

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E  
IMUNOISTOQUÍMICA DE BEXIGAS DE BOVINOS COM  
HEMATÚRIA ENZOÓTICA**

**ALEGRE – ES**

**2012**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E  
IMUNOISTOQUÍMICA DE BEXIGAS DE BOVINOS COM  
HEMATÚRIA ENZOÓTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Louisiane de Carvalho Nunes

**ALEGRE – ES**

**2012**

MARIA APARECIDA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E  
IMUNOISTOQUÍMICA DE BEXIGAS DE BOVINOS COM  
HEMATÚRIA ENZOÓTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2012.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Louisiane de Carvalho Nunes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho” campus de Botucatu, SP

*“Há pais que gostam de dar presente. Há pais que gostam de estar presente.  
Há pais que investem para os filhos. Há pais que investem nos filhos.  
Há pais que investem dinheiro nos filhos. Há pais que investem tempo e energia nos  
filhos.  
Há pais que deixam de herança valores em reais. Há pais que deixam de herança  
valores reais.”  
(Guilherme)*

Dedico aos meus pais, Maria da Penha Bersan da Silva e Sebastião Rodrigues da Silva (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, mentor da vida, pelas inúmeras bênçãos recebidas.

À minha mãe, Maria da Penha Bersan da Silva, por quem busco sempre o melhor, o apoio e o amor incondicionais.

Ao meu pai, Sebastião Rodrigues da Silva (*in memoriam*), pelos ensinamentos transmitidos e que ficarão para sempre.

À minha orientadora, Louisiane de Carvalho Nunes, pela confiança depositada na condução deste trabalho como primeira orientada de mestrado e por estar sempre disponível em me atender. Agradeço também pela imensa amizade e pelos exemplos de profissionalismo, dedicação, persistência, humildade e generosidade. Admiro-te, você é uma vencedora.

Aos membros da família Bazoni Giro, em especial, Validoro Bazoni Giro por estar sempre presente tanto nos momentos alegres como nos de dificuldade. Obrigada pelo apoio e compreensão, eles foram essenciais.

A professora Surama Freitas Zanini por despertar em mim o gosto pela pesquisa. Sem sua ajuda eu não teria alcançado esta vitória.

Ao professor Julio Lopes Sequeira da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela gentileza em ceder o laboratório para realização das imunistoquímicas e por transmitir seus conhecimentos.

A professora da Universidade Federal de São João del Rei, Ana Paula Madureira pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo em especial, Douglas Severo Silveira, Érika Takagi Nunes, José Augusto David, Leonardo Oliveira Trivilin, Letícia Leal de Oliveira e Tatiana da Silva Souza, pelo auxílio na condução das aulas durante o período de professora substituta.

A equipe do Matadouro Frigorífico Frigofal pelo auxílio durante a coleta de material.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária e da pós-graduação em Ciências Veterinárias, Arildisson Ribeiro Nunes, José dos Santos Amaral, Madalena

Caetana Capucho e Alessandra Moreira de Souza, pela ajuda em todos os momentos.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, Anderson Barros Archanjo, Dyeime Ribeiro de Sousa, Juliana Castro Cosme, Marcel Arcanjo Silva Azevedo, Marcela Oliveira, Matheus Tomazini Oliveira, Renan Costa Starling, pelo auxílio na coleta e processamento das amostras. Vocês tornaram o trabalho mais ameno, alegre e motivador.

Aos colegas de mestrado, em especial Carlos César Jorden Almança e Cíntia das Chagas Bernardo, pelo imenso auxílio na realização das tarefas, pelas conversas e conselhos e pelos tão gratificantes momentos de lazer. Quem irá esquecer das nossas sextas-feiras?

Aos colegas e também professores substitutos, Elias Werner Terra, Márcio Vargas, Raisal Maria Martins e Thiago Gechel Kloss, pelos momentos de descontração que me davam ânimo para a jornada.

Às eternas amigas Adriana Maioli, Bianka Caliman Salvador, Camila Mognato Scardua, Dagmara Bernabé Scuzato, Elisabete Destéfani de Carvalho, Letícia Vitorazi, Lílian Tonetti Ambrozim, Lucinéia Xavier e Valéria Venturim Alóquio, que mesmo a distância demonstram seu apoio e sua torcida por mim.

As companheiras de república, Ana Cristina Sylvestre, Barbara Rauta Avelar, Cecília Silva Valente, Daiene Gonçalves, Marcela Ramos Sant'Anna, Meire Cassuce e Meridiana Freitas, pelo convívio nestes dois anos.

Aos animais inspiração para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Enfim, agradeço aos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

*“Ótimo é aquele que de si mesmo conhece todas as coisas;  
Bom, o que escuta os conselhos dos homens justos.  
Mas o que por si não pensa, nem acolhe a sabedoria alheia,  
Esse é, em verdade, uma criatura inútil.”*

(Hesíodo)

## RESUMO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é causada pela ingestão crônica de *Pteridium aquilinum* e caracteriza-se pela presença de sangue na urina e desenvolvimento de lesões na bexiga, sendo responsável por grandes perdas econômicas. A intoxicação por esta planta também pode ocorrer em humanos. Objetivou-se avaliar lesões de bexigas de animais com HEB na região sul do Espírito Santo. Para isto, foram avaliadas 350 bexigas de bovinos em matadouro frigorífico e, destas, selecionadas 46 que apresentavam lesões macroscópicas e/ou hematúria. Amostras de cada bexiga foram fixadas em formol a 10% submetidas ao processamento histológico de rotina e classificadas histomorfologicamente. A imunoistoquímica foi realizada com anti-vimentina, anti-citoqueratina, anti-CD31, anti-VEGF e anti-uroplaquina apenas nas 26 bexigas que revelaram neoplasia. Lesões não neoplásicas foram observadas em 100% das amostras e neoplásicas em 56,52%. A presença de neoplasias foi significativa ( $p < 0,05$ ) na porção caudal da bexiga. As neoplasias encontradas foram carcinoma urotelial; carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma. Houve maior frequência de displasia, metaplasia de células claras, inflamação e espessamento vascular em bexigas com neoplasia. A expressão de citoqueratina foi significativa ( $p < 0,05$ ) nas neoplasias epiteliais e vimentina nas mesenquimais. A marcação da uroplaquina III diferiu nos diversos tipos neoplásicos e revelou-se típica e atípica enquanto que a do CD31 foi significativa ( $p < 0,05$ ) nas neoplasias mesenquimais vasculares. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de vasos extratumorais marcados pelo VEGF entre os mixomas e adenocarcinomas e nos vasos intratumorais marcados por CD31 e VEGF nos diferentes tipos tumorais. Houve correlação positiva entre os vasos extra e intratumorais nos hemangiomas, hemangiossarcomas e mixomas marcados pelo CD31; nos hemangiomas, mixomas e adenocarcinomas marcados pelo VEGF; entre a expressão de vimentina e CD31 e entre citoqueratina e uroplaquina. Conclui-se que bexigas de bovinos com HEB apresentam lesões não neoplásicas e neoplásicas, isoladas ou associadas. Os biomarcadores auxiliam na diferenciação da histogênese das neoplasias epiteliais e mesenquimais vasculares. Uroplaquina demonstrou-se efetiva para a avaliação da integridade urotelial e os marcadores vasculares (CD31 e VEGF) para a integridade endotelial e para o prognóstico.

**Palavras-chave:** HEB. neoplasia. PECAM-1. VEGF. uroplaquina.

## ABSTRACT

Bovine enzootic hematuria (BEH) is caused by chronic ingestion of *Pteridium aquilinum* and is characterized by the presence of blood in the urine and development of lesions in the urinary bladder and is responsible for economic losses. Poisoning by this plant can also occur in humans. The objective was to evaluate the lesions in bladders of animals with BEH in the south region of the Espírito Santo. For this, were evaluated 350 bladders of bovines in a slaughterhouse and, of these, selected 46 that had macroscopic lesions and/or hematuria. Samples of each bladder were fixed in formalin 10% submitted to histological processing and classified by histomorphology. The immunohistochemistry was performed with anti-vimentin, anti-cytokeratin, anti-CD31, anti-VEGF and anti-uroplakin only in the 26 bladders that presented neoplastic lesions. Non-neoplastic lesions were observed in 100% of samples and the neoplastic in 56.52%. The presence of tumors was significant ( $p < 0.05$ ) in the caudal portion of the bladder. Detected neoplastic types were urothelial carcinoma, *in situ* carcinoma, adenocarcinoma, hemangioma, myxoma and hemangiosarcoma. There was a higher frequency of dysplasia, clear cell metaplasia, inflammation and vascular thickening in bladders with neoplasm. The expression of cytokeratin was significant ( $p < 0.05$ ) in epithelial neoplasms and vimentin in mesenchymal neoplasms. Uroplakin III differed in varied types of neoplastic lesions and showed to be typical and atypical while that of CD31 was significantly ( $p < 0.05$ ) in vascular mesenchymal neoplasms. A significant difference ( $p < 0.05$ ) in the number of vessels extratumorais stained by VEGF between myxomas and adenocarcinomas, and in intratumoral vessels stained by CD31 and VEGF in the different tumor types. Positive correlation existed between the number of intra- and extratumoral vessels in hemangiomas, hemangiosarcomas, and myxomas stained by CD31; between hemangiomas, myxomas, and adenocarcinomas stained with VEGF; between the expression of vimentin and CD31 and between cytokeratin and uroplakin. It is concluded that bladders from bovines with BEH have non-neoplastic and neoplastic lesions, isolated or associated. Biomarkers aid in the differentiation of the histogenesis of epithelial and vascular mesenchymal neoplasms. Uroplakin demonstrated to be effective for the assessment of integrity urothelial, and vascular markers (CD31 and VEGF) for endothelial integrity and for prognosis.

**Key works:** BEH. neoplasm. PECAM-1. VEGF. uroplakin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomacrografia de bexiga de bovino com hematúria enzootica, (amostra P241/10) com a ilustração da divisão em quadrantes. A e B – quadrantes localizados na porção cranial da bexiga e C e D – quadrantes localizados na porção caudal da bexiga..... 34
- Figura 2 – Fotomacrografia de lesões macroscópicas encontradas na mucosa da bexiga de bovinos com hematúria enzoótica. A – lesão hemangiomasosa (seta) e petéquias (cabeça de seta), amostra P227/10. B – lesão sobrelevada em placa (seta), amostra P217/10. C – lesão papilomasosa (seta), amostra P456/10. D – lesão brancacenta deprimida (seta), amostra P244/10..... 36
- Figura 3 – Fotomicrografia de lesões não neoplásicas observadas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica. A – metaplasia de células claras (MC) e no urotélio e inflamação (I) na lâmina própria, amostra P241/10. B – cistite cística (CC) e ninhos de Brunn (NB), amostra P229/10. C – hiperplasia urotelial (DP) e proliferação vascular (PV) na lâmina própria, amostra P421/10. D – displasia urotelial (DP), hemorragia (H) e proliferação vascular (PV) na lâmina própria, amostra P229/10. Coloração de hematoxilina-eosina, objetiva de 20x (barra= 50µm)..... 37
- Figura 4 – Fotomicrografia de lesões neoplásicas observadas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica. A – carcinoma urotelial (seta), amostra P456/10. B – adenocarcinoma (seta), amostra P241/10. C – hemangioma (seta), amostra P456/10. D – mixoma (seta), amostra P449/10. Coloração de hematoxilina-eosina, objetiva de 10x (barra= 100µm)..... 38
- Figura 5 – Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia epitelial maligna (carcinoma urotelial, P 226/10). Marcação positiva de citoqueratina (1:800) em células neoplásicas. Objetiva de 40x (barra= 20µm)..... 56

Figura 6 –	Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia benigna (hemangioma, P 229/10). Marcação positiva de vimentina (1:1000) em células neoplásicas. Objetiva de 20x (barra= 50µm).....	56
Figura 7 -	Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular maligna (hemangiossarcoma, P241/10). Expressão moderada de CD31 (1:200) em endotélio de vasos neoplásicos (seta) e acentuada (cabeça de seta) em endotélio de vasos não neoplásicos. Objetiva de 20x (barra= 50µm).....	58
Figura 8 -	Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica (P 217/10). Marcação positiva de uroplaquina (1:100) caracterizando urotélio atípico (seta). Objetiva de 40x (barra= 20µm).....	60
Figura 9 -	Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular maligna (hemangiossarcoma, P 241/10). Expressão moderada de CD31 (1:200) em endotélio de vasos neoplásicos (seta). Objetiva de 10x (barra= 100µm).....	79
Figura 10 -	Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular benigna (hemangioma, P244/10). Expressão leve de VEGF (1:100) em endotélio de vasos neoplásicos (cabeça de seta) e acentuada (seta) em endotélio de vasos não neoplásicos. Objetiva de 20x (barra= 50µm).....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos diferentes tipos de neoplasias encontradas em cada região da bexiga em bovinos com hematúria enzoótica na microrregião do Caparaó, Espírito Santo.....	39
Tabela 2 -	Intensidade da marcação do VEGF nos vasos intratumorais dos diferentes tipos de neoplasias encontradas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica (HEB).....	81
Tabela 3 -	Valores médios do número de vasos sanguíneos extra e intratumorais marcados pelo CD31 e VEGF nos diferentes tipos de neoplasias encontradas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica (HEB).....	83

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<i>Pteridium aquilinum</i> E SEUS PRINCÍPIOS TÓXICOS.....	16
2.2	EFEITOS TÓXICOS DE <i>Pteridium aquilinum</i> .....	18
2.3	HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.....	20
2.3.1	Epidemiologia.....	20
2.3.2	Sinais clínicos.....	20
2.3.3	Diagnósticos hematológicos, bioquímicos e urinários.....	21
2.3.4	Diagnóstico macroscópico.....	22
2.3.5	Diagnóstico microscópico.....	23
2.3.6	Métodos auxiliares no diagnóstico da HEB.....	25
2.3.6.1	Histoquímica.....	25
2.3.6.2	Imunoistoquímica.....	25
2.3.6.3	Outros métodos de diagnóstico.....	28
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	29
<b>3</b>	<b>Cap. 1 – Lesões neoplásicas e não neoplásicas da bexiga associadas à hematuria enzoótica bovina</b> .....	30
3.1	RESUMO.....	30
3.2	ABSTRACT.....	31
3.3	INTRODUÇÃO.....	32
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.5	RESULTADOS.....	35
3.6	DISCUSSÃO.....	40
3.7	CONCLUSÕES.....	43
3.8	AGRADECIMENTOS.....	43
3.9	REFERÊNCIAS.....	43
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	47
<b>4</b>	<b>Cap. 2 – Caracterização imunoistoquímica de neoplasias de bexigas associadas à hematuria enzoótica bovina</b> .....	48

4.1	RESUMO.....	48
4.2	ABSTRACT.....	49
4.3	INTRODUÇÃO.....	50
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.6	CONCLUSÕES.....	62
4.7	AGRADECIMENTOS.....	63
4.8	REFERÊNCIAS.....	63
	<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>70</b>
5	<b>Cap. 3 – Expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica: avaliação intra e extratumoral.....</b>	<b>71</b>
5.1	RESUMO.....	71
5.2	ABSTRACT.....	73
5.3	INTRODUÇÃO.....	74
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
5.5	RESULTADOS.....	78
5.6	DISCUSSÃO.....	84
5.7	CONCLUSÕES.....	89
5.8	AGRADECIMENTOS.....	90
5.9	REFERÊNCIAS.....	90
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>97</b>
7	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença não infecciosa e crônica, causada pela intoxicação por *Pteridium aquilinum*, planta conhecida vulgarmente como samambaia. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de neoplasias na mucosa da bexiga dos bovinos, quando ocorre ingestão da planta. Clinicamente, os animais afetados, apresentam hematúria intermitente e morte por anemia, uma vez que ocorre perda de sangue sem reposição pela medula (anemia aplástica) (RADOSTITIS et al., 2007). Para que a HEB ocorra é necessário, a ingestão por bovinos, de *P. aquilinum* em uma quantidade inferior a  $10\text{g kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ , durante um ou mais anos (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Na microrregião do Caparaó, ES, Silva et al. (2009) encontraram alta prevalência de bovinos com HEB (56,4%) ao constatarem 22 animais com hematúria dentre 39 bovinos enfermos. Estes autores também afirmaram que nesta região há clima e solo propícios ao crescimento e desenvolvimento da *P. aquilinum*. Desta forma, a HEB tem se tornado um problema econômico importante para os produtores da região, tendo em vista a diminuição da produção de leite e às mortes dos animais acometidos (NUNES, 2009).

As lesões hemangiomasas que são observadas na parede da bexiga de animais com HEB podem estar relacionadas a diversos tipos de processos neoplásicos de origem epitelial e mesenquimal (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Peixoto et al. (2003) afirmaram que em um mesmo animal podem existir mais de um tipo de neoplasma, e que a histogênese destes tumores é variada. De acordo com Souto et al. (2006), o diagnóstico de HEB é estabelecido com base na epidemiologia, sinais clínicos e nas lesões macroscópicas e microscópicas da bexiga.

Tendo em vista a histogênese variada dos neoplasmas, a classificação tumoral pelo exame histopatológico de rotina torna-se difícil, necessitando, algumas vezes, da realização de técnicas mais específicas. A imunistoquímica possibilita o diagnóstico preciso das neoplasias e o estudo de sua origem, bem como a detecção de antígenos tissulares *in situ* por meio de anticorpos específicos e moléculas marcadoras, combinados por meio de técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas (RAMOS-VARA, 2005). Ruiz et al. (2005) comprovaram que a técnica de imunistoquímica tem eficiência em patologia veterinária, permitindo a utilização de um espectro amplo de indicadores, incluindo aqueles para uso humano.

Desta forma, Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006) avaliaram histologicamente tumores na bexiga de animais com HEB e encontraram como principais tumores malignos e benignos de origem epitelial e mesenquimal, carcinoma de células de transição (41,4%), hemangioma (29,5%), papiloma (9,6%) e hemangiossarcoma (4,9%). Por meio da técnica de imunistoquímica, Ramos-Vara (2005) citou que os tumores epiteliais como papilomas e carcinoma transicionais são positivos para marcadores biomoleculares como citoqueratina e uroplaquina III e, para os tumores de origem mesenquimal, como os vasculares, a vimentina, CD31 e o VEGF podem ser mais específicos. Isto demonstra que a caracterização imunistoquímica auxilia na detecção da origem tumoral e isto pode influenciar no prognóstico.

Objetivou-se com esta pesquisa realizar uma avaliação histopatológica e imunistoquímica das neoplasias de bexigas de animais que apresentam hematúria enzoótica bovina na região sul do Espírito Santo a fim de verificar a histogênese tumoral.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Pteridium aquilinum* E SEUS PRINCÍPIOS TÓXICOS

A *Pteridium aquilinum*, conhecida popularmente como “samambaia-do-campo” ou simplesmente “samambaia”, pertence à família Polypodiaceae, ao gênero *Pteridium* que compreende apenas uma só espécie, *P. aquilinum* que, por sua vez, contém duas subespécies *P. aquilinum aquilinum* e *P. aquilinum caudatum*. Entretanto, no Brasil, encontra-se a *P. aquilinum*, subespécie *caudatum*, variedade *arachnoideum* que ocorre em regiões montanhosas e serras do Sul e Sudeste, desenvolvendo-se melhor em zonas frias, de boa pluviosidade e com solos bem drenados e ácidos (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

*Pteridium aquilinum* é uma planta rizomatosa com folhas grandes bipinadas que medem de 60 a 180 cm de comprimento e 60 a 120 cm de largura. As folhas formam touceiras densas, ou se estendem ao longo dos rizomas que ficam profundamente enterrados, o que permite à planta resistir às queimadas. A espécie é considerada invasora, sendo bastante frequente em solos ácidos, arenosos e de baixa fertilidade, infestando campos, encosta de morros, matas ciliares, capoeiras, beiras de matas e estradas. *Pteridium aquilinum*, se mantém exuberante em ambientes onde há pouca competição, por isso, a remoção da cobertura vegetal cria o habitat ideal para a invasão. Quando infesta pastos, sua erradicação é muito difícil, pois seus rizomas penetram profundamente no solo e voltam a brotar mesmo quando as pastagens são renovadas e seus esporos podem viajar por quilômetros carregados pelo ar e colonizar outras áreas das pastagens (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008)

*Pteridium aquilinum* é considerada uma das plantas tóxicas mais importantes no mundo, apresenta distribuição cosmopolita e causa quadros de intoxicação em várias espécies de animais, principalmente em rebanhos bovinos e equinos de diversas partes do mundo (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Apresenta alto potencial carcinogênico, que pode ser observado tanto em animais, quanto em seres humanos que consomem a planta (ALONSO-AMELOT, 1999; SUGIMURA,

2000). *Pteridium* spp. é a única planta conhecida capaz de levar ao surgimento natural de neoplasias em animais (SMITH, 1997).

*Pteridium aquilinum* apresenta vários princípios tóxicos. Dentre eles, destacam-se a tiaminase e o ptaquilosídeo. A tiaminase é uma enzima que hidrolisa a tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) inativando-a. Sua inibição altera o metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas, isso ocorre, pois a tiamina é um cofator em reações de descarboxilação, como a conversão do piruvato a acetil-CoA e a oxidação de  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA. A tiaminase é a responsável por quadros neurológicos observados somente em monogástricos, pois ruminantes tem produção de tiamina por microorganismos do rúmen (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

O ptaquilosídeo é um glicosídeo carcinogênico encontrado em *Pteridium aquilinum* (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008) e pode ser encontrado no leite de vacas que consomem a samambaia (ALONSO-AMELOT; CASTILLO; DE JONGH, 1993). O ptaquilosídeo é um composto instável em solução aquosa na presença de ácido, base ou calor, degradando-se rapidamente em pterosina B e D-(+) glicose. Em condições alcalinas o ptaquilosídeo pode dar origem a um conjugado denominado dienona. A dienona é o verdadeiro composto tóxico da samambaia, pois apresenta o anel ciclopropil aberto e promove o aparecimento de uma terminação livre (OH), que interage, preferencialmente com um átomo de nitrogênio da base adenina do DNA. Portanto, por atravessar a membrana celular e nuclear da célula, a dienona pode associar-se ao DNA, provocando uma alteração permanente e irreparável em determinados genes, propiciando a formação e multiplicação de um tecido afuncional e neoplásico (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Como os ruminantes apresentam urina e saliva alcalina (RADOSTITIS et al., 2007) as neoplasias se desenvolvem principalmente nas vias digestivas superiores e na bexiga urinária, no entanto para que isso ocorra é necessário que ocorra uma ingestão crônica da planta (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). O ptaquilosídeo afeta também a medula óssea causando anemia aplástica crônica (SCHALM; JAIN, 1986).

## 2.2 EFEITOS TÓXICOS DE *Pteridium aquilinum*

O principal fator que faz com que os animais consumam a samambaia é a fome, que pode ser decorrente de uma superlotação dos pastos, que ocasiona falta de material fibroso na alimentação e de períodos de seca. Os animais podem ainda ser intoxicados ao serem colocados em pastos contaminados após transporte prolongado, pelo hábito de comerem a planta e pelo uso de fenos contaminados (GAVA, 1994).

Os animais acometidos pelos compostos químicos de *P. aquilinum* podem desenvolver diversos quadros clínicos. Em equinos é possível observar sinais neurológicos e em bovinos pode-se observar três quadros clínicos de intoxicação (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Animais monogástricos, principalmente os equinos, quando intoxicados pela ingestão de *P. aquilinum* apresentam sintomatologia neurológica. A morte pode ser precedida de espasmos clônicos e opistótono. Deve-se fazer diferenciação com raiva, encefalomielite e leucomalácia equina (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMONETO, 2008).

