boophilus microplus</i> e <i>Dermatobia hominis</i> .
06	Encéfalo - Tronco encefálico: hemorragia subdural focalmente extensa. Cápsula interna: presença de um exemplar de <i>Sarcocystis</i> sp.
07	Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais: vacuolização neuronal moderada. Bulbo na altura do óbex e mesencéfalo na altura dos colículos rostrais: presença de lipofuscina.
08	Tegumento e tecido subcutâneo: atrofia serosa da gordura. Pulmão: pneumonia granulomatosa com áreas de agudização multifocal acentuada. Fígado: telangiectasia multifocal moderada.
09	Tegumento e tecido subcutâneo: atrofia serosa da gordura. Coração: presença de petéquias no sulco coronário.
10	Tegumento e tecido subcutâneo: atrofia serosa da gordura. Coração (epicárdio): área focalmente extensa de hemorragia.
12	Encéfalo - Rete mirabile carotídea: presença de sangue nos seios venosos. Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais: vacúolos no citoplasma de neurônios do núcleo vermelho.
13	Útero: presença de um feto fêmea com 25 cm de comprimento da nuca ao sacro. Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais: vacúolos no citoplasma de neurônios do núcleo vermelho. Ponte na altura dos pedúnculos cerebelares: lipofuscinosose multifocal.
14	Tegumento e tecido subcutâneo: atrofia serosa da gordura. Intestino delgado: múltiplos nódulos de <i>Oesophagostomum</i> sp. Fígado: atrofia do lado esquerdo. Histo: infiltrado neutrofílico e linfocitário periportal moderado. Vesícula biliar: presença de concreção arenosa de 3 cm de diâmetro. Encéfalo - Rete mirabile carotídea: presença de sangue nos seios venosos. Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais: vacúolos no citoplasma de neurônios do núcleo vermelho.
16	Fígado: abscessos multifocais. Fibrose periportal acentuada. Encéfalo - Mesencéfalo na altura dos colículos rostrais: lipofuscinosose multifocal.
17	Traquéia: edema moderado. Pulmão: enfisema e congestão multifocal moderada. Coração: atrofia serosa da gordura. Rim: atrofia da gordura perirrenal.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)