Bovinos que ingerem quantidades iguais ou superiores a  $10\text{g kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ , por 2-11 semanas podem desenvolver um quadro agudo de diátese hemorrágica (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

A diátese hemorrágica manifesta-se clinicamente nos animais como uma síndrome hemorrágica, acompanhada por temperatura retal elevada, petéquias pela pele e mucosas visíveis, corrimento nasal muco-sanguinolento, diarreia com sangue, (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; MARÇAL et al., 2002) e hemorragias em locais de punção por agulha (RISSI et al., 2007). A morte pode ocorrer até 72 horas após o início dos sintomas (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; MARÇAL et al., 2002).

Em animais que morreram em decorrência da diátese hemorrágica, ao se realizar a necropsia é possível observar: lesões hemorrágicas no subcutâneo, hemorragias no baço, intestino e bexiga, úlceras nas mucosas do abomaso e intestino delgado, edema e petéquias no trato digestivo, restos de samambaia no rúmen (MARÇAL et al., 2002) e áreas de infarto nos rins e fígado (RISSI et al., 2007). Ao realizar o exame histopatológico pode-se encontrar rarefação de tecido hematopoiético na medula óssea, depressão da série megacariocítica e

granulocítica (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; MARÇAL et al., 2002; RISSI et al., 2007), hemorragias intramurais e nas serosas de vários órgãos, áreas focais de necrose invadidas por bactérias, principalmente no fígado e rim, trombos e áreas de necrose nos pulmões (RISSI et al., 2007).

Os bovinos que ingerem *P. aquilinum* em uma quantidade inferior a  $10\text{g kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ , durante um ou mais anos podem desenvolver os quadros crônicos de carcinomas de células escamosas no trato alimentar superior ou de hematúria enzoótica bovina (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Nos casos de intoxicação crônica que acometem o trato alimentar superior e causa o aparecimento de carcinoma de células escamosas é possível encontrar os quadros clínicos de: emagrecimento progressivo, tosse, timpanismo, regurgitação (RISSI et al., 2007; GABRIEL et al., 2009), atonia ruminal, disfagia, estertor, apetite seletivo, sialorréia, anorexia, extensão do pescoço, fraqueza, dificuldade de deglutir, halitose, decúbito, dispnéia, edema de faringe, secreção nasal e queda na produção de leite (GABRIEL et al., 2009).

No hemograma dos animais com o quadro crônico de carcinoma de células escamosas no trato alimentar superior na maioria das vezes não há alterações, no entanto em alguns casos, pode-se encontrar anemia arregenerativa leve, linfopenia, eosinofilia e monocitose (GABRIEL et al., 2009).

Os achados necroscópicos são: massas tumorais no trato digestivo (base da língua, palato mole, faringe, esôfago, entrada do rúmen), e podem estar associadas a papilomas; metástases no pulmão, linfonodos cervicais, retrofaríngeos, abdominais e fígado. Carcinomas de células escamosas e papilomas no trato digestivo são observados no exame histopatológico (RISSI et al., 2007).

Animais que são acometidos pelos carcinomas de células escamosas no trato alimentar superior podem concomitantemente apresentar na bexiga lesões neoplásicas como fibroma, hemangioma, papilomas, hemangiossarcoma e carcinoma de células de transição. Além das lesões neoplásicas, lesões não neoplásicas como displasia, ninhos de Brunn, hiperplasia, cistite cística, cistite polipóide, dilatação vascular, hemorragia, edema e folículos linfóides também podem ser observadas em associação (GABRIEL et al., 2009).

Outro quadro crônico causado pela intoxicação pela samambaia é conhecido como hematúria enzoótica bovina que é uma doença não infecciosa (TOKARNIA;

DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000) que se caracteriza pelo surgimento de neoplasias na mucosa da bexiga (RADOSTITIS et al., 2007).

## 2.3 HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA

### 2.3.1 Epidemiologia

A hematúria enzoótica bovina (HEB) tem sido relatada principalmente em locais que apresentam altitude com variação de 200 a 1000 metros (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002) e, por apresentar progressão crônica, não tem distribuição sazonal (GAVA et al., 2002).

No Brasil foi diagnosticada em diversos estados como: Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Amazônia, Espírito Santo, Santa Catarina (PEIXOTO et al., 2003). É uma doença que afeta bovinos machos e fêmeas, com idade superior a dois anos e não tem predisposição por raça (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Além dos princípios tóxicos imunossupressores encontrados em *P. aquilinum*, o papilomavírus bovino tipo 2 (BPV2) também pode estar associado na patogênese da HEB. Acredita-se que o vírus permanece em latência no urotélio dos animais e que quando estes se alimentam de samambaia ocorre imunossupressão e, desta forma, há o desenvolvimento de neoplasias na mucosa da bexiga (CAMPO et al., 1992).

O BPV-2 foi encontrado em associação com carcinoma papilar infiltrativo, carcinoma papilar não infiltrativo, carcinoma *in situ*, carcinoma infiltrativo e displasia severa (BALCOS et al., 2008).

### 2.3.2 Sinais clínicos

Animais intoxicados de forma crônica que desenvolvem HEB apresentam como sinais clínicos emagrecimento progressivo, urina escura (SOUTO et al., 2006; RISSI et al., 2007; GABRIEL et al., 2009), palidez acentuada das mucosas,

hematúria intermitente durante meses (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; SOUTO et al., 2006; GABRIEL et al., 2009), prostração, incontinência urinária (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; GABRIEL et al., 2009), diminuição na produção de leite, tenesmo, obstrução uretral, uremia, arqueamento (RADOSTITIS et al., 2007), apetite seletivo, anorexia, decúbito lateral, dor abdominal, fraqueza (GABRIEL et al., 2009) e morte (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; RADOSTITIS et al., 2007).

Os sinais clínicos apresentados por bovinos acometidos pela HEB podem desaparecer se os animais forem retirados dos pastos infestados pela samambaia e receberem boa alimentação. Esta remissão dos sinais clínicos ocorre principalmente se a infecção estiver no início, mas podem reaparecer se os animais voltarem a ingerir a planta (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000).

### **2.3.3 Diagnósticos hematológicos, bioquímicos e urinários**

A perda contínua de sangue na urina em bovinos que apresentam HEB pode causar anemia arregenerativa com redução no hematócrito e na hemoglobina (SINGH; JOSHI; RAY, 1972; GABRIEL et al., 2009), aumento da fragilidade de eritrócitos, assim como, linfocitose e neutropenia devido a inflamação crônica (SINGH; JOSHI; RAY, 1972), linfopenia e leucocitose por neutrofilia (GABRIEL et al., 2009).

Animais com HEB podem apresentar quadros de macro ou microhematúria. A macrohematúria se caracteriza pela presença de coágulos de sangue na urina após centrifugação, enquanto que na microhematúria, o sangue pode não ser observado macroscopicamente. Em casos de microhematúria, os animais apresentam a forma subclínica da doença e, portanto, podem revelar hematócrito normal após realização de hemograma (FALBO et al., 2005).

Exames de urina devem ser realizados para diagnóstico de HEB. Estes exames podem ser feitos com tiras reativas que demonstram sensibilidade de 88,29% e especificidade de 99,16%, no entanto, este método não diagnostica animais em quadros subclínicos, enquanto que o exame do sedimento urinário apresenta sensibilidade de 97,87% e especificidade de 100% e é capaz de

diferenciar macro de microhematúria (SÁNCHEZ-VILLALOBOS et al., 2006). A urinálise também pode revelar proteinúria (FALBO et al., 2005).

O exame bioquímico dos animais com HEB revelam diminuição nos níveis séricos de cálcio (SINGH; JOSHI; RAY, 1972; FALBO et al., 2005) e fósforo, e, aumento da creatinina sérica e fosfatase ácida (SINGH; JOSHI; RAY, 1972). Há relatos de que os níveis de fósforo e magnésio se mantiveram normais em animais com HEB (FALBO et al., 2005).

### **2.3.4 Diagnóstico macroscópico**

Durante o desenvolvimento embrionário, a bexiga é constituída por uma dilatação que, no sentido cranial, apresenta o ducto alantóico e, no sentido caudal, uma uretra não dilatada. O ducto alantóico ou úracó acompanha a abertura umbilical até o alantóide (expansão extra-embrionária), local que acumula urina. A porção do ducto que fica dentro do feto sofre enrugamento e forma a cicatriz no ápice da bexiga (DYCE; SACK; WENSING, 2004).

A bexiga é um órgão que possui a função de estocar a urina e com capacidade de distensão, e por isto, seu tamanho, posição ou relações não são constantes. Quando a bexiga está vazia sua parede se apresenta espessa e sua localização é restrita a cavidade pélvica, entretanto, ao ficar repleta, a parede apresenta-se delgada, o órgão fica piriforme e divide-se em um ápice (vértice cranial), um corpo intermediário e um colo caudal, e ocorre projeção para a cavidade abdominal (DYCE; SACK; WENSING, 2004).

O aspecto macroscópico das lesões neoplásicas encontradas nas bexigas de animais com HEB é muito variado e, de acordo com a vascularização, os tumores podem ser pálidos ou hemorrágicos. Assim como o tamanho das lesões podem ser variados, há crescimentos exofíticos que tem o diâmetro com variação de milímetros a centímetros. Há também os crescimentos endofíticos que apresentam formatos variados, desde discretas ondulações da mucosa com mudança moderada da cor até crescimentos infiltrativos profundos com alteração acentuada na mudança da cor (CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006, GABRIEL et al., 2009).

Desta forma, os achados macroscópicos em bexigas de animais com HEB podem ser: múltiplas formações polipóides avermelhadas, massa tumoral firme de

superfície amarelada e irregular que protui da mucosa, múltiplas elevações avermelhadas (SOUTO et al., 2006), formações nodulares fixas a mucosa, formações verrucóides (GONZÁLES et al., 2004).

Além disto, ao realizar a necropsia dos animais com HEB, é possível encontrar urina vermelha, tumores, ulceração e acúmulo de fibrina na mucosa vesical (FALBO et al., 2005; RISSI et al., 2007), mucosa oral e ocular pálidas, sangue de aspecto aquoso, bexiga aumentada de volume, hidronefrose (SOUTO et al., 2006, GABRIEL et al., 2009, NUNES et al., 2011), hidroureter (GABRIEL et al., 2009, NUNES et al., 2011), mucosa vesical enrijecida, degeneração da mucosa, massas gelatinosas escuras (GONZÁLES et al., 2004); hemorragias multifocais na mucosa da bexiga, pielonefrite e ruptura da bexiga (GABRIEL et al., 2009).

### **2.3.5 Diagnóstico microscópico**

A bexiga apresenta como estruturas histológicas normais: mucosa formada por epitélio de transição e por lâmina própria de tecido conjuntivo que varia de frouxo a denso, túnica muscular formada por uma camada longitudinal interna e circular externa e a parte superior revestida por serosa, enquanto a parte inferior é revestida por adventícia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O urotélio que reveste a bexiga tem origem embriológica distinta de acordo com a região do órgão. O epitélio da região trigonal dorsal é originado do mesoderma do ducto mesonéfrico, enquanto o epitélio da parte remanescente origina-se do endoderma do intestino posterior. O mesoderma local origina as camadas mais externas da parede da bexiga (DYCE; SACK; WENSING, 2004).

As células mais superficiais do epitélio de transição apresentam na membrana plasmática placas espessas com a função de realizar uma barreira osmótica entre a urina e os fluidos teciduais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Na avaliação microscópica de bexigas de bovinos com HEB pode-se encontrar lesões não neoplásicas como: espessura variada de uma a várias camadas do epitélio transicional caracterizando hiperplasia (PEIXOTO et al., 2003; FALBO et al., 2005; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; BALCOS et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), formações metaplásicas de tipo epitelial escamoso ou epitelial cilíndrico (PEIXOTO et al., 2003; FALBO et al., 2005;

CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), infiltrado inflamatório mononuclear com formação de nódulos (PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al., 2004; FALBO et al., 2005; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; BALCOS et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), hemorragia (PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al., 2004; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), displasia (PEIXOTO et al., 2003; BALCOS et al., 2008; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), cistite cística, ninhos de Brunn (PEIXOTO et al., 2003; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), proliferação vascular, fibrose (PEIXOTO et al., 2003; OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009), cistite hemorrágica (SOUTO et al., 2006) e a hematúria em alguns casos pode estar associada apenas à congestão e à ectasia de vasos sanguíneos (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; OLIVEIRA, 2009).

Além das lesões não neoplásicas podem ser encontrados focos de hematopoese extramedular em órgãos como baço e fígado (SOUTO et al., 2006).

Os tumores encontrados no exame histopatológico de bexigas de animais com HEB podem ser tanto de origem epitelial quanto mesenquimal, entretanto para qualquer origem embriológica metástases destes tumores são raras (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; PEIXOTO et al., 2003). No entanto, em casos de carcinomas de células escamosas e hemangiossarcomas, podem ocorrer metástases para linfonodos regionais (GABRIEL et al., 2009). O local em que os tumores são mais comumente encontrados é a região do trígono vesical (OLIVEIRA, 2009; GABRIEL et al., 2009).

Os tipos de neoplasias mesenquimais que podem ser encontradas são: hemangiomas, hemangiossarcomas, (PEIXOTO et al., 2003; SOUTO et al., 2006; GONZÁLES et al., 2004; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; RISSI et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; GABRIEL et al., 2009), hemangiopericitossarcoma, mixossarcoma, rabdomyossarcoma, leiomyossarcoma (GONZÁLES et al., 2004), hemangioendotelioma (CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; CARVALHO et al., 2009), fibroma (CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006).

De origem epitelial podem ser encontrados: carcinoma de células escamosas (PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al., 2004; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; SOUTO et al., 2006; GABRIEL et al., 2009), carcinoma de células transicionais (PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al., 2004; FALBO et al., 2005; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006, GABRIEL et al., 2009), carcinoma *in situ*,

carcinoma papilar, carcinoma tubular (PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al., 2004), papiloma (PEIXOTO et al., 2003; GONZÁLES et al., 2004; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006; GABRIEL et al., 2009), adenocarcinoma (PEIXOTO et al., 2003; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006), carcinoma trabecular com diferenciação em células de Paneth, adenoma e adenocarcinoma mesonefróides, carcinoma *signet ring* (anel de sinete), carcinoma plasmocitóide, carcinoma de células cromóforas, carcinoma transicional tipo ninhado (PEIXOTO et al., 2003), papiloma invertido, adenoma (CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006).

### **2.3.6 Métodos auxiliares no diagnóstico da HEB**

#### 2.3.6.1 Histoquímica

O método histoquímico pode ser utilizado no diagnóstico de HEB com o intuito de auxiliar na classificação de alguns tipos neoplásicos bem como identificar algumas lesões não neoplásicas. A histoquímica de Hale, por exemplo, pode ser empregada para o diagnóstico de mixossarcomas, enquanto que, o tricrômico de Masson pode identificar rabiomiossarcomas e leiomiomiossarcomas (GONZÁLES et al., 2004). Nos casos em que há necessidade de fazer uma melhor avaliação do tecido conjuntivo o ácido periódico de Schiff (PAS), o azul de toluidina e o tricrômico de Masson podem e devem ser utilizados (PEIXOTO et al., 2003).

Em lesões não neoplásicas como as metaplasias glandulares em que ocorre a produção de muco pode-se utilizar os corantes ácido periódico de Schiff (PAS) e azul alciano (*alcian blue*) (GABRIEL et al., 2009).

#### 2.3.6.2 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica é uma técnica que combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, para detectar antígenos nos tecidos por meio de anticorpos específicos e moléculas marcadoras, pode e deve ser utilizada para o diagnóstico preciso das neoplasias (RAMOS-VARA, 2005).

A imunohistoquímica pode ser utilizada a fim de auxiliar no diagnóstico e no prognóstico das neoplasias encontradas em bexigas. Os anticorpos já utilizados para realização da técnica em neoplasias de bexigas de animais com HEB foram: anti-CD31, anti-fator VIII, anti-uroplaquina, anti-p53, anti-ciclina D1 (CARVALHO et al., 2009), anti-citoqueratina e anti-vimentina (GABRIEL et al., 2009).

As citoqueratinas englobam uma grande gama de proteínas filamentosas de tamanho médio que compõem o citoesqueleto das células epiteliais (MOLL et al., 1982). Os anticorpos monoclonais AE1 podem identificar citoqueratinas ácidas (baixo peso molecular 56,5 kDa), enquanto os anticorpos monoclonais AE3 identificam citoqueratinas básicas (alto peso molecular de 65 a 67 kDa) (SCHLEGEL et al., 1980). As citoqueratinas de baixo peso molecular, que são encontradas no epitélio simples e ductal e não no epitélio escamoso, são marcadas pelo CAM 5.2, e as citoqueratinas de alto peso molecular, presentes no epitélio escamoso e ductal e ausentes no epitélio simples, são marcadas pelo 34βe12 (ALVES, 1995).

A vimentina é o principal filamento intermediário que compõe o citoesqueleto e participa na arquitetura celular, integridade tecidual, adesão, migração e sinalização celular (IVASKA et al., 2007). Entretanto, apresenta apenas um tipo de molécula com peso molecular de 55 kDa (ALVES, 1995) e é encontrada nas células de origem mesenquimal como os fibroblastos, células musculares, adipócitos, células endoteliais, leucócitos (ALVES, 1995; IVASKA et al., 2007) e células mioepiteliais (IVASKA et al., 2007).

As uroplaquinas formam um complexo pouco solúvel e são encontradas quando em estágios avançados de diferenciação nas células superficiais do urotélio. Apresentam pesos moleculares variados que permitem classificá-las em diferentes tipos como: uroplaquina I (27 kDa), uroplaquina II (15 kDa) e uroplaquina III (47 kDa) estes três tipos foram isoladas da bexiga de bovinos. Entretanto, as uroplaquinas I e II foram encontradas apenas na superfície do urotélio e a uroplaquina III foi encontrada em todas as camadas do urotélio maduro (WU et al., 1990).

A bexiga de bovinos apresenta duas isoformas para a uroplaquina I, uroplaquina Ia com 27 kDa e uroplaquina Ib com 28 kDa (YU et al., 1994). Os quatro tipos de uroplaquina, Ia, Ib, II e III foram encontradas também no urotélio de bexigas de humanos, macacos, ovinos, suínos, caninos, coelhos, ratos e camundongos (WU et al., 1994).

Os vasos sanguíneos mantêm sua integridade devido a presença da molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1) também conhecida como CD31 nas células endoteliais. O CD31 mantém a integridade endotelial através da adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular e auxilia na passagem das células sanguíneas para a luz dos vasos (BEHAR et al., 1996; BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003; LISTI et al., 2004). Esta molécula pode se expressar na superfície de células endoteliais, plaquetas e leucócitos (ELRAYESS; TALMUD, 2005), como macrófagos e histiócitos (AKIBA et al., 2011).

Outra glicoproteína que pode ser encontrada nos vasos sanguíneos é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Esta glicoproteína aumenta a permeabilidade microvascular, estimula a proliferação e migração de células endoteliais, promove a angiogênese (YLA-HERTTUALA et al., 2007) e participa efetivamente na patogênese de malformações vasculares (PAVLOV et al., 2011).

Os anticorpos anti-CD31 e anti-fator VIII foram utilizados no diagnóstico de neoplasias de bexigas de bovinos com HEB de origem vascular e o CD31 se mostrou mais sensível para o diagnóstico de tais neoplasias. Entretanto a uroplaquina foi utilizada para caracterizar o urotélio destas bexigas (CARVALHO et al., 2009).

Os biomarcadores anti-citoqueratina e anti-vimentina foram utilizados para distinguir a origem epitelial e mesenquimal, respectivamente, das neoplasias vesicais de bovinos com HEB (GABRIEL et al., 2009). Enquanto que anti-ciclina D1 e anti-p53 foram utilizados para avaliar o comportamento tumoral e apresentaram maior expressão nos tumores com maior grau de malignidade (CARVALHO et al., 2009).

O VEGF é um marcador que pode ser utilizado para estabelecer correlação significativa com os diferentes aspectos clinicopatológicos tumorais, como o tamanho da lesão, presença de invasão vascular, presença de metástases linfonodais, diferenciação tumoral e, em especial, como prognóstico do paciente que pode ser observado através de taxas de sobrevida após o tratamento (PINHO, 2005).

### 2.3.6.3 Outros métodos de diagnóstico

Novos métodos para o diagnóstico de hematúria enzoótica bovina têm sido propostos como as avaliações ultrassonográficas por via retal em bovinos para detecção de neoplasias na bexiga. Este método tem se demonstrado não invasivo e efetivo no diagnóstico precoce de HEB e se baseia no espessamento da parede vesical e na ecogenicidade tanto da parede quanto do conteúdo vesical (HOQUE et al.; 2002; CÂMARA et al.; 2009).

Outro método avançado para o diagnóstico de HEB é o teste citogenético. Este teste permite avaliar células com aneuploidias, quebras de cromátides, quebras cromossômicas, aberrações estruturais celulares e tem sido comprovado que tais alterações são maiores em animais acometidos pela doença (PERETTI et al., 2007).

## **CAPÍTULO 1**

**Lesões neoplásicas e não neoplásicas da bexiga associadas à hematúria  
enzoótica bovina**

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Revista Brasileira de Medicina  
Veterinária

### **3 Cap. 1 – Lesões neoplásicas e não neoplásicas da bexiga associadas à hematúria enzoótica bovina**

#### **Non-neoplastic and neoplastic lesions of the urinary bladder associated with bovine enzootic hematuria**

Maria Aparecida da Silva<sup>1</sup>, Dyeime Ribeiro de Sousa<sup>1</sup>, Ana Paula Madureira<sup>2</sup>, Louisiane de Carvalho Nunes<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

<sup>2</sup> Professora Dra. da Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Professora PhD em Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

\* Autor para contato: [louisiane.nunes@ufes.br](mailto:louisiane.nunes@ufes.br)

#### **3.1 RESUMO**

A hematúria enzoótica bovina é causada pela intoxicação por *Pteridium aquilinum* e caracterizada pela presença de sangue na urina e desenvolvimento de neoplasias na bexiga. Objetivou-se com este trabalho caracterizar histopatologicamente bexigas de bovinos associadas à hematúria enzoótica e obter dados epidemiológicos relacionados a esta doença na microrregião do Caparaó, ES. Bexigas de bovinos oriundos de municípios com a presença de *Pteridium aquilinum* que apresentaram lesões macroscópicas e/ou hematúria foram selecionadas no matadouro frigorífico de Muniz Freire, ES. Amostras com quatro fragmentos de cada bexiga foram fixadas em formol a 10%, submetidas ao processamento histológico de rotina e classificadas histomorfologicamente. Os dados epidemiológicos mostraram que as bexigas

utilizadas eram oriundas de bovinos dos municípios de: Guaçuí, ES, Muniz Freire, ES, Alegre, ES, Iúna, ES, Afonso Cláudio, ES e Mutum, MG. Dos bovinos 36,95% eram machos e 63,05% fêmeas. Macrohematúria foi observada em 50% e microhematúria em 50% das bexigas. As lesões macroscópicas incluíram petéquias, lesões papilomatosas, hemangiomas, sobrelevadas em placa e depressões brancacentas. Lesões não neoplásicas foram observadas em 100% das amostras. Os processos não neoplásicos revelaram displasia, metaplasia de células claras, hiperplasia, hemorragia, cistite cística, ninhos de Brunn, inflamação, proliferação, dilatação, ectasia e espessamento vascular. Lesões neoplásicas foram encontradas em 56,52% das bexigas e 53,85% eram epiteliais e 88,46% mesenquimais. As lesões neoplásicas encontradas foram: carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma. A presença de neoplasias foi significativa ( $p < 0,05$ ) na porção caudal da bexiga. Houve maior frequência ( $p < 0,05$ ) de displasia, metaplasia de células claras, inflamação e espessamento vascular em bexigas com neoplasia. Conclui-se que bexigas de bovinos com hematúria enzoótica apresentam lesões não neoplásicas e neoplásicas, isoladas ou associadas, que estão envolvidas nos sinais clínicos da doença. Os dados epidemiológicos mostraram que existem animais com HEB em municípios da microrregião do Caparaó, ES e regiões limítrofes.

**Palavras-chave:** HEB. bexiga. neoplasma. histogênese tumoral.

### 3.2 ABSTRACT

Bovine enzootic hematuria is caused by poisoning *Pteridium aquilinum* and characterized by the presence of blood in the urine and bladder neoplasms development. The objective of this study was to characterize histopathologically bladders of bovines associated with enzootic hematuria and obtain epidemiological data related to this disease from Caparaó microregion in the state of Espírito Santo, Brazil. Urinary bladders from cattle coming from municipalities with the presence of *Pteridium aquilinum* presenting macroscopic lesions and/or hematuria were selected at the slaughterhouse from the Muniz Freire, ES. Samples with four fragments of each bladder were fixed in formalin 10%, submitted to routine histological processing

and ranked histomorphologically. The epidemiological data revealed that the bladders used were from bovines of the municipalities: Guaçuí, ES, Muniz Freire, ES, Alegre, ES, Iúna, ES, Afonso Cláudio, ES and Mutum, MG. Of bovines 36.95% were males and 63.05% females. Macrohematuria was observed in 50% and microhematuria in 50% of the bladders. The macroscopic lesions included petechia, papillomatous lesions, hemangiomas, lesions in high relief plate-shaped, and low relief. Non-neoplastic lesions were observed in 100% of the samples. The non-neoplastic processes revealed dysplasia, clear cell metaplasia, hyperplasia, hemorrhage, cystic cystitis, Brunner's nests, inflammation, vascular proliferation, vascular dilatation, vascular thickening, and vascular ectasia. Neoplastic lesions were found in 56.52% of the bladders, and of these 53.85% were epithelial origin and 88.46% mesenchymal origin. The neoplastic processes were urothelial carcinoma, *in situ* carcinoma, adenocarcinoma, hemangioma, myxoma and hemangiosarcoma. The presence of neoplasms was significant ( $p < 0.05$ ) in the caudal portion of the bladder. There was a higher frequency ( $p < 0.05$ ) of dysplasia, clear cell metaplasia, inflammation and vascular thickening in bladders with neoplasm. It is concluded that in bladders of cattle with enzootic haematuria have non-neoplastic and neoplastic lesions, isolated or associated, which are involved in clinical signs of disease. The epidemiological data showed that there are animals with BEH in the municipalities of the Caparaó microregion, Espírito Santo state, Brazil and neighboring regions.

**Keywords:** HEB. bladder. neoplasm. histogenesis.

### 3.3 INTRODUÇÃO

*Pteridium aquilinum* é considerada uma das plantas tóxicas mais importantes no mundo e é conhecida popularmente como samambaia. Esta planta apresenta distribuição cosmopolita e causa quadros de intoxicação em várias espécies de animais, principalmente em bovinos. Possui ainda alto potencial carcinogênico, que pode ser observado tanto em animais, quanto em seres humanos que consomem a planta (ALONSO-AMELOT, 1999; SUGIMURA, 2000).

Bovinos que ingerem *P. aquilinum* em quantidade inferior a  $10\text{g kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ , durante um ou mais anos podem desenvolver quadros crônicos de intoxicação:

hematúria enzoótica bovina (HEB) ou carcinomas do trato alimentar superior (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). O papilomavírus bovino (BPV) pode estar associado com a samambaia na patogênese da doença (CAMPO et al., 1992; BALCOS et al., 2008).

A HEB é caracterizada clinicamente pela presença de sangue na urina dos animais e pelo desenvolvimento de neoplasias na mucosa da bexiga dos bovinos (RADOSTITIS et al., 2007). Vale ressaltar que as neoplasias encontradas na bexiga de animais com HEB apresentam, na maioria das vezes, histogênese variada e pode existir mais de um tipo de neoplasia no mesmo animal (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000; PEIXOTO et al., 2003).

Entretanto, lesões não neoplásicas como displasia, metaplasia, hiperplasia, hemorragia, inflamação e proliferações vasculares também podem ser encontradas nas bexigas de bovinos com HEB e participam efetivamente no surgimento dos sinais clínicos, associadas ou não a presença de neoplasia (OLIVEIRA, 2009).

Objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização histopatológica de bexigas associadas à hematúria enzoótica bovina, bem como obter dados epidemiológicos relacionados a esta doença na microrregião do Caparaó, Espírito Santo.

### **3.4 MATERIAL E MÉTODOS**

No matadouro frigorífico de Muniz Freire, ES, foram avaliadas 350 bexigas de bovinos, machos e fêmeas, oriundos de propriedades localizadas em municípios da microrregião do Caparaó, ES com histórico da presença de *Pteridium aquilinum*.

Prosseguiu-se a abertura das bexigas no sentido caudo-cranial pela face ventral do órgão para verificação da presença de hematúria e/ou lesões macroscópicas na mucosa. As bexigas que não apresentavam nenhum destes elementos foram descartadas.

As bexigas selecionadas foram identificadas quanto à procedência e acondicionadas separadamente em sacos plásticos transparentes. Juntamente com as bexigas foi coletada urina em tubos de 10 mL. Os tubos com urina e as bexigas foram colocados em caixas isotérmicas com gelo para o transporte ao Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo.

No Setor de Patologia Animal, a urina foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e em seguida avaliada a presença de macro ou microhematúria, segundo o método descrito por Falbo et al. (2005). Em seguida as bexigas foram divididas em quatro quadrantes (A, B, C e D) e coletadas todas as lesões macroscópicas observadas. No quadrante que não existiam lesões visíveis, foi coletado um fragmento aleatório do centro do quadrante, para avaliação microscópica. A distribuição por quadrantes está representada na Figura 1.

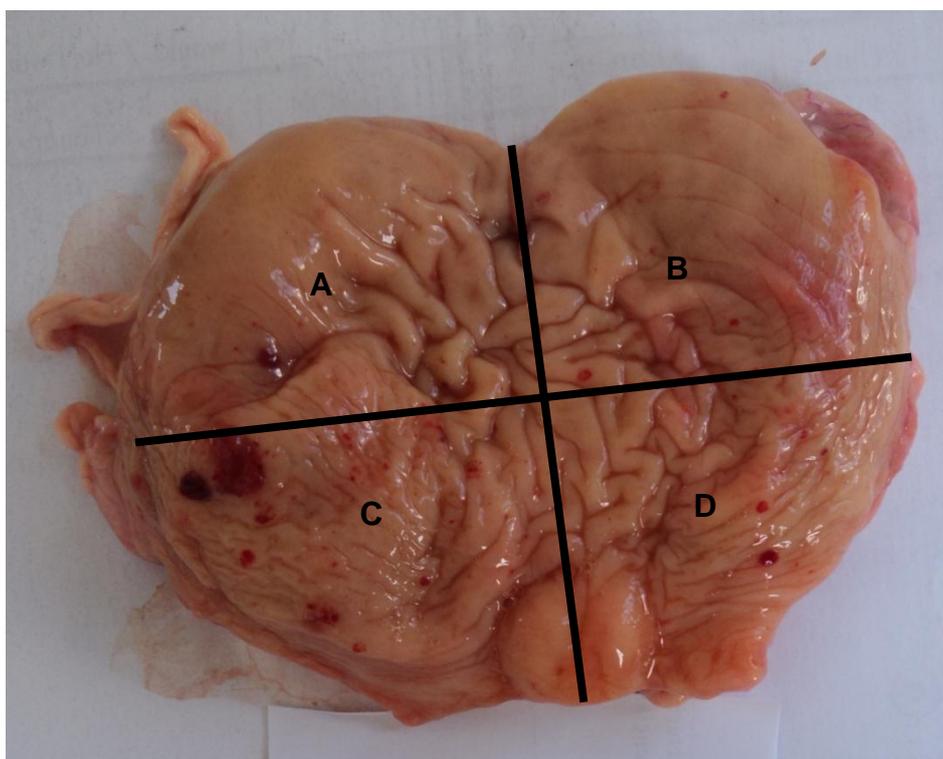


Figura 1- Fotomacrografia de bexiga de bovino com hematúria enzótica, (amostra P241/10) com a ilustração da divisão em quadrantes. A e B – quadrantes localizados na porção cranial da bexiga e C e D – quadrantes localizados na porção caudal da bexiga.

Posteriormente as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Em seguida, foi realizada a microtomia para a secção de cortes histológicos de três micrômetros. Os fragmentos foram depositados em lâminas de vidro com extremidade fosca e corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação das alterações morfológicas e classificação das lesões. Microscopicamente as lesões foram diferenciadas em neoplásicas e não neoplásicas, seguindo a metodologia descrita por Oliveira (2009). Entretanto, para

identificar e classificar as lesões não neoplásicas, as alterações que acometiam o urotélio foram separadas das que acometiam a lâmina própria.

A análise estatística descritiva foi utilizada para a classificação histomorfológica das lesões. Para analisar a distribuição das neoplasias por região da bexiga, bem como, a associação entre as lesões não neoplásicas e neoplásicas em cada bexiga foi realizado o teste de Qui-quadrado acompanhado do teste exato de Fisher ao nível de 5% de significância.

### 3.5 RESULTADOS

Das 350 bexigas avaliadas, 46 foram selecionadas por apresentarem lesões macroscópicas e/ou hematuria. Em relação aos dados epidemiológicos, verificou-se que as bexigas utilizadas neste estudo eram oriundas de bovinos dos municípios de: Guaçuí, ES 50% (23/46), Muniz Freire, ES 19,57% (9/46), Alegre, ES 13,04% (6/46), Iúna, ES 8,69% (4/46), Afonso Cláudio, ES 4,35% (2/46) e Mutum, MG 4,35% (2/46). Observou-se que 36,95% (17/46) dos bovinos eram machos e 63,05% (29/46) fêmeas.

Foi encontrada macrohematuria em 50% (23/46) das bexigas e microhematuria em 50% (23/46) e as lesões macroscópicas estavam presentes em 86,96% (40/46) e ausentes em 13,04% (6/46). As lesões macroscópicas encontradas foram: petéquias em 63,04% (29/46), lesões papilomatosas em 45,65% (21/46), lesões hemangiomas em 34,78% (16/46), lesões sobrelevadas em placa 10,86% (5/46) e lesões deprimidas brancacentas em 6,52% (3/46). Estes resultados revelam que em uma mesma bexiga pode-se encontrar mais de uma lesão macroscópica. A Figura 2 ilustra a caracterização das lesões macroscópicas observadas nas bexigas.

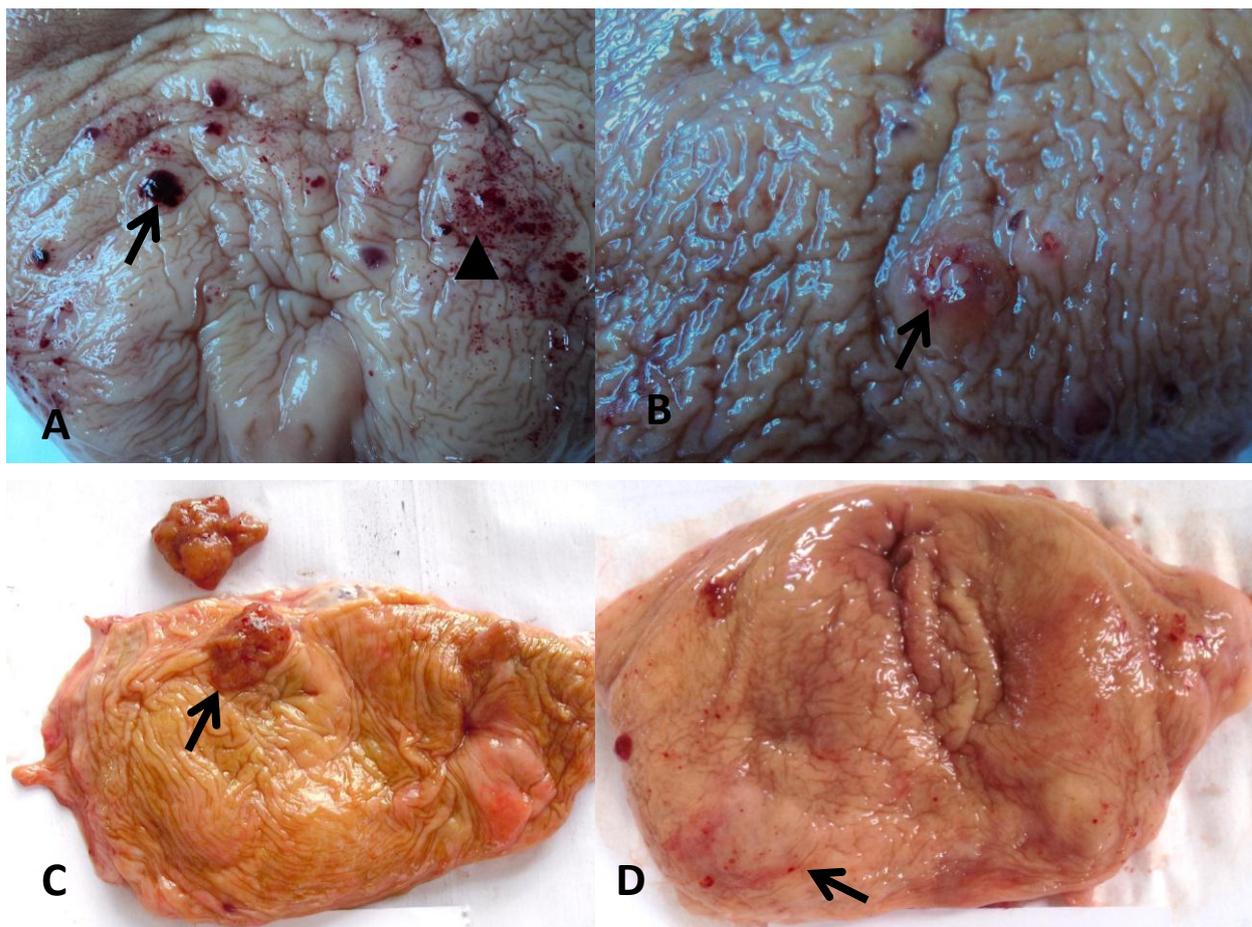


Figura 2 - Fotomacrografia de lesões macroscópicas encontradas na mucosa da bexiga de bovinos com hematúria enzoótica. A – lesão hemangiomatosa (seta) e petéquias (cabeça de seta), amostra P227/10. B – lesão sobrelevada em placa (seta), amostra P217/10. C – lesão papilomatosa (seta), amostra P456/10. D – lesão brancacenta deprimida (seta), amostra P244/10.

Ao exame microscópico, lesões não neoplásicas foram observadas em 100% (46/46) das bexigas, enquanto as lesões neoplásicas foram encontradas em 56,52% (26/46).

As lesões não neoplásicas encontradas no urotélio foram: displasia em 93,48% (43/46), metaplasia de células claras em 100% (46/46), hiperplasia em 89,13% (41/46), hemorragia em 28,26% (13/46), cistite cística em 17,39% (8/46) e ninhos de Brunn em 8,69% (4/46). Na lâmina própria foram encontradas: inflamação em 93,48% (43/46), proliferação vascular em 100% (46/46), hemorragia em 60,87% (28/46), ectasia vascular em 93,48% (43/46), dilatação vascular em 50% (23/46) e espessamento vascular em 84,78% (39/46). A Figura 3 ilustra algumas das lesões não neoplásicas observadas neste estudo.

Das 26 bexigas com neoplasia 50% (13/26) apresentaram apenas um tipo neoplásico, 26,93% (7/26) dois tipos neoplásicos, 15,38% (4/26) três tipos neoplásicos e 7,69% (2/26) quatro tipos neoplásicos.

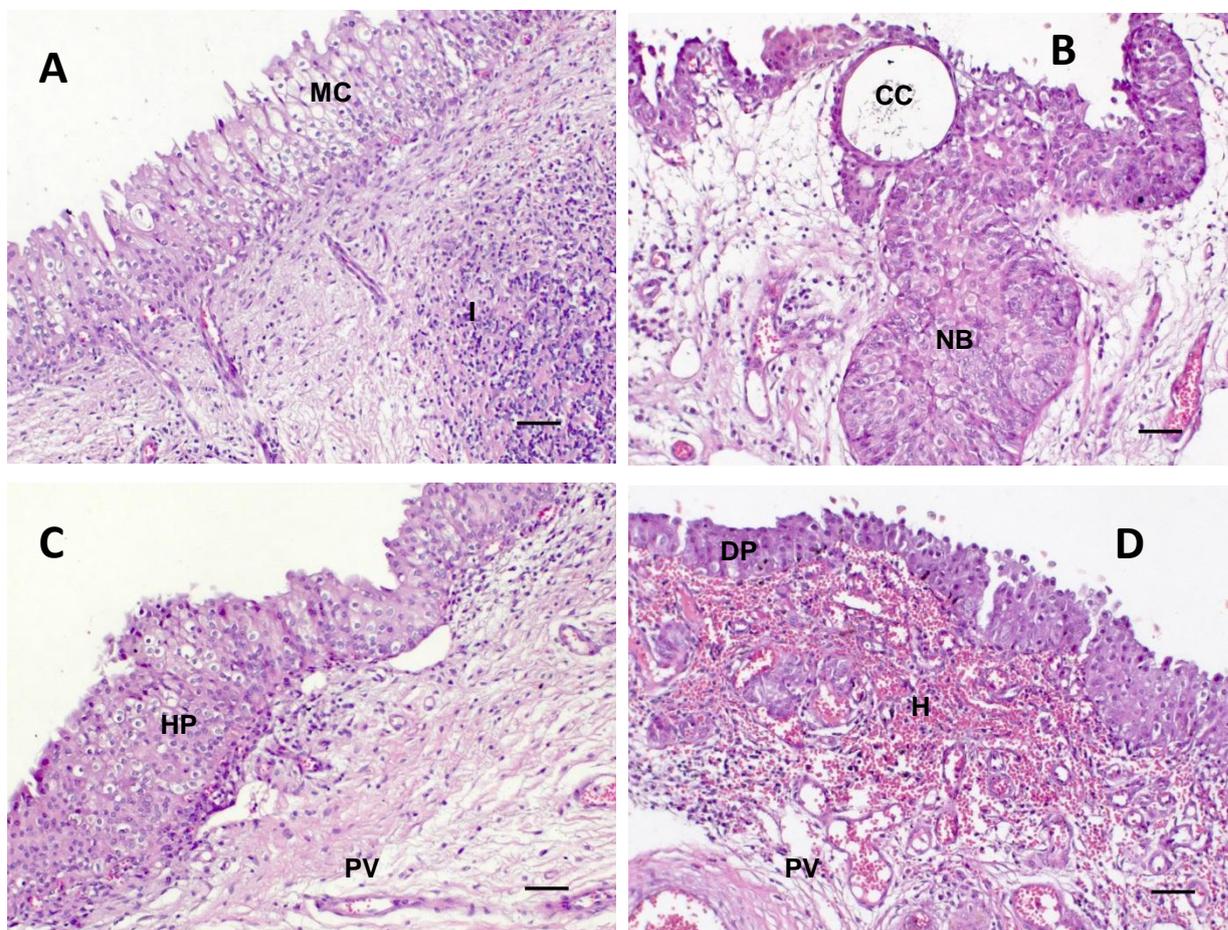


Figura 3 – Fotomicrografia de lesões não neoplásicas observadas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica. A – metaplasia de células claras (MC) e no urotélio e inflamação (I) na lâmina própria, amostra P241/10. B – cistite cística (CC) e ninhos de Brunn (NB), amostra P229/10. C – hiperplasia urotelial (DP) e proliferação vascular (PV) na lâmina própria, amostra P421/10. D – displasia urotelial (DP), hemorragia (H) e proliferação vascular (PV) na lâmina própria, amostra P229/10. Coloração de hematoxilina-eosina, objetiva de 20x (barra= 50µm).

Dentre as neoplasias encontradas nas bexigas 53,85% (14/26) eram tanto de origem epitelial e 88,46% (23/26) quanto de origem mesenquimal. Em 38,46% (10/26) das bexigas foram encontradas neoplasias de origem epitelial e mesenquimal, em 23,08% (6/26) mais de um tipo de neoplasia de origem epitelial e em 15,38% (4/26) mais de um tipo de neoplasia de origem mesenquimal. As neoplasias de origem epitelial foram: carcinoma urotelial em 34,61% (9/26);

carcinoma *in situ* em 30,77% (8/26); adenocarcinoma em 15,38% (4/26). As neoplasias de origem mesenquimal foram: hemangioma em 50% (13/26); mixoma em 42,31% (11/26) e hemangiossarcoma em 7,69% (2/26). A Figura 4 ilustra as lesões neoplásicas observadas neste estudo.

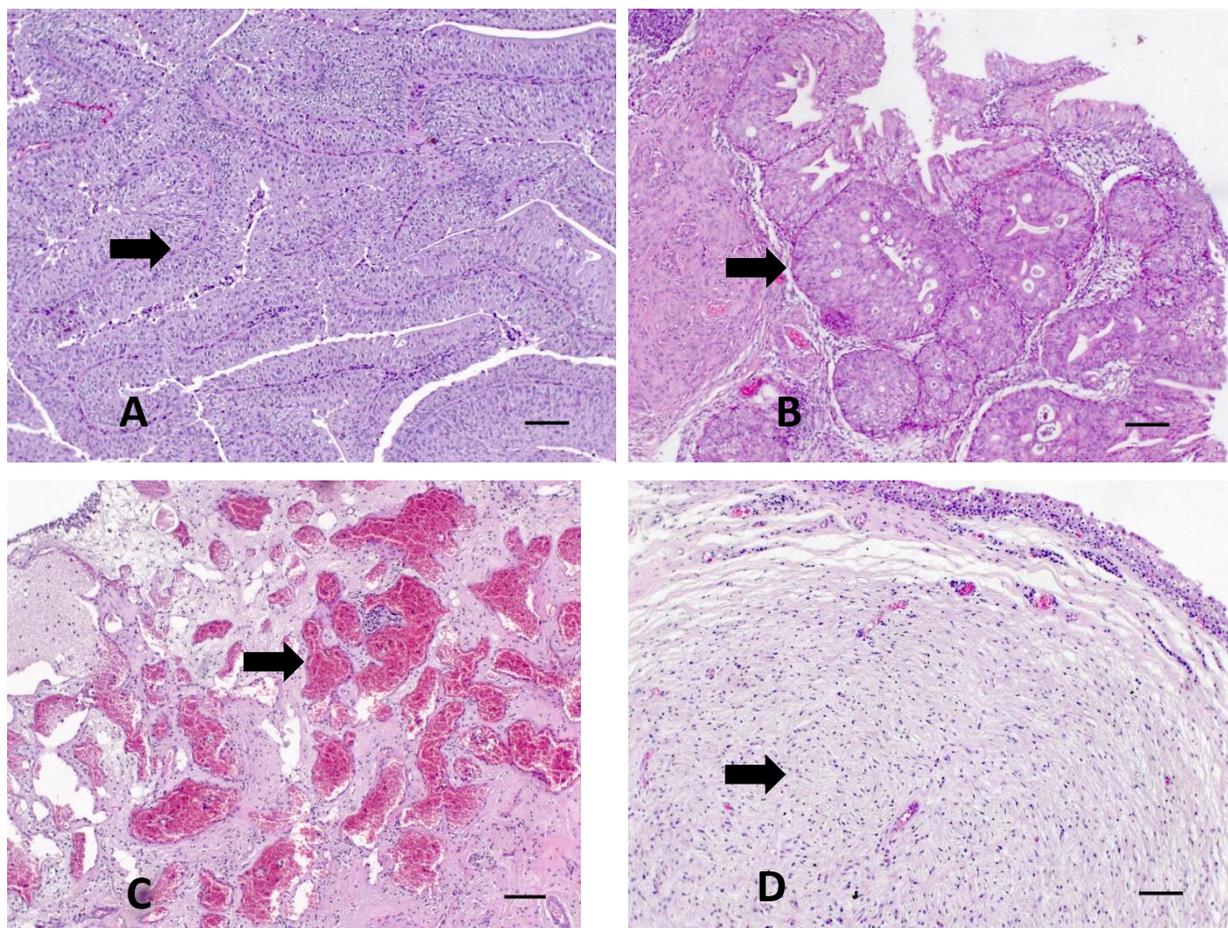


Figura 4 – Fotomicrografia de lesões neoplásicas observadas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica. A – carcinoma urotelial (seta), amostra P456/10. B – adenocarcinoma (seta), amostra P241/10. C – hemangioma (seta), amostra P456/10. D – mixoma (seta), amostra P449/10. Coloração de hematoxilina-eosina, objetiva de 10x (barra= 100µm).

Quando avaliada a distribuição das neoplasias por região da bexiga, ou seja, por quadrante, observou-se que 13 neoplasias foram encontradas no quadrante A, 11 no quadrante B, 25 no quadrante C e 24 no quadrante D. Estes dados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos diferentes tipos de neoplasias encontradas em cada região da bexiga em bovinos com hematúria enzoótica na microrregião do Caparaó, Espírito Santo.

Neoplasia	Quadrantes*				Total
	A	B	C	D	
Carcinoma urotelial	2	0	4	4	10
Carcinoma in situ	2	2	5	6	15
Adenocarcinoma	3	1	3	2	9
Hemangioma	2	4	6	8	20
Mixoma	3	4	5	4	16
Hemangiossarcoma	1	0	2	0	3
Total	13 <sup>A</sup>	11 <sup>A</sup>	25 <sup>B</sup>	24 <sup>B</sup>	73

\*Letras distintas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

Houve maior ocorrência de neoplasias nos quadrantes C e D (caudais) quando comparados com os quadrantes A e B (craniais) demonstrando diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Quando foi avaliada a associação entre a existência de lesões macroscópicas com a presença de neoplasias observou-se: nos carcinomas uroteliais, em 88,88% (8/9) havia lesões papilomatosas e 11,12% (1/9) lesões hemangiomas; nos carcinomas *in situ*, em 25% (2/8) havia lesões deprimidas brancacentas, em 25% (2/8) lesões sobrelevadas em placa, em 12,5% (1/8) hemangiomas, 12,5% (1/8) papilomatosas, 12,5% (1/8) petéquias e 12,5% (1/8) não apresentaram lesões macroscópicas; nos adenocarcinomas, em 75% (3/4) havia lesões sobrelevadas em placa e em 25% (1/4) lesões deprimidas brancacentas; nos hemangiomas em 76,92% (10/13) havia lesões hemangiomas, em 15,38% (2/13) petéquias e em 7,7% (1/13) lesões papilomatosas; nos mixomas, em 72,73% (8/11) havia lesões papilomatosas, em 9,09% (1/11) hemangiomas, em 9,09% (1/11) petéquias e em 9,09% (1/11) lesões sobrelevadas em placa; nos hemangiossarcomas, em 100% (2/2) havia lesões hemangiomas.

Lesões não neoplásicas foram encontradas em petéquias, lesões papilomatosas, lesões hemangiomas, lesões sobrelevadas em placa e lesões deprimidas brancacentas da mucosa da bexiga. Em algumas amostras não foi observada qualquer lesão visível e, mesmo assim, havia alterações microscópicas

do tipo não neoplásicas. Desta forma, não foi possível estabelecer as principais lesões macroscópicas observadas nos processos não neoplásicos.

Houve maior frequência de displasia, metaplasia de células claras, inflamação e espessamento vascular em bexigas com neoplasia demonstrando diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.6 DISCUSSÃO

A confirmação de que os animais deste estudo apresentavam hematuria enzoótica bovina (HEB) foi realizada de acordo com o estabelecido por Souto et al. (2006), ao observar os sinais clínicos, as lesões macro e microscópicas da bexiga e a epidemiologia.

Os dados epidemiológicos com relação aos municípios de procedência das bexigas utilizadas neste estudo concordam com Silva et al. (2009). Estes autores comprovaram que esta região apresenta relevante prevalência para HEB, 56,4%. A presença de animais com HEB em municípios da mesma região também foi observada por Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2000) e Nunes et al. (2011).

Foram encontradas neoplasias também em animais provenientes dos municípios de Afonso Cláudio, ES e Mutum, MG, que não fazem parte da microrregião do Caparaó, ES, mas são municípios limítrofes e podem apresentar clima e solo propícios ao desenvolvimento de *P. aquilinum*.

Ao avaliar o sexo dos animais constatou-se que tanto machos quanto fêmeas apresentaram a doença. Estes achados estão de acordo com; Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2000) e Nunes et al. (2011) que relataram que se pode encontrar esta doença em machos e fêmeas. Entretanto, Silva et al. (2009) encontraram predominância de HEB em fêmeas, ressalta-se que estes pesquisadores estudaram a doença apenas em vacas destinadas à produção de leite.

Os animais acometidos pela doença podem apresentar tanto macro quanto microhematuria (FALBO et al., 2005; SÁNCHEZ-VILLALOBOS et al., 2006). Entretanto, os animais que apresentam microhematuria na maioria das vezes apresentam um quadro subclínico e são diagnosticados apenas na urinálise (FALBO et al., 2005). Os dados coletados para a avaliação da urina revelam que o número

de animais que apresentaram a forma clínica da doença foi igual aos que apresentaram a forma subclínica.

Ao avaliar macroscopicamente as bexigas foi possível observar diversos tipos de lesões e estas foram semelhantes às observadas por Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006). Nas bexigas de animais com HEB podem ainda ser encontrados tumores de outros aspectos como: múltiplas formações polipóides avermelhadas, massa tumoral firme de superfície amarelada e irregular que protui da mucosa, múltiplas elevações avermelhadas (SOUTO et al., 2006), formações nodulares fixas à mucosa e formações verrucóides (GONZÁLES et al., 2004).

Na avaliação microscópica observou-se presença de diversas lesões não neoplásicas que foram semelhantes às encontradas por Oliveira (2009). A existência de lesões neoplásicas e não neoplásicas em uma mesma bexiga também foi encontrada por Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006). Além disto, neste estudo foi observado mais de um tipo de neoplasia por bexiga o que concorda com os relatos de Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2000), Peixoto et al. (2003), Gonzáles et al. (2004), Carvalho et al. (2009) que encontraram na bexiga de animais com HEB diversos tipos de processos neoplásicos de origem epitelial e mesenquimal, e afirmaram que o mesmo animal pode apresentar histogênese variada nesses tumores.

Os tipos de tumores encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006). No entanto, estes autores observaram predominância de neoplasias de origem epitelial, inclusive papilomas, enquanto que neste estudo a predominância foi de neoplasias mesenquimais e não foi constatada a presença de papilomas. Gonzáles et al. (2004) também encontraram carcinomas uroteliais, carcinomas *in situ*, hemangiomas e hemangiossarcomas e, semelhante a este estudo, encontraram predominância de neoplasias mesenquimais. Hemangiomas e hemangiossarcomas também foram encontrados por Souto et al. (2006); Carvalho et al. (2009).

Ao avaliar a localização das lesões neoplásicas, estas predominaram nos quadrantes C e D, porção caudal da bexiga. Estes achados foram semelhantes ao descrito por Oliveira (2009) que encontrou lesões predominantemente próximas ao trígono vesical. Este autor atribuiu o fato das lesões serem mais concentradas nesta região devido à complexa formação embriológica desta estrutura. Segundo Moore e Persaud (1995) a bexiga é originada da parte vesical do seio urogenital, porém o

trígono vesical origina-se das extremidades caudais dos ductos mesonefróides. Outra explicação para a maior quantidade de neoplasmas na porção caudal da bexiga pode ser devido a maior exposição desta área da mucosa vesical ao princípio tóxico de *P. aquilinum* (OLIVEIRA, 2009).

Ao comparar o perfil das lesões na macroscopia e na microscopia constatou-se que não é possível estabelecer uma relação entre estes achados. Observou-se que diferentes apresentações na macroscopia podem ter o mesmo diagnóstico microscópico, ou seja, uma mesma neoplasia pode revelar formas macroscópicas distintas. De forma semelhante uma mesma apresentação macroscópica pode revelar diagnóstico microscópico diferente, isto é, neoplasias diferentes podem mostrar o mesmo aspecto microscópico.

Neste estudo notou-se que apenas no caso dos hemangiossarcomas a mesma apresentação macroscópica foi observada, lesão hemangiomatosa. No entanto, lesões hemangiomas também foram encontradas em carcinomas *in situ*, carcinomas uroteliais, hemangiomas e mixomas. Portanto, não há como associar uma característica macroscópica específica a algum tipo tumoral.

Observou-se neste estudo que todas as bexigas apresentaram algum tipo de lesão não neoplásica ao exame microscópico. No entanto somente as lesões de displasia, metaplasia de células claras, inflamação e espessamento vascular foram significativas em associação aos processos neoplásicos. Acredita-se que as lesões não neoplásicas sejam, na realidade, lesões pré-neoplásicas e, desta forma, causem a progressão tumoral conforme citado por Franco et al. (2010) que afirmaram que lesões como displasia, metaplasia e inflamação são lesões pré-neoplásicas e que se não retirado o agente agressor estes processos podem evoluir para neoplasias. McGavin e Zachary (2009) também citaram que condições inflamatórias crônicas aumentam o risco de câncer nos órgãos afetados.

O fato de bexigas que não revelaram lesões neoplásicas terem mostrado processos não neoplásicos indica que em casos de HEB estas lesões podem estar envolvidas na patogênese da doença e podem levar o animal à morte por causarem quadros hemorrágicos.

### 3.7 CONCLUSÕES

Os dados encontrados neste estudo revelaram que em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica da microrregião do Caparaó, ES é possível encontrar lesões não neoplásicas e lesões neoplásicas isoladas ou em associação.

As lesões não neoplásicas encontradas foram displasia, metaplasia de células claras, hiperplasia, cistite cística, ninhos de Brun, hemorragia, inflamação, proliferação vascular, ectasia vascular, dilatação vascular e espessamento vascular. Enquanto que as lesões neoplásicas encontradas foram carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma.

Em relação aos dados epidemiológicos da doença na região foi possível observar que diversos municípios da microrregião do Caparaó bem como municípios adjacentes apresentam animais acometidos e não há predisposição por sexo.

### 3.8 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

### 3.9 REFERÊNCIAS

ALONSO-AMELOT, M.E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de La Facultad de Agronomia LUZ**, Maracaibo, v.16, p.528-547, 1999.

BALCOS, L. G. F.; BORZACCHIELLO, G.; RUSSO, V.; POPESCU, O.; ROPERTO, S.; ROPERTO, F. Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladder tumours in cattle from Romania. **Research in Veterinary Science**, London, v.85, p.145–148, 2008.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F.; BARRON, R.; NEIL, B. W. O'; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, Philadelphia, v.52, p.6898–6904, 1992.

CARVALHO, T.; NAYDAN, D.; NUNES, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. **Veterinary Pathology**, Madison, v.46, p.211–221, 2009.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v.134, p.336-346, 2006.

FALBO, M. K.; REIS, A. C. F.; BALARIN, M. R. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ARAÚJO JR, J. P.; OKANO, W.; SANDINI, I. E. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.16, n.4, p.547-558, 2005.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. **Patologia processos gerais**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 329p.

GONZÁLES, C. E.; CHAVERA, A. C.; PERALES, R. C.; FALCÓN, N. P. Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la Zona de Oxapampa, Pasco. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v.15, n.1, p.25-36, 2004.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 360p.

NUNES, L. C.; DONATELE, D. M.; SCARDUA, C. M.; DÓREA, M. D.; MONTEIRO, L. N.; BERNARDO, C. C.; CALAIS JR, A. Upper urinary tract lesions associated with enzootic bovine hematuria. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; WIERENGA, T. (Eds). **Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins**. CABI: Cambridge. 20, 2011. p.384-387.

OLIVEIRA, L. G. P. **Novos aspectos patológicos e patogenéticos da hematúria enzoótica bovina**. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Clínicas e Patológicas) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, p.65-81, 2003.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary medicine. **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. London: Saunders, 2007. 2065p.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A.; ALVARADO, C. M. Á.; VILLARROEL-NERI, R.; PINO-RAMÍREZ, D.; GARCÍA-BRACHO, D.; SÁNCHEZ-CÓMBITA, G. Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de hematuria enzoótica bovina. **Revista Científica - FCV-LUZ**, Maracaibo, v.16, n.6, p.604 - 612, 2006.

SILVA, M. A.; SCÁRDUA, C. M.; DÓREA, M. D.; NUNES, L. C.; MARTINS, I. V. F.; DONATELE, D. M. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1847-1850, 2009.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; RECH, R. R.; PIAZER, J. V. M. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1647-1650, 2006.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, Oxford, v.21, n.3, p.387-395, 2000.

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

## **CAPÍTULO 2**

### **Caracterização imunoistoquímica de neoplasias de bexigas associadas à hematúria enzoótica bovina**

Artigo a ser submetido à publicação no Periódico Semina: Ciências Agrárias

## **4 Cap. 2 – Caracterização imunoistoquímica de neoplasias de bexigas associadas à hematúria enzoótica bovina**

### **Immunohistochemical characterization of neoplasms of the urinary bladder associated with bovine enzootic hematuria**

Maria Aparecida da Silva<sup>1</sup>, Julio Lopes Sequeira<sup>2</sup>, Ana Paula Madureira<sup>3</sup>, Louisiane de Carvalho Nunes<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

<sup>2</sup> Professor Dr. em Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Professora Dr. da Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Professora PhD em Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

\* Autor para contato: [louisiane.nunes@ufes.br](mailto:louisiane.nunes@ufes.br)

#### **4.1 RESUMO**

A hematúria enzoótica bovina é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões hemangiomas relacionadas a diversos tipos de processos neoplásicos de origem epitelial e mesenquimal. O uso de biomarcadores pode auxiliar na classificação tumoral. Objetivou-se com este trabalho determinar a histogênese das lesões neoplásicas encontradas em bexigas, de animais da microrregião do Caparaó, ES com hematúria enzoótica bovina. Para isto foi realizada a

imunohistoquímica com os anticorpos primários: anti-vimentina, anti-citoqueratina, anti-CD31 e anti-uroplaquina. As neoplasias encontradas foram carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma. As marcações da citoqueratina em neoplasias epiteliais e da vimentina em neoplasias mesenquimais foram significativas ( $p < 0,05$ ). CD31 mostrou positividade em todos os vasos de todas as amostras, no entanto, a marcação foi significativa ( $p < 0,05$ ) nas células endoteliais tumorais das neoplasias mesenquimais de origem vascular, como hemangiomas e hemangiossarcomas. A marcação da uroplaquina III foi diferente nos diversos tipos neoplásicos e não demonstrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Em relação ao tipo de marcação no urotélio, observou-se que a maioria das neoplasias mostrou marcação atípica, entretanto, nos hemangiossarcomas não houve marcação do urotélio em nenhuma das amostras. A análise estatística de Spearman revelou correlação positiva ( $r_s = 0,63$ ,  $p = 0,05$ ) entre vimentina e CD31 e entre citoqueratina e uroplaquina ( $r_s = 0,61$ ,  $p = 0,05$ ). Concluiu-se que os biomarcadores anti-citoqueratina, anti-vimentina e anti-CD31 são importantes para o diagnóstico das neoplasias epiteliais, mesenquimais e vasculares, respectivamente. É possível utilizar em associação vimentina e CD31 em neoplasias mesenquimais vasculares e citoqueratina e uroplaquina em neoplasias epiteliais. A uroplaquina demonstrou-se um marcador efetivo não somente para o diagnóstico tumoral, mas também para a avaliação da integridade urotelial.

**Palavras-chave:** citoqueratina. vimentina. CD31. uroplaquina III.

## 4.2 ABSTRACT

Bovine enzootic hematuria is described by the development of hemangiomatous lesions related to the several types of neoplastic process from epithelial and mesenchymal origin. The application of biomarkers can help in the tumor classification. This research intends to determine the histogenesis of neoplastic lesions found in bladder of bovines with enzootic hematuria from Caparaó microregion in the state of Espírito Santo, Brazil. To accomplish this objective, immunohistochemical analysis was performed with primary antibodies: anti-vimentin, anti-cytokeratin, anti-CD31 and anti-uroplakin. Found neoplasms urothelial

carcinoma, *in situ* carcinoma, adenocarcinoma, hemangioma, myxoma e hemangiosarcoma. The markers of cytokeratin in epithelial neoplasms and vimentin in mesenchymal neoplasms were significant ( $p < 0.05$ ). CD31 was positive in all the vessels of all samples, however, the marking was significant ( $p < 0.05$ ) in the tumor endothelial cells of the vascular mesenchymal neoplasms, as in hemangiomas and hemangiosarcomas. The marker of uroplakin III was different in several neoplastic types and showed no significant difference ( $p > 0.05$ ). Regarding the type of marker of uroplakin on urothelium, it was observed that the majority of neoplasms showed an atypical marker, however, in the hemangiosarcomas there was no marking of the urothelium in any sample. The Spearman statistical analysis revealed a positive correlation ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.05$ ) between CD31 and vimentin and between cytokeratin and uroplakin ( $r_s = -0.61$ ,  $p = 0.05$ ). It was concluded that biomarkers anti-cytokeratin, anti-vimentin and anti-CD31 were important for the diagnosis of neoplasms epithelial, mesenchymal and vascular mesenchymal, respectively. It is possible to use in association vimentin and CD31 in vascular mesenchymal neoplasms and cytokeratin and uroplakin in epithelial neoplasms. The uroplakin is an effective marker, not only for tumor diagnosis, but also to evaluate the urothelial integrity.

**Keywords:** cytokeratin. vimentin. CD31. uroplakin III

### 4.3 INTRODUÇÃO

A ingestão por bovinos, de *Pteridium aquilinum*, conhecida vulgarmente como samambaia, em uma quantidade inferior a  $10\text{g kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ , durante um ou mais anos pode ocasionar uma doença não infecciosa e crônica denominada hematúria enzoótica bovina (HEB) (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). A HEB é caracterizada pelo desenvolvimento de neoplasias na mucosa da bexiga dos bovinos e desencadeia a presença de sangue na urina (RADOSTITIS et al., 2007). O papilomavírus bovino (BPV) associado à intoxicação por samambaia pode estar envolvido na patogênese da doença (CAMPO et al., 1992).

As bexigas dos animais acometidos por HEB podem conter em suas paredes lesões hemangiomas relacionadas a diversos tipos de processos neoplásicos de origem epitelial e mesenquimal (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). E um

mesmo animal pode apresentar em sua bexiga mais de um tipo de neoplasma com histogênese variada (PEIXOTO et al., 2003; GABRIEL et al., 2009).

Apesar da diversidade tumoral encontrada nas bexigas de animais com HEB não há um esclarecimento histológico acurado das variantes das neoplasias destas bexigas (BORZACCHIELLO et al., 2004), enquanto que em humanos há descrição detalhada de diversas variantes de carcinoma urotelial, por exemplo (MOSTOFI; DAVIS, 1999).

Utilizar a imunoistoquímica, que combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, a fim de detectar antígenos tissulares *in situ* por meio de anticorpos específicos e moléculas marcadoras, pode estabelecer o diagnóstico preciso das neoplasias e suas origens (RAMOS-VARA, 2005).

Por meio da técnica de imunoistoquímica, os tumores epiteliais como papilomas e carcinoma transicionais são positivos para marcadores biomoleculares como citoqueratina e uroplaquina III (RAMOS-VARA, 2005), e para os tumores de origem mesenquimal, como os vasculares, a vimentina e o CD31 podem ser mais específicos (TORRES-OLIVEIRA et al., 2001; RAMOS-VARA, 2005).

As citoqueratinas englobam uma grande gama de proteínas filamentosas de tamanho médio que compõem o citoesqueleto das células epiteliais (MOLL et al., 1982). Os anticorpos monoclonais AE1 podem identificar citoqueratinas ácidas (baixo peso molecular 56,5 kDa), enquanto os anticorpos monoclonais AE3 identificam citoqueratinas básicas (alto peso molecular de 65 a 67 kDa) (SCHLEGEL et al., 1980).

As uroplaquinas são encontradas nas células superficiais do urotélio, principalmente em estágios avançados de diferenciação urotelial e formam um complexo extremamente insolúvel. Foram isoladas da bexiga de bovinos três tipos de uroplaquina de acordo com seus pesos moleculares uroplaquina I (27 kDa), uroplaquina II (15 kDa) e uroplaquina III (47 kDa). No entanto, as uroplaquinas I e II foram encontradas apenas na superfície do urotélio, e a uroplaquina III foi encontrada em todas as camadas do urotélio maduro (WU et al., 1990).

Posteriormente Yu et al. (1994) constataram na bexiga de bovinos que há duas isoformas para a uroplaquina I, uroplaquina Ia com 27 kDa e uroplaquina Ib com 28 kDa. Os quatro tipos de uroplaquina, Ia, Ib, II e III foram encontradas também no urotélio de bexigas de humanos, macacos, ovinos, suínos, caninos, coelhos, ratos e camundongos (WU et al., 1994).

Nas células de origem mesenquimal como os fibroblastos, células endoteliais, leucócitos e células mioepiteliais a vimentina é o principal filamento intermediário que compõe o citoesqueleto e participa na arquitetura celular, integridade tecidual, adesão, migração e sinalização celular (IVASKA et al., 2007).

A molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1) também conhecida como CD31 mantém a integridade endotelial através da adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular e auxilia na passagem das células sanguíneas para a luz dos vasos (BEHAR et al., 1996; BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003; LISTI et al., 2004), pode se expressar na superfície de células endoteliais, plaquetas e leucócitos (ELRAYESS; TALMUD, 2005), como macrófagos e histiócitos (AKIBA et al., 2011).

O biomarcador CD31 foi utilizado de forma eficiente em humanos para o diagnóstico de angiossarcomas (POHAR-MARINSEK; LAMOVEC, 2010) e no diagnóstico de hemangiossarcoma em macaco aranha de cara vermelha (CASAGRANDE et al., 2009).

Devido à existência de muitos casos de HEB, 56,4% de prevalência na microrregião do Caparaó, sul do estado do Espírito Santo, (SILVA et al., 2009), objetivou-se com este trabalho determinar a histogênese das lesões neoplásicas encontradas em bexigas, bem como, identificar e classificar novas variantes tumorais, de animais da microrregião do Caparaó, ES com hematúria enzoótica bovina, por meio da imunistoquímica com os biomarcadores anti-vimentina, anti-citoqueratina, anti-CD31 e anti-uroplaquina.

#### **4.4 MATERIAL E MÉTODOS**

No matadouro frigorífico de Muniz Freire, ES, foram selecionadas 26 bexigas de bovinos machos e fêmeas, oriundos de propriedades localizadas em municípios da microrregião do Caparaó, ES com histórico da presença de *Pteridium aquilinum* e que apresentavam neoplasias.

As bexigas avaliadas foram previamente seccionadas no sentido caudo-cranial pela face ventral do órgão para constatação da presença de hematúria e/ou de lesões macroscópicas, como hemorragias focais e difusas, lesões

hemangiomas e papilomas. Juntamente com a bexiga inteira foi coletada a urina, em tubos de vidro de 10 mL.

As bexigas foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos transparentes, identificadas quanto à procedência, e colocadas junto com os tubos de urina devidamente identificados em caixas isotérmicas com gelo para o transporte ao Hospital Veterinário da UFES. No Setor de Patologia Animal a urina foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos para classificação em macro ou microhematúria, segundo o método descrito por Falbo et al. (2005).

Para uma melhor triagem das lesões, cada bexiga foi dividida em quatro quadrantes (A, B, C e D), que correspondiam às porções cranial (A e B) e caudal (C e D) da bexiga, e coletado um fragmento de cada alteração macroscópica observada. No quadrante que não existiam lesões visíveis, foi coletado um fragmento aleatório do centro do quadrante.

As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Em seguida, submetidas à confecção de cortes histológicos de três micrômetros em micrótomo rotativo. Estes cortes foram depositados em lâminas histológicas de vidro com extremidade fosca e corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) para uma avaliação geral das alterações morfológicas e classificação das lesões de acordo com Oliveira (2009).

A técnica de imunistoquímica foi realizada somente nos fragmentos que apresentaram lesões neoplásicas ao exame microscópico, com a utilização dos seguintes anticorpos primários: anti-vimentina (Monoclonal Mouse Antibody to Porcine Vimentin (Clone V9) Diagnostic BioSystems<sup>®</sup>), anti-citoqueratina (Mouse Anti-Human Pan Cytokeratin Monoclonal Antibody, Clone AE1/AE3, Biocare Medical<sup>®</sup>), anti-CD31 (Rabbit Anti-Human CD31 Monoclonal Antibody, Clone SP38, Spring Bioscience<sup>®</sup>) e anti-uroplaquina (Mouse Anti-Human Uroplakin III Monoclonal Antibody, Clone AU1, Biocare Medical<sup>®</sup>), previamente padronizados no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. Para padronização dos biomarcadores anti-vimentina e anti-uroplaquina foram utilizados cortes de bexiga bovina, anti-citoqueratina cortes de adenocarcinoma de glândula ceruminosa canino e para anti-CD-31 cortes de cordão umbilical humano nas diluições de 1:1000, 1:100, 1:800 e 1:200, respectivamente.

Para a realização da imunistoquímica, inicialmente as lâminas foram mergulhadas em álcool a 70% e, depois de secas, imersas em cola líquida a base

de organossilano (A3648 – SIGMA, St. Louis, E.U.A.). Cortes histológicos com três micrômetros de espessura foram feitos em micrótomo rotativo e depositados sobre lâminas de vidro com extremidade fosca. As lâminas com os cortes, em seguida, permaneceram na estufa a 60°C por 24 horas para fixação do tecido à lâmina.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito utilizando-se solução de água oxigenada a 10 volumes com metanol (1:9) por 10 minutos. Para a recuperação antigênica do material foi utilizada solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,04, em Pascal (painel de pressão microprocessada Dako® Denmark A/S) 125 °C por 30 segundos. O material foi então resfriado por cerca de 20 minutos até atingir a temperatura ambiente. Após este procedimento foi realizada lavagem com Tris (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical® C.O., St. Louis, E.U.A.) pH 7,42. Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó Molico® a 3% em Tris por uma hora, em seguida foi realizada lavagem com Tris.

A incubação com os anticorpos primários anti-vimentina, anti-citoqueratina, anti-CD31 e anti-uroplaquina foi realizada após a diluição, 1:1000, 1:800, 1:200 e 1:100, respectivamente, em solução de albumina sérica bovina a 0,1% em câmara úmida por 18 horas a 4 °C. Após este procedimento as lâminas foram lavadas com solução de Tris e utilizado o kit NovoLink™ (Novocastra Laboratories Ltda. RE7140-K) que contém anticorpo secundário e sistema de amplificação por polímeros. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de 3,3'diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 Dako® Cytomation) durante três minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 8 minutos e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas aos processos de desidratação e montagem em resina sintética.

Posteriormente, foi realizada a avaliação microscópica do material com o auxílio de microscópio óptico. Para a confirmação da classificação tumoral verificou-se a marcação positiva para cada biomarcador. No caso do anticorpo anti-uroplaquina foi considerada também a forma de marcação no urotélio, classificada como normal ou atípica. A marcação atípica foi caracterizada pela descontinuidade da marcação e presença de coloração heterogênea mais evidente na porção apical da célula, segundo descrito por Carvalho et al. (2009).

Para a avaliação da marcação da vimentina, citoqueratina e CD31 foi utilizado o teste de Qui-quadrado acompanhado do teste exato de Fisher. Para avaliação da

expressão da uroplaquina foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste *post hoc* de Dunn. Para avaliar a correlação entre a marcação dos anticorpos foi realizado o teste de Spearman. Todos os testes foram realizados ao nível de 5% e a estatística descritiva foi utilizada para a classificação histomorfológica das lesões.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação das 26 bexigas, 50% (13/26) apresentaram apenas um tipo neoplásico, 26,93% (7/26) dois tipos neoplásicos, 15,38% (4/26) três tipos neoplásicos e 7,69% (2/26) quatro tipos neoplásicos.

Dentre as neoplasias encontradas, 53,85% (14/26) das bexigas apresentaram neoplasias de origem epitelial e 88,46% (23/26) neoplasias de origem mesenquimal. Em 38,46% (10/26) das bexigas foram encontradas neoplasias de origem epitelial e mesenquimal, em 23,08% (6/26) mais de um tipo de neoplasia de origem epitelial e em 15,38% (4/26) mais de um tipo de neoplasia de origem mesenquimal. As neoplasias de origem epitelial foram: carcinoma urotelial em 34,61% (9/26); carcinoma *in situ* em 30,77% (8/26) e adenocarcinoma em 15,38% (4/26) das bexigas. As neoplasias de origem mesenquimal foram: hemangioma em 50% (13/26); mixoma em 42,31% (11/26) e hemangiossarcoma em 7,69% (2/26) das bexigas.

Ao avaliar os cortes submetidos à imunoistoquímica constatou-se que a citoqueratina (AE1/AE3) demonstrou expressão positiva em 100% das neoplasias de origem epitelial, assim como a expressão do biomarcador anti-vimentina foi positiva em 100% das neoplasias de origem mesenquimal. Tanto para anti-citoqueratina quanto para anti-vimentina as células neoplásicas apresentaram marcações citoplasmáticas. As Figuras 5 e 6 ilustram a marcação com os anticorpos anti-citoqueratina e anti-vimentina, respectivamente.

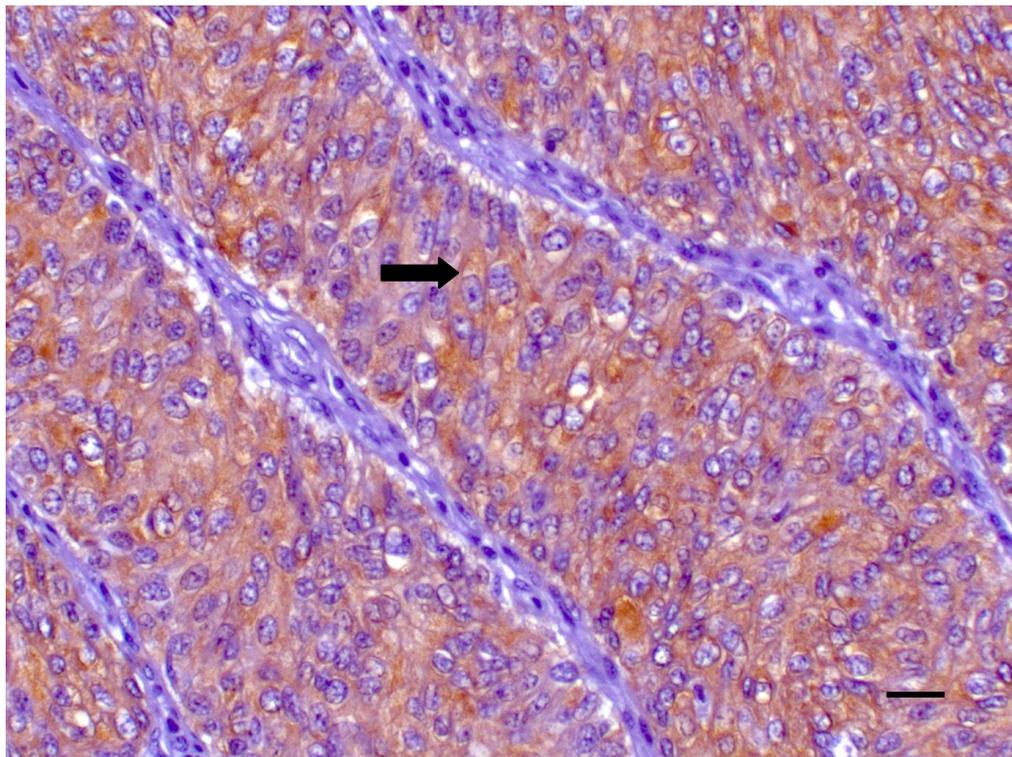


Figura 5 - Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia epitelial maligna (carcinoma urotelial, P 226/10). Marcação positiva de citoqueratina (1:800) em células neoplásicas. Objetiva de 40x (barra= 20 $\mu$ m).

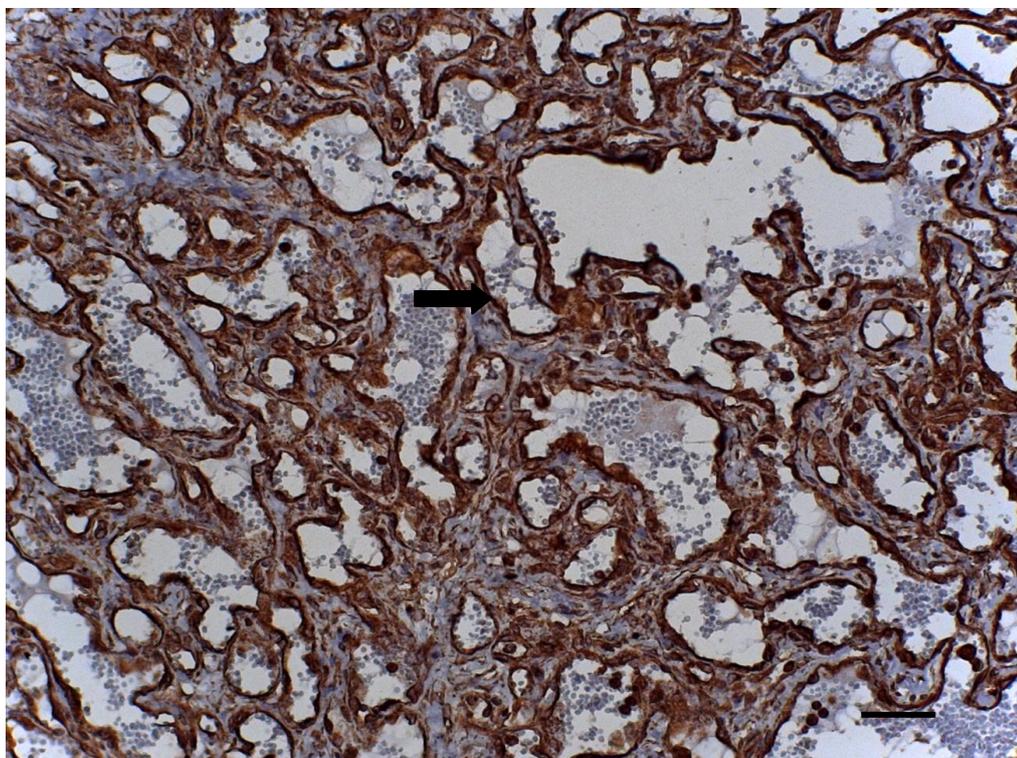


Figura 6 - Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia benigna (hemangioma, P 229/10). Marcação positiva de vimentina (1:1000) em células neoplásicas. Objetiva de 20x (barra= 50 $\mu$ m).

Houve maior frequência de marcação da citoqueratina nas neoplasias epiteliais e da vimentina em neoplasias mesenquimais mostrando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Gabriel et al. (2009) também observaram em bexiga marcação positiva da citoqueratina e da vimentina em neoplasias epiteliais e mesenquimais, respectivamente.

O fato de ter sido encontrado no exame histopatológico das lesões observadas na bexiga de bovinos com HEB diversos tipos de processos neoplásicos de origem epitelial e mesenquimal, em um mesmo animal está de acordo com o relatado por Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2000); Peixoto et al. (2003). Esta diversidade tumoral confirma o potencial carcinogênico da *Pteridium aquilinum*, cujos princípios tóxicos afetam tanto o urotélio quanto a lâmina própria, formados por tecidos de origem epitelial e mesenquimal, respectivamente.

Os tipos de tumores carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006). Estes autores encontraram como principais neoplasias em animais com HEB tumores malignos e benignos de origem epitelial e mesenquimal, como carcinoma de células de transição (41,4%), hemangioma (29,5%), papiloma (9,6%) e hemangiossarcoma (4,9%). Hemangiomas e hemangiossarcomas também foram encontrados nos estudos realizados por Souto et al. (2006) e Gabriel et al. (2009).

As marcações observadas no presente estudo para citoqueratina e vimentina revelaram que cada biomarcador foi específico apenas para um tipo de neoplasia, anti-citoqueratina para neoplasias epiteliais e anti-vimentina para neoplasias mesenquimais. Entretanto há casos de neoplasias em que ocorre marcação para os dois biomarcadores como no mesotelioma (PIACENTI et al., 2004) e no carcinossarcoma tireoidiano (RODRIGUES et al., 2007).

A positividade de marcação da citoqueratina em todos os carcinomas de bexiga do presente estudo estão de acordo com Lucena et al. (2011) que observaram em carcinomas renais bovinos expressão positiva para citoqueratina (AE1/AE3) em 100% dos casos avaliados.

O fato de 100% das neoplasias epiteliais terem sido marcadas pela citoqueratina (AE1/AE3), enquanto nenhuma das neoplasias mesenquimais expressou esta marcação, deve-se ao fato da citoqueratina ser um constituinte exclusivo do citoesqueleto de células epiteliais (MOLL et al., 1982). A utilização do

anticorpo pancitoqueratina AE1/AE3 permite avaliar tanto a presença de citoqueratinas ácidas quanto básicas (SCHLEGEL et al.,1980), o que garantiu eficácia de 100% nas marcações de neoplasias de origem epitelial. Trindade et al. (2004) observaram marcação positiva para a citoqueratina (AE1/AE3) em doença de Paget extramamária em que este anticorpo foi utilizado para confirmação da origem epitelial da lesão.

Por outro lado, a vimentina, por ser constituinte exclusivo do citoesqueleto de células de origem mesenquimal (IVASKA et al., 2007), não mostrou marcação em nenhuma neoplasia de origem epitelial neste estudo. Entretanto em schwannomas e neurofibromas, que são neoplasias de origem mesenquimal, esta marcação ocorreu em 100% dos casos (VIOTT et al., 2007).

Ao avaliar o CD31 constatou-se que houve positividade em todos os vasos de todas as amostras. A marcação nas células neoplásicas ocorreu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) na membrana das células endoteliais tumorais nas amostras de neoplasias mesenquimais de origem vascular, como hemangiomas e hemangiossarcomas. A Figura 7 ilustra a marcação do anticorpo anti-CD31 em amostras de bexiga.

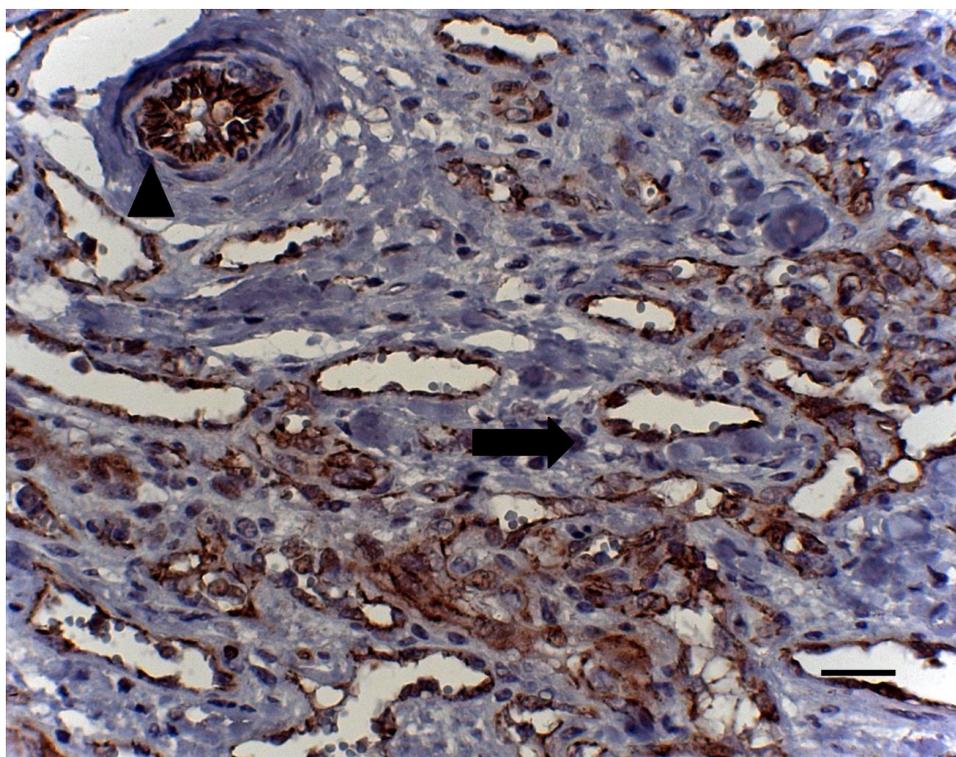


Figura 7 – Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular maligna (hemangiossarcoma, P241/10). Expressão moderada de CD31 (1:200) em endotélio de vasos neoplásicos (seta) e acentuada (cabeça de seta) em endotélio de vasos não neoplásicos. Objetiva de 20x (barra= 50 $\mu$ m).

Albelda et al. (1991) preconizaram a utilização do CD31 ao verificarem marcação na superfície de células endoteliais, semelhante ao observado neste estudo. A positividade em 100% das neoplasias mesenquimais de origem vascular é semelhante ao descrito por Ramos-Vara (2005), comprovado por Casagrande et al. (2009) em hemangiossarcoma primário intrauterino em macaco aranha de cara vermelha e Carvalho et al. (2009) em lesões do tecido endotelial de bexigas de bovinos com HEB.

A marcação do CD31 foi negativa em 100% das células neoplásicas dos mixomas e das neoplasias de origem epitelial, porém houve marcação dos vasos intratumorais, semelhante aos achados de Giatromanolaki et al. (1997) em carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas pulmonares, de Yilmazer, Han e Onal (2007) em carcinoma renal de humanos e de Cristina et al. (2010) em adenomas de hipófise. Os mixomas provavelmente não expressaram marcação para o CD31, pois são constituídos de fibroblastos e tecido mucóide, que não expressam CD31.

A marcação da uroplaquina III foi diferente nos diversos tipos neoplásicos e não demonstrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Em relação ao tipo de marcação no urotélio, observou-se que nos carcinomas uroteliais (9/9) e nos adenocarcinomas (4/4) houve 100% de expressão atípica; nos carcinomas *in situ*, em 87,5% (7/8) a marcação foi atípica e em 12,5% (1/8) foi normal; nos hemangiomas, em 61,54% (8/13) a marcação foi atípica, 7,69% (1/13) normal e 30,77% (4/13) negativa; nos mixomas, 9,1% (1/11) a marcação foi atípica, 9,1% (1/11) normal e 81,8% (9/11) negativa. Nos hemangiossarcomas não houve marcação do urotélio em nenhuma das amostras. A Figura 8 ilustra a marcação para o anticorpo anti-uroplaquina.

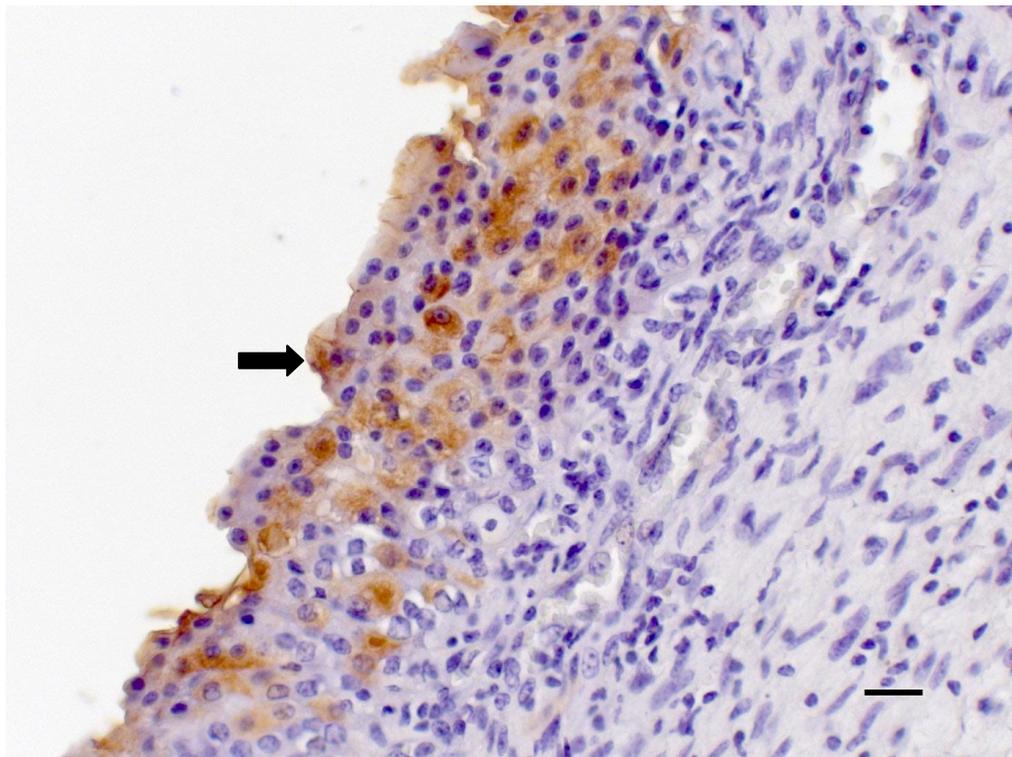


Figura 8 - Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica (P 217/10). Marcação positiva de uroplaquina (1:100) caracterizando urotélio atípico (seta). Objetiva de 40x (barra= 20µm).

Semelhante ao presente estudo, Cota (2011) observou alteração no urotélio de carcinomas de bexigas marcados com uroplaquina III nos tumores com alto grau de malignidade e invasivos. Carvalho et al. (2009) também verificaram urotélio adjacente às neoplasias com marcação atípica nos hemangiomas, no entanto, estes autores encontraram esta mesma marcação nos hemangiossarcomas. No presente estudo, acredita-se que não tenha sido observada marcação da uroplaquina nos hemangiossarcomas pelo caráter invasivo deste tipo de neoplasia que leva à compressão e destruição do urotélio.

A uroplaquina III é uma proteína encontrada revestindo as células mais superficiais do urotélio da bexiga e a estabilidade desta proteína frente a condições adversas serve como uma barreira eficaz para a permeabilidade celular (WU et al., 1990). As agressões à barreira que as uroplaquinas formam no urotélio permitem que princípios tóxicos cheguem aos vasos sanguíneos da submucosa e pode ocasionar hematúria e induzir edema (KYUNG; PARK; LEE, 2011). O fato de ter sido encontrada marcação atípica da uroplaquina no urotélio na maioria das neoplasias epiteliais e dos hemangiomas pode explicar a ocorrência de hematúria nos animais estudados. É possível que a marcação irregular da uroplaquina, por interferir na

permeabilidade celular, possa facilitar a difusão dos princípios tóxicos da samambaia.

Por outro lado, a enorme estabilidade das uroplaquinas foi avaliada em estudos de indução de cistite em ratos pelo uso de medicamentos que demonstrou que a uroplaquina III sofreu menos danos e permaneceu mais intacta (KYUNG; PARK; LEE, 2011). Estes dados revelam que esta proteína não é facilmente danificada e isto pode indicar que os princípios tóxicos da samambaia sejam bastante nocivos às células uroteliais.

Zupancic et al. (2011) ao estudarem o comportamento da uroplaquina em urotélios normais e com lesões pré-neoplásicas de ratos constataram que mesmo em lesões pré-neoplásicas a uroplaquina III mantém sua localização. No presente estudo foi constatado presença de marcação normal da uroplaquina nos carcinomas *in situ*, nos hemangiomas e nos mixomas. Acredita-se que esta marcação normal tenha ocorrido em alguns casos pelo fato destes tipos neoplásicos ocuparem pequenas áreas de tecido ou por apresentarem crescimento pouco invasivo.

O fato de ter sido observada marcação negativa para uroplaquina em algumas amostras de hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma pode ser justificada pela invasão ou destruição do urotélio adjacente. Nestas neoplasias é possível se verificar crescimento exofítico que acomete o urotélio.

Kondi-Pafiti et al. (2011) verificaram a presença de marcação da uroplaquina III em 76,66% (23/30) dos casos de tumores ovarianos de Brenner que apresentam em sua constituição células do tipo urotelial. Trindade et al. (2004); Torre et al. (2008) afirmam que a doença de Paget extramamária associada ao carcinoma urotelial tem marcação positiva para uroplaquina III, semelhante ao encontrado no presente estudo, em que todas as bexigas com carcinoma urotelial foram marcadas com esse biomarcador.

A análise estatística de Spearman revelou correlação positiva ( $r_s = 0,63$ ,  $p = 0,05$ ) entre vimentina e CD31 e entre citoqueratina e uroplaquina ( $r_s = 0,61$ ,  $p = 0,05$ ), o que indica que, na maioria das vezes em que ocorrer expressão de vimentina no tecido tumoral ocorrerá também a expressão de CD31. Assim como, quando há marcação de citoqueratina em amostra tumoral de bexiga é possível que se observe também expressão de uroplaquina.

Houve correlação negativa entre vimentina e citoqueratina ( $r_s = -1$ ,  $p = 0,05$ ), entre vimentina e uroplaquina ( $r_s = -0,61$ ,  $p = 0,05$ ), entre CD31 e citoqueratina ( $r_s = -$

0,63,  $p= 0,05$ ) e entre CD31 e uroplaquina ( $r_s= - 0,14$ ,  $p= 0,05$ ). Estes dados indicam que em neoplasias de bexiga quando há marcação de vimentina não há expressão de citoqueratina. Por outro lado, quando há expressão de vimentina a probabilidade da expressão de uroplaquina é menor. Em relação à expressão do CD31, quando ocorre expressão deste marcador no tecido, a expressão da uroplaquina ou citoqueratina será menor.

As correlações encontradas neste estudo estão de acordo com Ramos-Vara (2005) que citou que os tumores epiteliais como papilomas e carcinoma transicionais são positivos para marcadores biomoleculares como citoqueratina e uroplaquina III e, para os tumores de origem mesenquimal, como os vasculares, a vimentina e CD31 podem ser mais específicos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Torres-Oliveira et al. (2001) que encontraram marcação de vimentina e CD31 e negativa para citoqueratina em neoplasias vasculares cardíacas em humanos e por Pastor-Navarro et al. (2010) que verificaram marcação de citoqueratina (AE1/AE3) e uroplaquina em cultivo de células uroteliais.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Concluiu-se com o presente trabalho que os animais da microrregião do Caparaó, ES acometidos pela HEB, apresentam diversos tipos neoplásicos como carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, hemangiossarcoma e mixoma. Entretanto, não foi possível identificar novas variantes destes tipos neoplásicos.

A histogênese tumoral foi definida com o auxílio da imunohistoquímica e revelou que os biomarcadores anti-citoqueratina, anti-vimentina e anti-CD31 são importantes para o diagnóstico das neoplasias epiteliais, mesenquimais e vasculares, respectivamente. É possível utilizar em associação vimentina e CD31 em neoplasias mesenquimais vasculares e citoqueratina e uroplaquina em neoplasias epiteliais.

A uroplaquina demonstrou-se um marcador efetivo não somente para o diagnóstico tumoral, mas também para a avaliação da integridade urotelial.

#### 4.7 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

#### 4.8 REFERÊNCIAS

AKIBA, J.; HARADA, H.; KAWAHARA, A.; ARAKAWA, F.; MIHASHI, H.; MIHASHI, R.; OHSHIMA, K.; YANO, H. Histiocytic sarcoma of the parotid gland region. **Pathology International**, Tokyo, v.61, p.373-376, 2011.

ALBELDA, S. M.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; NEWMANLL, P. J. Molecular and cellular properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.114, p.1059-1068, 1991.

BEHAR, E.; CHAO, N. J.; HIRAKI, D. D.; KRISHNASWAMY, S.; BROWN, B. W.; ZEHNDER, J. L.; GRUMET, F. C. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.334, n.5, p.286-291, 1996.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.170, n.2, p.191-203, 2003.

BORZACCHIELLO, G.; AMBROSIO, V.; LEONARDI, L.; FRUCI, R.; GALATI, P.; ROPERTO, F. Rare tumors in domestic animals: a lipid cell variant of urothelial carcinoma of the urinary bladder in a cow and a case of vesical carcinossarcoma in a dog. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.2, p.273-274, 2004.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F.; BARRON, R.; NEIL, B. W. O'.; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, Philadelphia, v.52, p.6898–6904, 1992.

CARVALHO, T.; NAYDAN, D.; NUNES, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. **Veterinary Pathology**, Madison, v.46, p.211–221, 2009.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v.134, p.336-346, 2006.

CASAGRANDE, R. A.; TORRES, L. N.; GOMES, M. S.; QUAGGLIA NETO, F.; KANAMURA, C.; KISHIMOTO, L.; MATUSHIMA, E. R. Hemangiossarcoma primário intrauterino em um macaco aranha de cara vermelha (*Ateles paniscus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.37, n.1, p.59-63, 2009.

COTA, J. B. B. **Identificação de proteínas estruturais em tumores de bexiga de bovinos**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2011.

CRISTINA, C.; PEREZ-MILLAN, M. I.; LUQUE, G.; DULCE, R. A.; SEVLEVER, G.; BERNER, S. I.; VILLALOBOS, D. B. VEGF and CD31 Association in pituitary adenomas. **Endocrine Pathology**, Toronto, v. 21, p.154–160, 2010.

ELRAYESS, M. A.; TALMUD, P. J. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) e coronary heart disease. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.121, p.77-79, 2005.

FALBO, M. K.; REIS, A. C. F.; BALARIN, M. R. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ARAÚJO JR, J. P.; OKANO, W.; SANDINI, I. E. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.16, n.4, p.547-558, 2005.

GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, R. A.; PIAZER, J. V. M.; BARROS, C. S. L.; MARTINS, T. B.; ROSA, F. B. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.29, n.7, p.515-525, 2009.

GIATROMANOLAKI, A.; KOUKOURAKIS, M. I.; THEODOSSIOU, D.; BARBATIS, K.; O'BYRNE, K.; HARRIS, A. L.; GATTER, K. C. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.3, p.2485-2492, 1997.

IVASKA, J.; PALLARI, H. M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, Philadelphia, v.313, n.10, p.2050-2062, 2007.

KONDI-PAFITI, A.; KAIRI-VASSILATOU, E.; IAVAZZO, C.; VOUZA, E.; MAVRIGIANNAKI, P.; VLAHODIMITROPOULOS, D.; LIAPIS, A. Clinicopathological features and immunoprofile of 30 cases of Brenner ovarian tumors. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, New Jersey, Published online: 25 december 2011. Doi: 10.1007/s00404-011-2182-5.

KYUNG, Y. S.; PARK, H. Y.; LEE, G. Preservation of uroplakins by 2-mercaptoethanesulfonate in cyclophosphamide-induced rat cystitis. **Archives of Toxicology**, Dortmund, v.85, p.51–57, 2011.

LISTI, F.; CANDORE, G.; LIO, D.; CAVALLONE, L.; COLONNA-ROMANO, G.; CARUSO, M.; HOFFMANN, E.; CARUSO, C. Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients Sicily. **European Journal of Immunogenetics**, New Jersey, v.31, p.175-178, 2004.

LUCENA, R. B.; CARMO, P. M. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. C.; PIEREZAN, F.; TESSELE, B.; GIARETTA, P. R.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Carcinoma de células renais em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.31, n.6, p.487-494, 2011.

MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPELER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. **Cell**, Massachusetts, v.31, p.11-24, 1982.

MOSTOFI, F. K.; DAVIS, C. J. Histological typing of urinary bladder tumors. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International histological classification of tumors**. Springer: Berlin, 1999, p.7-13.

PASTOR-NAVARRO, T.; BEAMUD-CORTE´S, M.; FORNAS-BUIL, E.; MORATALLA-CHARCOS, L. M.; OSCA-GARCÍA, J. M.; GIL-SALOM, M. Células madre y medicina regenerativa em urología, 2.<sup>a</sup> parte: urotelio, vejiga, uretra y próstata. **Actas Urológicas Españolas**, Madri, v.34, n.7, p.592–597, 2010.

PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, p.65-81, 2003.

PIACENTI, A. M.; OCARINO, N. M.; SILVA, A. E.; RACHID, M. A.; FRANÇA, S. A.; SERAKIDES, R. Mesotelioma pleural com metástase renal em gato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.4, p.558-561, 2004.

POHAR-MARINSEK, Z.; LAMOVEC, J. Angiosarcoma in FNA smears: diagnostic accuracy, morphology, immunocytochemistry and differential diagnoses. **Cytopathology**, Oxford, v.21, p.311–319, 2010.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary medicine. **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. London: Saunders, 2007. 2065p.

RAMOS-VARA, J. A. Imunoistoquímica, não tenha medo do marrom, vermelho e azul. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FUNDAÇÃO C. L. DAVIS, 7., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2005.

RODRIGUES, A.; MASUDA, E. K.; INKELMANN, M. A.; RAMOS, A. T.; MARQUES, B. M. F. P.; MARTINS, T. B.; KOMMERS, G. D. Carcinossarcoma tireoidiano em um cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1188-1191, 2007.

SCHLEGEL, R.; BANKS-SCHLEGEL, S.; MCLEOD, J. A.; PINKNS, G. S. Imunoperoxidase localization of keratin in human neoplasms. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.101, p.41-50, 1980.

SILVA, M. A.; SCÁRDUA, C. M.; DÓREA, M. D.; NUNES, L. C.; MARTINS, I. V. F.; DONATELE, D. M. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1847-1850, 2009.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; RECH, R. R.; PIAZER, J. V. M. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1647-1650, 2006.

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

TORRE, A. C.; SUBIZAR, D.; RAMOS, M. C. G.; ENZ, P. A.; KOWALCZUK, A.; GALIMBERTI, R. ¿Eccema vulvar crónico? **Revista do Hospital Italiano de Buenos Aires**, Buenos Aires, v.28, n.2, 2008.

TORRES-OLIVEIRA, F. J.; LAG-ASTURIANO, E.; TORRES-GÓMEZ, F. J.; VINUESA, P. G. G.; PÉREZ-DUARTE, E.; FONT-CABRERA, J. I. Angiosarcoma primario de aurícula derecha. **Revista Española de Patología**, Madrid, v.34, n.1, p.37-43, 2001.

TRINDADE, E. S.; POLCHEIRA, P. A.; BASÍLIO, D. B.; ROCHA, Z. N.; ROCHA JÚNIOR, J. L.; PEREIRA PRIMO, G. R. Doença de Paget invasiva da vulva e região perianal: relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.26, n.4, p.329-335, 2004.

VIOTT, A. M.; RAMOS, A. T.; INKELMANN, M. A.; KOMMERS, G. D.; GRAÇA, D. L. Aspectos histoquímicos e imunoistoquímicos nos neoplasmas do sistema nervoso periférico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1145-1153, 2007.

WU, X. R.; LIN, J. H.; WALZ, T.; HANER, M.; YU, J.; AEBI, U.; SUN, T. T. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.269, p.13716–13724, 1994.

WU, X. R.; MANABE, M.; YU, J.; SUN, T. T. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.265, p.19170–19179, 1990.

YILMAZER, D.; HAN, U.; ONAL, B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. **International Urology and Nephrology**, New Jersey, v.39, p. 691-698, 2007.

YU, J.; LIN, J. H.; WU, X. R.; SUN, T. T. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.125, n.1, p.171-182, 1994.

ZUPANCIC, D.; ZAKRAJSEK, M.; ZHOU, G.; ROMIH, R. Expression and localization of four uroplakins in urothelial preneoplastic lesions. **Histochemistry and Cell Biology**, Heidelberg, v.136, p.491–450, 2011.

## **CAPÍTULO 3**

**Expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica: avaliação intra e extratumoral**

Artigo a ser submetido à publicação no periódico *Experimental and Toxicologic Pathology*.

## 5 Cap. 3 – Expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica: avaliação intra e extratumoral

### Expression of VEGF and CD31 in the vasculature bladder of cattle with enzootic hematuria: assessing intra-and extratumoral

Maria Aparecida da Silva<sup>1</sup>, Dyeime Ribeiro de Sousa<sup>1</sup>, Anderson Barros Archanjo<sup>2</sup>, Julio Lopes Sequeira<sup>3</sup>, Ana Paula Madureira<sup>4</sup>, Louisiane de Carvalho Nunes<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

<sup>2</sup> Graduando em Farmácia, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Dr. Em Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Professora Dra. da Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, Minas Gerais, Brasil.

<sup>5</sup> Professora PhD em Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

\* Autor para contato: [louisiane.nunes@ufes.br](mailto:louisiane.nunes@ufes.br)

#### 5.1 RESUMO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença não infecciosa e crônica, causada pela intoxicação por *Pteridium aquilinum* em associação com o papilomavírus. Objetivou-se com este trabalho avaliar a expressão de VEGF e CD31 (PECAM-1) na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica no tecido

tumoral e extratumoral com o intuito de verificar a sua relação com a progressão tumoral. Para realização do experimento foram utilizadas 26 bexigas coletadas de matadouro frigorífico que apresentaram neoplasias e que foram submetidas ao método imunistoquímico utilizando-se os anticorpos anti-CD31 e anti-VEGF. As neoplasias encontradas foram carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma. Houve expressão do CD31 e VEGF nos vasos sanguíneos extra e intratumorais. A intensidade do CD31 variou de moderada a leve nos tumores vasculares enquanto que a do VEGF não se mostrou significativa. A quantidade de vasos extratumorais marcados pelo CD31 não diferiu entre os diferentes tipos de neoplasia, enquanto que pelo VEGF, houve diferença significativa entre os mixomas e adenocarcinomas ( $p < 0,05$ ). No entanto, nos vasos intratumorais, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos biomarcadores entre os diferentes tipos tumorais. Houve correlação positiva entre o número de vasos extra e intratumorais nos hemangiomas, hemangiossarcomas e mixomas marcados pelo CD31 e nos hemangiomas, mixomas e adenocarcinomas marcados pelo VEGF. Houve correlação negativa entre a expressão de CD31 e de VEGF nos vasos extratumorais nos hemangiossarcomas. Pode-se concluir que há expressão dos biomarcadores CD31 e VEGF nos vasos sanguíneos extra e intratumorais de bexigas de bovinos com HEB. Há variação na intensidade de marcação destes biomarcadores nos diferentes tipos tumorais e no tecido adjacente à neoplasia o que revela que quanto maior a expressão de CD31 com intensidade leve associada à maior expressão de VEGF pior é o prognóstico. Além disto, nota-se que o estudo da vasculatura vesical extratumoral pode ser de grande importância para esclarecer a patogênese da HEB em processos não neoplásicos. Assim, a utilização destes biomarcadores torna-se uma ferramenta relevante para a avaliação da integridade dos vasos e do crescimento vascular em bexigas de bovinos com HEB.

**Palavras-chave:** PECAM-1. fator de crescimento vascular. neoplasia. hematúria enzoótica bovina.

## 5.2 ABSTRACT

Bovine enzootic hematuria (BEH) is a chronic, non-infectious disease caused by intoxication with *Pteridium aquilinum* in association with papillomavirus. The objective of the present work was to evaluate the expression of VEGF and CD31 in tumoral and extratumoral tissues, in the vesical vasculature of cattle with BEH, in order to verify their relationship with tumoral progression. For this purpose, 26 bladders presenting neoplasms were collected in slaughterhouse and subjected to immunohistochemical procedures using anti-CD31 and anti-VEGF antibodies. Detected neoplastic types were urothelial carcinoma, *in situ* carcinoma, adenocarcinoma, hemangioma, myxoma, and hemangiosarcoma. Expression of CD31 and VEGF was observed in intra- and extratumoral blood vessels. CD31 expression ranged from light to moderate in vascular tumors, whereas VEGF intensity was not significant. The number of extratumoral vessels stained by CD31 did not differ among the various neoplastic types, whereas staining with VEGF exhibited significant differences between myxomas and adenocarcinomas ( $p < 0.05$ ). Further, significant difference ( $p < 0.05$ ) in biomarker CD31 and VEGF expression was observed among different tumor types in intratumoral vessels. Positive correlation existed between the number of intra- and extratumoral vessels in hemangiomas, myxomas, and adenocarcinomas stained with VEGF, but negative correlation was obtained between the expressions of CD31 and VEGF in extratumoral vessels of hemangiosarcomas. It could be concluded that the biomarkers CD31 and VEGF are expressed in intra- and extratumoral blood vessels in bladders of cattle with BEH. Staining intensity with these biomarkers varied among different tumor types, as well as in tissue adjacent to the neoplasm, showing that the greater the light-intensity expression of CD31, associated with higher VEGF expression, the worse the prognosis. Moreover, studying the extratumoral vesical vasculature may be of great importance to explain the pathogenesis of BEH in non-neoplastic processes. Thus, the utilization of these biomarkers represents a valuable tool to evaluate vessel integrity and vascular growth in bladders of cattle with BEH.

**Keywords:** PECAM-1. vascular growth factor. neoplasm. bovine enzootic hematuria.

### 5.3 INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença não infecciosa e crônica, causada pela intoxicação por *Pteridium aquilinum*, planta conhecida vulgarmente como samambaia (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Caracteriza-se pelo desenvolvimento de neoplasias na mucosa da bexiga dos bovinos, quando ocorre ingestão da planta (RADOSTITIS et al., 2007). Além da intoxicação por samambaia o papilomavírus bovino (BPV) também pode estar envolvido na patogênese desta doença (CAMPO et al., 1992).

As lesões hemangiomasas que são observadas na parede da bexiga de animais com HEB podem estar relacionadas a diversos tipos de processos patológicos neoplásicos e não neoplásicos (PEIXOTO et al., 2003). Gabriel et al. (2009) comprovaram que em um mesmo animal pode existir mais de um tipo de neoplasma, e que a histogênese destes tumores é variada.

Segundo Oliveira (2009), uma maior intensidade de hemorragias em casos de HEB pode estar associada a proliferações hiperplásicas ou neoplásicas de vasos sanguíneos. Este mesmo autor verificou alterações em vasos sanguíneos em 72,2% dos casos de lesões de bexiga de animais com HEB caracterizadas por proliferações difusas ou multifocais na lâmina própria sem padrão organizacional.

Weidnere e Folkman (1996) Shigeru, Yasuyoshi e Hiroshi (2006) citaram que o estudo da vasculatura tecidual nos tumores é de fundamental importância e relataram que muitos trabalhos têm correlacionado à densidade dos microvasos (DMV) intratumorais, os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a incidência de metástases e/ou sobrevida do paciente em uma grande variedade de cânceres, inclusive o de bexiga. Vale ressaltar que o crescimento e metástase dos tumores sólidos depende da habilidade para iniciar e sustentar o crescimento de novos vasos, isto é, angiogênese (FOLKMAN, 1995).

Neste contexto, a utilização de biomarcadores vasculares torna-se importante para a caracterização das lesões em casos de HEB (CARVALHO et al., 2009). Assim, o CD31, também conhecido como molécula de adesão celular endotelial plaquetária1(PECAM-1), responsável por manter a integridade endotelial através da adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular e auxiliar na passagem das células sanguíneas para a luz dos vasos (BEHAR et al., 1996; BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003; LISTI et al., 2004), pode se expressar na superfície de células

endoteliais, plaquetas e leucócitos (ELRAYESS; TALMUD, 2005), como macrófagos e histiócitos (AKIBA et al., 2011) sendo, portanto, um importante biomarcador.

O CD31 já foi utilizado de forma eficiente em humanos para o diagnóstico de angiossarcomas (POHAR-MARINSEK; LAMOVEC, 2010) e como indicador da presença de metástases em casos de neoplasias mamárias (MARINHO et al., 2008). Em camundongos teve participação efetiva no processo de angiogênese (DELISSER et al., 1997) e no diagnóstico de hemangiossarcoma em macaco aranha de cara vermelha (CASAGRANDE et al., 2009).

Outro biomarcador vascular que pode ser utilizado segundo Carvalho et al. (2008) é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), glicoproteína que aumenta a permeabilidade microvascular, estimula a proliferação e migração de células endoteliais, promove a angiogênese (YLA-HERTTUALA et al., 2007) e participa efetivamente na patogênese de malformações vasculares (PAVLOV et al., 2011).

O VEGF foi utilizado em neoplasias colorretais e demonstrou correlação significativa com os diferentes aspectos clinicopatológicos tumorais, como o tamanho da lesão, presença de invasão vascular, presença de metástases linfonodais, diferenciação tumoral e, em especial, com prognóstico do paciente observado através de taxas de sobrevivência após o tratamento (PINHO, 2005). Por outro lado, o VEGF tem sido utilizado para o tratamento de redução da cistite da radiação em ratos por causar aumento da vascularização (SOLER et al., 2011) enquanto que a sua inibição no tecido leva à redução de metástases de neoplasias colorretais em humanos (DIAZ-RUBIO; SCHMOLL, 2005).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a expressão de VEGF e CD31 na vasculatura vesical de bovinos com hematúria enzoótica no tecido tumoral e extratumoral com o intuito de verificar a sua relação com a progressão tumoral.

#### **5.4 MATERIAL E MÉTODOS**

Para realização do experimento foram selecionadas 26 que apresentaram lesões macroscópicas no matadouro frigorífico de Muniz Freire, ES, oriundas de propriedades localizadas em municípios da microrregião do Caparaó com histórico da presença de *Pteridium aquilinum*. As bexigas foram seccionadas no sentido

caudo-cranial pela face ventral do órgão, para verificação de lesões macroscópicas na mucosa, que incluíram hemorragias focais e difusas e lesões hemangiomatosas e papilomatosas. Juntamente com as bexigas foi coletada, em tubos de 10 mL, a urina desses animais.

As bexigas foram transportadas inteiras, identificadas, acondicionadas separadamente em sacos plásticos transparentes e colocadas junto com a urina devidamente identificada em caixas isotérmicas com gelo para o Setor de Patologia Animal da UFES. No Setor de Patologia Animal, a urina foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos e em seguida classificada quanto à existência de macro ou microhematúria, segundo o método descrito por Falbo et al. (2005). Todas as lesões macroscópicas observadas foram coletadas para a avaliação microscópica.

As amostras coletadas foram fixadas em formol a 10% e posteriormente submetidas ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e microtomia para a secção de cortes histológicos de três micrômetros. Em seguida, os cortes foram depositados em lâminas histológicas e corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE).

A avaliação microscópica dos cortes corados pelo HE foi feita seguindo a descrição de Oliveira (2009) considerando-se a existência de lesões neoplásicas.

Cortes do mesmo material foram submetidos à técnica de imunoistoquímica com os anticorpos primários anti-CD31 (Rabbit Anti-Human CD31 Monoclonal Antibody (Clone SP38) Spring Bioscience®) e anti-VEGF (Rabbit Anti-Human VEGF Monoclonal Antibody (Clone EP1176Y) Biocare Medical®), previamente padronizados em cordão umbilical humano nas diluições de 1:200 e 1:100, respectivamente, no Laboratório de Patologia Animal da UNESP-Botucatu, SP.

Para esta técnica, os cortes histológicos foram depositados sobre lâminas de vidro com extremidade fosca, previamente imersas em cola líquida a base de organossilano (A3648 – SIGMA, St. Louis, E.U.A.). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito utilizando-se solução de água oxigenada a 10 volumes em metanol (1:9). Para a recuperação antigênica do material foi utilizada a solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,04, em Pascal (painel de pressão microprocessada Dako Denmark A/S) 125 °C. Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó Molico® a 3%.

A incubação com os anticorpos primários anti-CD31 e anti-VEGF foi realizada após a diluição (1:200 e 1:100, respectivamente) em solução de albumina sérica

bovina a 0,1% em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Após este procedimento utilizou-se o kit NovoLink™ (Novocastra Laboratories Ltda. RE7140-K). Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3´diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 Dako Cytomation). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, em seguida, as lâminas foram submetidas aos processos de desidratação e montagem em resina sintética.

A avaliação imunoistoquímica foi realizada de acordo com a expressão de cada biomarcador no tecido intra e extratumoral, isto é, presença ou ausência e intensidade da marcação. Para cada anticorpo utilizado, a reação foi estimada por método semi-quantitativo de acordo com sua expressão e um sistema de escores de intensidade foi feito por dois observadores. Em cada região onde a proteína foi observada, um valor para a intensidade de sua expressão foi adotado, a saber: 0= negativo, 1= expressão leve, 2= expressão moderada e 3= expressão acentuada. Após essa análise, foi obtido o valor médio para a intensidade da marcação de cada anticorpo utilizado.

A densidade dos microvasos intra e extratumorais foi realizada por meio da quantificação do número total de vasos marcados pelos biomarcadores CD31 e VEGF, no foco neoplásico e no tecido adjacente em grande aumento (objetiva de 40x).

A análise estatística foi realizada por método descritivo para a classificação histomorfológica das lesões. Para a avaliação da expressão de cada biomarcador no foco neoplásico e no tecido adjacente foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, de acordo com o n amostral. A densidade dos microvasos intra e extratumorais foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste *post hoc* de Dunn. A correlação entre o número de vasos marcados extra e intratumorais para cada biomarcador, assim como a correlação entre os dois biomarcadores nos diferentes tipos de neoplasia foi avaliada pelo teste de Spearman. Para todos os testes estatísticos realizados no trabalho foi utilizado o nível de 5% de significância para comparação dos resultados.

## 5.5 RESULTADOS

Das 26 bexigas avaliadas neste estudo 50% (13/26) apresentaram apenas um tipo neoplásico e 50% (13/26) apresentaram mais de um tipo de neoplasia. As neoplasias encontradas de origem epitelial foram: carcinoma urotelial em 34,61% (9/26), carcinoma *in situ* em 30,77% (8/26); adenocarcinoma em 15,38% (4/26) e as de origem mesenquimal foram: hemangioma em 50% (13/26), mixoma em 42,31% (11/26) e hemangiossarcoma em 7,69% (2/26) das bexigas.

A avaliação microscópica da vasculatura vesical revelou presença de proliferação vascular em 100% (26/26) das bexigas. Em 84,61% (22/26) os vasos proliferados apresentaram alterações, sendo que em 61,54% (16/26) foram observadas mais de uma alteração vascular. As lesões vasculares observadas foram: espessamento da parede dos vasos em 76,92% (20/26), ectasia em 69,23% (18/26) e dilatação em 23,07% (6/26) das bexigas.

A expressão do CD31 nos vasos sanguíneos extra e intratumorais ocorreu em 100% (26/26) das bexigas. Em relação à intensidade da marcação notou-se que em 100% dos vasos extratumorais houve marcação acentuada. Também se verificou marcação acentuada em 100% dos vasos intratumorais nos neoplasmas mixoma, carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, e adenocarcinoma. Entretanto nos hemangiomas houve marcação moderada em 69,23% (9/13) dos casos e leve em 30,77% (4/13). Já nos hemangiossarcomas, a expressão do CD31 foi moderada em 100% (2/2) dos casos.

Em relação à intensidade de marcação, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para CD31 na vasculatura vesical extratumoral. em todos os diferentes tipos de neoplasias. Entretanto, quando avaliada a intensidade de marcação de CD31 intratumoral, observou-se que em neoplasias de origem vascular (hemangioma e hemangiossarcoma) a marcação foi menor do que nos carcinomas uroteliais, carcinomas *in situ*, adenocarcinomas e mixomas, o que revelou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tipos de neoplasia.

A Figura 9 ilustra a marcação do CD31 nos vasos intratumorais de bexiga de bovino com HEB.

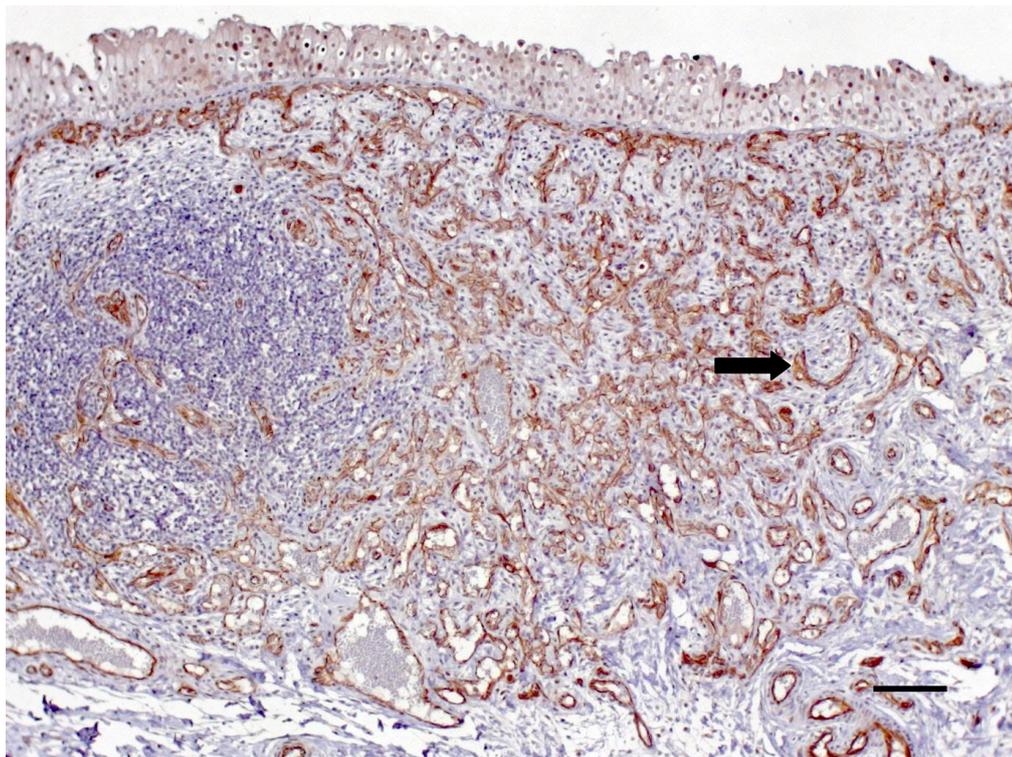


Figura 9 -. Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular maligna (hemangiossarcoma, P 241/10). Expressão moderada de CD31 (1:200) em endotélio de vasos neoplásicos (seta). Objetiva de 10x (barra= 100µm).

A expressão do VEGF nos vasos sanguíneos extratumorais ocorreu em 96,15% (25/26) das bexigas. Nos vasos intratumorais o VEGF foi expresso em 84,62% (22/26) das bexigas e não expresso em 11,53% (3/26).

O grau de intensidade de marcação do VEGF na vasculatura extratumoral foi leve em 23,08% (6/26), moderada em 34,61% (9/26) e acentuada em 38,46% (10/26). Em uma amostra 3,85% não foi possível realizar a avaliação de expressão e de intensidade por ausência de material.

A intensidade da marcação do VEGF nos vasos intratumorais variou entre os diferentes tipos de neoplasias e dentro do mesmo tipo de neoplasia.

Nos carcinomas uroteliais, em 88,88% (8/9) dos casos a marcação foi leve e em 11,12% (1/9) moderada; nos carcinomas *in situ* houve marcação leve em 50% (4/8), moderada em 12,5% (1/8) e negativa em 37,5% (3/8); nos adenocarcinomas a marcação foi leve em 50% (2/4) e moderada em 50% (2/4); nos hemangiomas houve marcação leve em 61,54% (8/13), moderada em 23,08% (3/13), acentuada em 7,69% (1/13) e não avaliada em 7,69% (1/13); nos mixomas a marcação foi leve em 27,27% (3/11), moderada em 9,09% (1/11), acentuada em 9,09% (1/11) e negativa

em 54,55% (6/11); nos hemangiossarcomas houve marcação leve em 50% (1/2) e moderada em 50% (1/2) dos casos. Estes dados estão dispostos na Tabela 2.

A intensidade de marcação do VEGF na vasculatura vesical extra e intratumoral não mostrou diferença ( $p>0,05$ ) entre os diferentes tipos de neoplasias.

A Figura 10 ilustra a marcação do VEGF nos vasos intra e extratumorais de bexigas de bovinos com HEB.

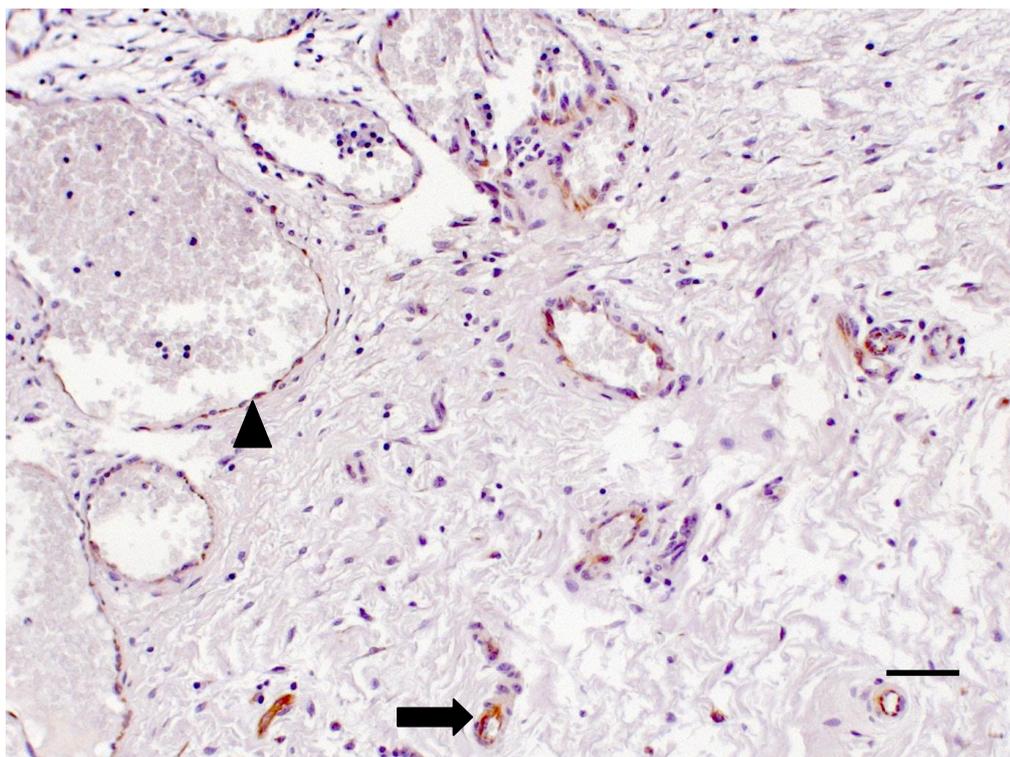


Figura 10 - Fotomicrografia de bexiga bovina com hematúria enzoótica apresentando neoplasia vascular benigna (hemangioma, P244/10). Expressão leve de VEGF (1:100) em endotélio de vasos neoplásicos (cabeça de seta) e acentuada (seta) em endotélio de vasos não neoplásicos. Objetiva de 20x (barra= 50 $\mu$ m).

Tabela 2. Intensidade da marcação do VEGF nos vasos intratumorais dos diferentes tipos de neoplasias encontradas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica (HEB).

Bladder	Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma urotelial	Adenocarcinoma	Hemangioma	Hemangiossarcoma	Mixoma
P 212/10	Negativa	Leve		Leve		
P 216/10						Leve
P 217/10		Leve		Leve		Negativa
P219/10						Leve
P 226/10		Leve				
P 227/10				Acentuada		
P 229/10	Moderada	Leve	Leve	Leve		
P 230/10		Leve				
P 232/10						Negativa
P 233/10				Leve		Negativa
P 237/10				Moderada		
P 241/10			Moderada		Moderada	
P 244/10	Leve			Leve		Negativa
P 245/10						Moderada
P 247/10				*		
P 249/10	Leve	Leve				
P 250/10				Leve		
P 445/10		Leve		Leve		
P 446/10				Moderada		
P 447/10	Leve		Moderada	Moderada		Acentuada
P 448/10						Negativa
P 449/10		Leve				Leve
P 452/10	Leve				Leve	
P 453/10	Negativa		Leve			Negativa
P 455/10	Negativa					
P 456/10		Moderada		Leve		

\*= avaliação não realizada por ausência de material.

A avaliação da densidade dos microvasos extratumorais revelou que o número de vasos marcados pelo CD31 nos carcinomas uroteliais variou de 17 a 57 ( $\bar{x} = 27,57$ ), nos carcinomas *in situ* de 10 a 55 ( $\bar{x} = 29,25$ ), nos adenocarcinomas de 10 a 49 ( $\bar{x} = 30,15$ ), nos hemangiomas de 17 a 110 ( $\bar{x} = 32,69$ ), nos mixomas de 8 a 66 ( $\bar{x} = 21,45$ ) e nos hemangiossarcomas de 9 a 48 ( $\bar{x} = 34,25$ ).

Na avaliação dos vasos intratumorais observou-se que o CD31 marcou de 7 a 222 ( $\bar{x} = 53,15$ ) microvasos nos carcinomas uroteliais, 2 a 29 ( $\bar{x} = 9,58$ ) nos carcinomas *in situ*, 4 a 81 ( $\bar{x} = 25,92$ ) nos adenocarcinomas, 20 a 294 ( $\bar{x} = 91,92$ ) nos hemangiomas, 2 a 45 ( $\bar{x} = 17,73$ ) nos mixomas e 88 a 333 ( $\bar{x} = 238,5$ ) nos hemangiossarcomas.

O número de vasos sanguíneos extratumorais marcados pelo VEGF nos carcinomas uroteliais variou de 2 a 31 ( $\bar{x} = 14,84$ ), nos carcinomas *in situ* de 5 a 36 ( $\bar{x} = 16,38$ ), nos adenocarcinomas de 8 a 41 ( $\bar{x} = 21,92$ ), nos hemangiomas de 2 a 34 ( $\bar{x} = 13,87$ ), nos mixomas de 3 a 34 ( $\bar{x} = 11,1$ ) e nos hemangiossarcomas de 19 a 28 ( $\bar{x} = 22,25$ ).

Na avaliação dos vasos intratumorais marcados pelo VEGF observou-se que nos carcinomas uroteliais a quantidade de microvasos variou de 4 a 41 ( $\bar{x} = 11,16$ ), nos carcinomas *in situ* de 0 a 13 ( $\bar{x} = 2$ ), nos adenocarcinomas de 0 a 33 ( $\bar{x} = 6,07$ ), nos hemangiomas de 5 a 64 ( $\bar{x} = 23,29$ ), nos mixomas de 0 a 18 ( $\bar{x} = 2,2$ ) e nos hemangiossarcomas de 24 a 65 ( $\bar{x} = 38$ ).

A análise estatística revelou que a marcação do CD31 nos vasos extratumorais não diferiu entre os diferentes tipos de neoplasia ( $p > 0,05$ ). No entanto, nos vasos intratumorais, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os hemangiomas e hemangiossarcomas em relação aos carcinomas *in situ*, adenocarcinomas e mixomas. Também houve diferença entre o número de microvasos observados nos carcinomas uroteliais e carcinomas *in situ*, entretanto, não se verificou diferença entre os carcinomas uroteliais e os adenocarcinomas, mixomas, hemangiomas e hemangiossarcomas.

Na avaliação do VEGF a análise estatística revelou que, nos vasos extratumorais, houve diferença significativa entre os mixomas e adenocarcinomas ( $p < 0,05$ ). Nos vasos intratumorais verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos hemangiomas em relação aos carcinomas *in situ*, adenocarcinomas e mixomas. Também foi verificada diferença entre hemangiossarcomas em relação aos mixomas e carcinomas *in situ*. Por outro lado, os carcinomas uroteliais revelaram diferença no

número de vasos quando comparados com os carcinomas *in situ* e os mixomas. Os dados referentes às análises estatísticas estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios do número de vasos sanguíneos extra e intratumorais marcados pelo CD31 e VEGF nos diferentes tipos de neoplasias encontradas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica (HEB).

Neoplasia	CD31	CD31	VEGF	VEGF
	extratumoral	intratumoral	extratumoral	intratumoral
Carcinoma urotelial	27,57 <sup>A</sup>	53,15 <sup>AB</sup>	14,84 <sup>AB</sup>	11,16 <sup>AC</sup>
Carcinoma <i>in situ</i>	29,25 <sup>A</sup>	9,58 <sup>C</sup>	16,38 <sup>AB</sup>	2 <sup>B</sup>
Adenocarcinoma	30,15 <sup>A</sup>	25,92 <sup>BC</sup>	21,92 <sup>B</sup>	6,07 <sup>BC</sup>
Hemangioma	32,69 <sup>A</sup>	91,92 <sup>A</sup>	13,87 <sup>AB</sup>	23,29 <sup>A</sup>
Mixoma	21,45 <sup>A</sup>	17,74 <sup>BC</sup>	11,1 <sup>A</sup>	2,2 <sup>B</sup>
Hemangiossarcoma	34,25 <sup>A</sup>	238,5 <sup>A</sup>	22,25 <sup>AB</sup>	38 <sup>AC</sup>

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar a correlação entre o número de vasos extra e intratumorais marcados pelo CD31 nas diferentes neoplasias observou-se que esta foi positiva nos hemangiomas ( $r_s = 0,49$ ,  $p = 0,05$ ), nos hemangiossarcomas ( $r_s = 1,0$ ,  $p = 0,05$ ) e nos mixomas de ( $r_s = 0,50$ ,  $p = 0,05$ ). Estes resultados indicam que nestas neoplasias quanto maior o número de vasos intratumorais marcados pelo CD31 maior é o número de vasos extratumorais marcados. Para os carcinomas uroteliais, carcinomas *in situ* e adenocarcinomas não houve correlação.

A correlação entre o número de vasos extra e intratumorais marcados pelo VEGF nas diferentes neoplasias demonstrou que houve correlação positiva nos hemangiomas ( $r_s = 0,43$ ,  $p = 0,05$ ), nos mixomas ( $r_s = 0,47$ ,  $p = 0,05$ ) e nos adenocarcinomas ( $r_s = 0,62$ ,  $p = 0,05$ ). Estes resultados indicam que nestas neoplasias quanto maior o número de vasos intratumorais marcados pelo VEGF maior é o número de vasos extratumorais marcados. Nos hemangiossarcomas, carcinomas uroteliais e carcinomas *in situ* não houve correlação.

A correlação entre a expressão dos biomarcadores CD31 e VEGF nos vasos extratumorais nos diferentes tipos de neoplasias foi negativa apenas nos hemangiossarcomas ( $r_s = -1,0$ ,  $p = 0,05$ ), ou seja, quando foi observada marcação do

VEGF nos vasos extratumorais nos hemangiossarcomas não se observou marcação destes vasos pelo CD31.

## 5.6 DISCUSSÃO

O exame histopatológico de lesões na bexiga de bovinos com HEB neste estudo mostrou que em um mesmo animal é possível verificar a presença de diversos tipos de tumores, conforme já citado por Tokarnia, Döbereiner e Peixoto (2000). Esta histogênese variada também foi observada por Peixoto et al. (2003) e Gabriel et al. (2009).

Os tipos de tumores carcinoma urotelial, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, hemangioma, mixoma e hemangiossarcoma encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Carvalho, Pinto e Peleteiro (2006). Estes autores ao avaliarem histologicamente tumores na bexiga de animais com HEB encontraram como principais tumores malignos e benignos de origem epitelial e mesenquimal, carcinoma de células de transição (41,4%), hemangioma (29,5%), papiloma (9,6%) e hemangiossarcoma (4,9%). Hemangiomas e hemangiossarcomas também foram encontrados nos estudos realizados por Souto et al. (2006) e Gabriel et al. (2009).

Oliveira (2009) verificou proliferações vasculares no estroma de pólipos e justapostas à lâmina basal do epitélio displásico. No presente trabalho, dados semelhantes foram encontrados, uma vez que, as proliferações vasculares estavam presentes em todas as amostras e revelaram predomínio de espessamento e ectasia dos vasos no tecido adjacente às neoplasias.

O CD31 é responsável por manter a integridade endotelial (BEHAR et al., 1996; BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003; LISTI et al., 2004) que ocorre principalmente devido à sua ligação com proteoglicanos e glicosaminoglicanos do tecido conjuntivo adjacente (DELISSER et al., 1993). A utilização deste biomarcador foi preconizada por Albelda et al. (1991) que verificaram marcação na superfície de células endoteliais.

Desta forma, ao utilizar o CD31 neste experimento, observou-se que houve intensa marcação nos vasos extratumorais, embora, sem apresentar diferença significativa, independente do tipo tumoral observado. Enquanto que, nos vasos intratumorais houve diferença significativa entre os tipos de neoplasia. Nos vasos

intratumorais dos hemangiomas e hemangiossarcomas, que são neoplasias de origem mesenquimal vascular que possuem células endoteliais modificadas, esta marcação foi de moderada a leve. Acredita-se que a diminuição na intensidade de marcação do CD31 nestas neoplasias esteja associada à redução da integridade das células endoteliais e perda de coesão celular. Estes elementos, isolados ou em conjunto, poderiam contribuir para o extravasamento de hemácias e a ocorrência de hematúria.

As hemorragias encontradas em bexigas de animais com HEB podem estar associadas à existência de proliferações vasculares, neoplasias vasculares ou neoplasias uroteliais, no entanto, na maioria dos casos, não há associação com lesão específica (OLIVEIRA, 2009). Por isto, mesmo com o fato de ter sido encontrada uma aparente integridade da parede vascular, demonstrada pela intensa marcação do CD31 na vasculatura extratumoral, é possível ainda que se observe hemorragia nestes vasos.

Ramos-Vara (2005) indicou maior especificidade do CD31 para os tumores vasculares e de origem mesenquimal. Isto foi comprovado por Casagrande et al. (2009) em hemangiossarcoma primário intrauterino em um macaco aranha de cara vermelha e por Akiba et al. (2011) em sarcoma histiocítico humano. Carvalho et al. (2009) encontraram positividade para este marcador em 100% das lesões no tecido endotelial das bexigas de bovinos com HEB e observaram que o CD31 é mais específico para avaliação vascular do que o fator VIII.

A expressão de CD31 não ocorreu nas células neoplásicas epiteliais, semelhante aos achados de Giatromanolaki et al. (1997) em carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas pulmonares, de Yilmazer, Han e Onal (2007) em carcinoma renal de humanos e de Cristina et al. (2010) em adenomas de hipófise, pelo fato de ser um marcador específico de células endoteliais, entretanto ocorreu a marcação dos vasos intratumorais em todas estas neoplasias.

Neste estudo, a expressão do VEGF nos vasos sanguíneos extratumorais ocorreu na maioria das amostras. Pavlov et al. (2011), ao realizarem estudo de malformações vasculares em humanos, observaram que tanto malformações arteriovenosas quanto venosas apresentaram aumento na expressão de VEGF quando comparadas com vasos intactos do tecido adjacente. Estes dados sugerem que os vasos extratumorais avaliados no presente trabalho possivelmente

apresentavam algum tipo de malformação demonstrada pela acentuada marcação do VEGF.

Haixia et al. (2011) ao compararem, a expressão de VEGF em linhagens de células de humanos, ratos e camundongos, normais e neoplásicas, de diferentes tumores, constataram que a maioria das linhagens tanto neoplásicas quanto normais expressaram VEGF. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, em que ocorreu expressão de VEGF nos vasos extra e intratumorais.

Segundo Yla-Herttuala et al. (2007) o VEGF proporciona um aumento na permeabilidade microvascular, estimula a proliferação e migração de células endoteliais e promove a angiogênese. Vale ressaltar que a angiogênese representa um processo fundamental para o desenvolvimento tumoral, uma vez que fornece o aporte nutricional para as células neoplásicas proliferantes e estabelece condições favoráveis para a disseminação metastática (PINHO, 2005). Entretanto, neste estudo, a maioria dos tumores revelou intensidade de marcação do VEGF leve o que pode estar associado ao baixo grau de ocorrência de metástases observadas nas neoplasias de bexiga de animais com HEB, conforme já citado por Peixoto et al. (2003).

Cavazzola (2003) ao estudar a expressão do VEGF em adenocarcinomas de esôfago em humanos observou marcação em 47,2% dos indivíduos avaliados, no entanto, não houve associação entre a expressão e a sobrevida em longo prazo destes pacientes. Por outro lado, Yilmazer, Han e Onal (2007) concluíram que o VEGF pode orientar no prognóstico e no tempo de sobrevida de pacientes humanos com carcinoma renal.

A avaliação da densidade dos microvasos (DMV) intratumorais tem sido estudada em uma grande variedade de cânceres, inclusive o de bexiga (WEIDNERE; FOLKMAN, 1996; SHIGERU; YASUYOSHI; HIROSHI, 2006). Neste estudo, a densidade dos microvasos foi avaliada extra e intratumoral e revelou que na metade dos casos o CD31 marcou maior número de vasos dentro do foco neoplásico do que no tecido adjacente. Isto pode ter ocorrido uma vez que os processos neoplásicos necessitam da formação de novos vasos, ou seja, da angiogênese, conforme já citado por Folkman (1995) ao afirmar que o crescimento e metástase dos tumores sólidos dependem da habilidade para iniciar e sustentar o desenvolvimento de novos vasos.

DeLisser et al. (1997) ao realizarem estudo de angiogênese em camundongos comprovaram que o CD31 exerce papel fundamental na formação de novos vasos por proporcionar adesão celular. Isto pode explicar a evidente marcação do CD31 nas neoplasias vasculares, hemangiomas e hemangiossarcomas, bem como nos carcinomas uroteliais, observadas neste estudo. Acredita-se que a explicação para maior angiogênese nas neoplasias vasculares esteja relacionada à sua origem embriológica e, portanto, na grande quantidade de vasos existentes. Já nos carcinomas uroteliais, acredita-se que exista maior angiogênese devido ao seu crescimento ser de aspecto expansivo e geralmente invadirem a lâmina própria.

Por outro lado, nos carcinomas *in situ*, mixomas e adenocarcinomas a densidade dos microvasos intratumorais marcados pelo CD31 foi diferente dos outros tipos neoplásicos. Nos casos dos mixomas, é possível que haja menor número de vasos intratumorais devido ao aspecto morfológico da neoplasia, caracterizada por pequena quantidade de fibroblastos e grande quantidade de material mucoide. Nos carcinomas *in situ* e adenocarcinomas acredita-se que, por serem neoplasias epiteliais, restritas ao urotélio, que não possui vasos sanguíneos, apresentem menor quantidade de vasos intratumorais.

A marcação pelo VEGF nos vasos extratumorais dos diferentes tipos neoplásicos revelou diferença entre os adenocarcinomas e mixomas. A explicação para este fato pode estar na característica morfológica de cada neoplasia. Os adenocarcinomas são neoplasias que acometem basicamente o urotélio e raramente invadem a lâmina própria. Com a preservação da lâmina própria, acredita-se que os vasos sanguíneos mantenham o seu crescimento normal, e, desta forma podem ser encontrados vasos maduros e imaturos. Enquanto que os mixomas são neoplasias que geralmente acometem a lâmina própria e diminuem a quantidade de tecido adjacente normal.

Neste estudo, a quantidade de vasos intratumorais marcados pelo VEGF variou entre os diferentes tipos tumorais. Estes resultados devem-se, provavelmente, ao fato dos hemangiomas e hemangiossarcomas serem neoplasias vasculares e apresentarem grande quantidade de vasos em crescimento, enquanto que nos carcinomas uroteliais é possível que o desenvolvimento expansivo tumoral seja responsável pelo surgimento de um maior número de vasos. Estes dados concordam com os resultados de Carvalho et al. (2008) que encontraram receptores de VEGF em hemangiomas, hemangiossarcomas e carcinomas uroteliais

encontrados em bexigas de bovinos. No entanto, estes mesmos autores relataram que em neoplasias vasculares a densidade de microvasos que expressam o VEGF é maior que em neoplasias epiteliais.

Fukumura et al. (1998) citaram que embora a principal fonte de VEGF sejam as células tumorais, este marcador também pode ser encontrado no estroma tumoral.

Portanto, a presença de grande quantidade de vasos extra e intratumorais marcados pelo VEGF em bexigas de animais com HEB indicam um possível caminho para o tratamento desta doença. Em humanos isto vêm sendo estudado, uma vez que anticorpos monoclonais anti-VEGF têm ação específica sobre a angiogênese tumoral e têm sido utilizados com sucesso na quimioterapia de neoplasias colorretais metastáticas (DIAZ-RUBIO; SCHMOLL, 2005; FU et al., 2012), por proporcionar aumento da sobrevida e do intervalo livre de doença (DIAZ-RUBIO; SCHMOLL, 2005) e no tratamento de carcinoma pulmonar, glioblastoma recorrente, carcinoma de células renais metastático e neoplasias prostáticas (FU et al., 2012).

O VEGF também foi usado, através de injeções, como tratamento vascular para a cistite da radiação em ratos submetidos à radioterapia pélvica. Sua utilização reduziu a deposição de colágeno e induziu a neovascularização na bexiga, prevenindo o aparecimento de fibrose (SOLER et al., 2011).

Em relação à quantidade de vasos marcados, considerando-se o biomarcador utilizado, observou-se neste estudo que o número de vasos sanguíneos extra e intratumorais foi diferente e este fato deve-se a proteína que cada um destes biomarcadores se liga. O CD31 se liga à proteína de adesividade celular endotelial plaquetária 1, enquanto o VEGF se liga ao fator de crescimento vascular endotelial. A PECAM-1 é essencial para a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos e, portanto, deve estar presente em todos os vasos sanguíneos. O VEGF, por estar associado ao crescimento vascular é encontrado principalmente em vasos imaturos e, geralmente, ausente em vasos maduros que já cessaram seu crescimento. Desta forma, o número de vasos sanguíneos extra e intratumorais marcados pelo VEGF foi menor quando comparado com o CD31 e indica a presença de um número maior de vasos sanguíneos maduros.

Neste estudo observou-se ainda que a marcação do CD31 em todas as neoplasias mesenquimais mostrou que quanto maior o número de vasos

intratumorais maior é a quantidade destes extratumorais. Enquanto que para o VEGF, isto foi observado nos hemangiomas, mixomas e adenocarcinomas. Vale ressaltar que o VEGF é capaz de estimular o crescimento tumoral de forma parácrina e autócrina (DIAS et al., 2000; BACHELDER et al., 2001; SOKER et al., 2001) e, portanto, a estimulação parácrina pode ocorrer no tecido neoplásico bem como no tecido adjacente à neoplasia (intra e extratumoral). Desta forma, nos tumores que menos expressaram VEGF nos vasos intratumorais também houve menor expressão nos vasos extratumorais.

Por outro lado, a marcação do VEGF nos hemangiossarcomas revelou que quanto maior o número de vasos intratumorais menor é o extratumoral. Este fato pode ser devido à intensa proliferação vascular observada nestas neoplasias.

Este estudo revelou ainda que quando houve aumento da expressão de CD31 houve redução de VEGF nos vasos extratumorais, nos hemangiossarcomas. Vale lembrar que o VEGF participa na regulação da permeabilidade vascular e em alguns leitos vasculares pode levar ao surgimento de fenestrações (ROBERTS; PALADE, 1995) o que explicaria a correlação negativa entre estes biomarcadores.

Cristina et al. (2010) encontraram resultados diferentes ao constatarem a expressão significativa de CD31 e VEGF nos vasos intratumorais em neoplasias epiteliais, assim como uma correlação positiva entre CD31 e VEGF, o que sugere participação de angiogênese em neoplasias epiteliais. Marinho et al. (2008) também obtiveram associação positiva entre a marcação do CD31 em vasos sanguíneos e a presença de metástase de carcinoma mamário em linfonodos axilares. Entretanto Souza, Freitas e Miranda (2007) encontraram baixa positividade de CD31 na avaliação da angiogênese em carcinomas de células escamosas de língua e lábio inferior de humanos e não indicaram este marcador como fator prognóstico para estes tumores.

## **5.7 CONCLUSÕES**

Este estudo revelou que em bexigas de animais acometidos por HEB há expressão dos biomarcadores CD31 e VEGF nos vasos sanguíneos extra e intratumorais. Há variação na intensidade de marcação destes biomarcadores nos diferentes tipos tumorais e no tecido adjacente à neoplasia o que revela que quanto

maior a expressão de CD31 com intensidade leve associada à maior expressão de VEGF o prognóstico pode ser desfavorável.

Além disto, nota-se que o estudo da vasculatura vesical extratumoral pode ser de grande importância para esclarecer a patogênese da HEB em processos não neoplásicos.

Assim, a utilização destes biomarcadores torna-se uma ferramenta relevante para a avaliação da integridade dos vasos e do crescimento vascular em bexigas de bovinos com HEB.

## 5.8 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

## 5.9 REFERÊNCIAS

AKIBA, J.; HARADA, H.; KAWAHARA, A.; ARAKAWA, F.; MIHASHI, H.; MIHASHI, R.; OHSHIMA, K.; YANO, H. Histiocytic sarcoma of the parotid gland region. **Pathology International**, Tokyo, v.61, p.373-376, 2011.

ALBELDA, S. M.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; NEWMANLL, P. J. Molecular and cellular properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.114, p.1059-1068, 1991.

BACHELDER, R. E.; CRAGO, A.; CHUNG, J.; WENDT, M. A.; SHAW, L. M.; ROBINSON, G.; MERCURIO, A. M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v.61, p.5736–5740, 2001.

BEHAR, E.; CHAO, N. J.; HIRAKI, D. D.; KRISHNASWAMY, S.; BROWN, B. W.; ZEHNDER, J. L.; GRUMET, F. C. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.334, n.5, p.286-291, 1996.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.170, n.2, p.191-203, 2003.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F.; BARRON, R.; NEIL, B. W. O'; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, Philadelphia, v.52, p.6898–6904, 1992.

CARVALHO, T.; ELIAS, A. P.; NUNES, T.; PELETEIRO, M. C.; DIAS, S. Chemo-angiogenic profile of bovine urinary bladder tumors distinguishes urothelial carcinomas from hemangiossarcomas. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.121, n.344–358, 2008.

CARVALHO, T.; NAYDAN, D.; NUNES, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. **Veterinary Pathology**, Madison, v.46, p.211–221, 2009.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v.134, p.336-346, 2006.

CASAGRANDE, R. A.; TORRES, L. N.; GOMES, M. S.; QUAGGLIA NETO, F.; KANAMURA, C.; KISHIMOTO, L.; MATUSHIMA, E. R. Hemangiossarcoma primário intrauterino em um macaco aranha de cara vermelha (*Atelespaniscus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.37, n.1, p.59-63, 2009.

CAVAZZOLA, L. T. **Avaliação da expressão da proteína p53 e do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) em pacientes com adenocarcinoma do esôfago**. 2003. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

CRISTINA, C.; PEREZ-MILLAN, M. I.; LUQUE, G.; DULCE, R. A.; SEVLEVER, G.; BERNER, S. I.; VILLALOBOS, D. B. VEGF and CD31 Association in pituitary adenomas. **Endocrine Pathology**, Toronto, v.21, p.154–160, 2010.

DELISSER, H. M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; ROBINSON, C. S.; WEXLER, R. S.; KERR, J. S.; GARLANDA, C.; MERWIN, J. R.; MADRI, J. A.; ALBELDA, S. M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.151, n.3, p.671-677, 1997.

DELISSER, H. M.; YAN, H. C.; NEWMAN, P. J.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; ALBELDA, S. M. Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.268, n.21, p.16037-16046, 1993.

DIAS, S.; HATTORI, K.; ZHU, Z.; HEISSIG, B.; CHOY, M.; LANE, W.; WU, Y.; CHADBURN, A.; HYJEK, E.; GILL, M.; HICKLIN, D. J.; WITTE, L.; MOORE, M. A. S.; RAFII, S. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.106, p.511–521, 2000.

DIAZ-RUBIO, E.; SCHMOLL, H. J. The future development of bevacizumab in colorectal cancer. **Oncology**, Philadelphia, v.69, n.3, p.34-45, 2005.

ELRAYESS, M. A.; TALMUD, P. J. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) e coronary heart disease. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.121, p.77-79, 2005.

FALBO, M. K.; REIS, A. C. F.; BALARIN, M. R. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ARAÚJO JR, J. P.; OKANO, W.; SANDINI, I. E. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.16, n.4, p.547-558, 2005.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, New York, v.1, p. 27–30. 1995.

FU, W.; MADAN, E.; YEE, M.; ZHANG, H. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1825, p.140–152, 2012.

FUKUMURA, D.; XAVIER, R.; SUGIURA, T.; CHEN, Y.; PARK, E. C.; LU, N.; SELIG, M.; NIELSEN, G.; TAKSIR, T.; JAIN, R. K.; SEED, B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. **Cell**, Massachusetts, n.94, p.715-725, 1998.

GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, R. A.; PIAZER, J. V. M.; BARROS, C. S. L.; MARTINS, T. B.; ROSA, F. B. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.29, n.7, p.515-525, 2009.

GIATROMANOLAKI, A.; KOUKOURAKIS, M. I.; THEODOSSIOU, D.; BARBATIS, K.; O'BYRNE, K.; HARRIS, A. L.; GATTER, K. C. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.3, p.2485-2492, 1997.

HAIXIA, D.; JINGSONG, Z.; LEI, J.; HAIRONG, D.; JUN, W.; HANG, X.; WEIXIAN, C. Gene expression of neuropilin-1 and its receptors, VEGF/Semaphorin 3a, in normal and cancer cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, New Jersey, v.59, p.39–47, 2011.

LISTI, F.; CANDORE, G.; LIO, D.; CAVALLONE, L.; COLONNA-ROMANO, G.; CARUSO, M.; HOFFMANN, E.; CARUSO, C. Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients Sicily. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.31, p.175-178, 2004.

MARINHO, V. F. Z.; METZE, K.; SANCHES, F. S. F.; ROCHA, G. F. S.; GOBBI, H. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.54, n.3, p.203-207, 2008.

OLIVEIRA, L. G. P. **Novos aspectos patológicos e patogênicos da hematúria enzoótica bovina**. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Clínicas e Patológicas) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PAVLOV, K. A.; GERSHTEIN, E. S.; DUBOVA, E. A.; SHCHEGOLEV, A. I. Vascular endothelial growth factor and type 2 receptor for this factor in vascular malformations. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, London, v.150, n.4, p.481-484, 2011.

PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, p.65-81, 2003.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v.25, n.4, p.396-402, 2005.

POHAR-MARINSEK, Z.; LAMOVEC, J. Angiosarcoma in FNA smears: diagnostic accuracy, morphology, immunocytochemistry and differential diagnoses. **Cytopathology**, Oxford, v.21, p.311–319, 2010.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary medicine. **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. London: Saunders, 2007. 2065p.

RAMOS-VARA, J. A. Imunoistoquímica, não tenha medo do marrom, vermelho e azul. In: I Simpósio Brasileiro da Fundação C. L. Davis, 7, 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2005.

ROBERTS, W. G.; PALADE, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.108, p.2369–2379, 1995.

SHIGERU, K.; YASUYOSHI, M.; HIROSHI, K. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: urinary cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, Kyoto, v.11, p.90–107, 2006.

SOKER, S.; KAEFER, M.; JOHNSON, M.; KLAGSBRUN, M.; ATALA, A.; FREEMAN, M. R. Vascular endothelial growth factor-mediated autocrine stimulation of prostate tumor cells coincides with progression to a malignant phenotype. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.159, p.651–659, 2001.

SOLER, R.; VIANELLO, A.; FULLHASE, C.; WANG, Z.; ATALA, A.; SOKER, S.; YOO, J. J.; WILLIAMS, J. K. Vascular therapy for radiation cystitis. **Neurourology and Urodynamics**, Malden, v.30, p.428–434, 2011.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; RECH, R. R.; PIAZER, J. V. M. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1647-1650, 2006.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v.10, n.1, p.12-18, 2007.

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

WEIDNER, N.; FOLKMAN, J. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. (Eds). **Important Advances in Oncology**, Baltimore: Lippincott, 1996. p.167–190.

YILMAZER, D.; HAN, U.; ONAL, B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. **International Urology and Nephrology**, New Jersey, v.39, p.691-698, 2007.

YLA-HERTTUALA, S.; RISSANEN, T. T.; VAJANTO, I.; HARTIKAINEN, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. **Journal of the American College of Cardiology**, San Diego, v.49, p.1015–1026, 2007.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hematúria enzoótica bovina permanece como doença endêmica e de alta prevalência na microrregião do Caparaó, sul do Espírito Santo. As medidas de controle e erradicação desta enfermidade dependem de diagnósticos mais específicos bem como de melhor entendimento sobre a sua etiopatogenia.

A realização deste estudo permitiu verificar que além da microrregião do Caparaó, outros municípios do estado do Espírito Santo e também de Minas Gerais apresentam casos da doença o que deve ser melhor investigado.

Neste estudo observou-se que existem lesões não neoplásicas e neoplásicas de forma concomitante nas bexigas dos animais com HEB e que estas alterações são responsáveis pelos quadros hemorrágicos que levam os animais à anemia e morte.

A caracterização dos processos patológicos que acometem a bexiga dos animais permitiu definir as alterações que ocorrem com maior frequência e pode-se associá-las aos fatores etiológicos da doença.

A histogênese tumoral foi definida com o auxílio da imunoistoquímica e revelou que os biomarcadores anti-citoqueratina, anti-vimentina, anti-CD31 foram importantes para o diagnóstico das neoplasias. A uroplaquina demonstrou ser um marcador efetivo não somente para o diagnóstico tumoral, mas também para a avaliação da integridade urotelial. O uso dos marcadores vasculares também foi de grande importância principalmente no que diz respeito à avaliação da integridade vascular e ao prognóstico. Além disto, observou-se que o estudo da vasculatura vesical extratumoral pode ser de grande importância para esclarecer a patogênese da HEB em processos não neoplásicos.

Diante do exposto, nota-se que a HEB é uma doença de grande importância para o estado do Espírito Santo e a realização de estudos investigativos principalmente que visem melhorar o entendimento sobre os mecanismos de formação das lesões vesicais, bem como, estabelecer medidas viáveis para o controle desta doença devem ser continuados.

## 7 REFERÊNCIAS GERAIS

AKIBA, J.; HARADA, H.; KAWAHARA, A.; ARAKAWA, F.; MIHASHI, H.; MIHASHI, R.; OHSHIMA, K.; YANO, H. Histiocytic sarcoma of the parotid gland region. **Pathology International**, Tokyo, v.61, p.373-376, 2011.

ALBELDA, S. M.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; NEWMANLL, P. J. Molecular and cellular properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.114, p.1059-1068, 1991.

ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; DE JONGH, F. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. **Dairy Science & Technology**, Les Ulis, v.73, p.323-332, 1993.

ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de La Facultad de Agronomia LUZ**, Maracaibo, v.16, p.528-547, 1999.

ALVES, V. A. F. Aplicações diagnósticas em neoplasias malignas indiferenciadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 20., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1995, p.10-13.

BALCOS, L. G. F.; BORZACCHIELO, G.; RUSSO, V.; POPESCU, O.; ROPERTO, S.; ROPERTO, F. Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladder tumours in cattle from Romania. **Research in Veterinary Science**, London, v.85, p.145–148, 2008.

BACHELDER, R. E.; CRAGO, A.; CHUNG, J.; WENDT, M. A.; SHAW, L. M.; ROBINSON, G.; MERCURIO, A. M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v.61, p.5736–5740, 2001.

BEHAR, E.; CHAO, N. J.; HIRAKI, D. D.; KRISHNASWAMY, S.; BROWN, B. W.; ZEHNDER, J. L.; GRUMET, F. C. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.334, n.5, p.286-291, 1996.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.170, n.2, p.191-203, 2003.

BORZACCHIELLO, G.; AMBROSIO, V.; LEONARDI, L.; FRUCI, R.; GALATI, P.; ROPERTO, F. Rare tumors in domestic animals: a lipid cell variant of urothelial carcinoma of the urinary bladder in a cow and a case of vesical carcinosarcoma in a dog. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.2, p.273-274, 2004.

CÂMARA, A. C. L.; BORGES, J. R. J.; LEITE, C. R.; MOTA, A. L. A. A.; GODOY, R. F.; GUEDES, K. M. R.; MUSTAFÁ, V. S.; PALUDO, G. R. Achados clínicos, laboratoriais, ultrassonográficos e anátomo-patológicos em um caso de hematúria enzoótica bovina, **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, Suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, p.186 – 190, 2009.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F.; BARRON, R.; NEIL, B. W. O'; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, Philadelphia, v.52, p.6898–6904, 1992.

CARVALHO, T.; ELIAS, A. P.; NUNES, T.; PELETEIRO, M. C.; DIAS, S. Chemo-angiogenic profile of bovine urinary bladder tumors distinguishes urothelial carcinomas from hemangiosarcomas. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.121, n.344–358, 2008.

CARVALHO, T.; NAYDAN, D.; NUNES, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. **Veterinary Pathology**, Madison, v.46, p.211–221, 2009.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v.134, p.336-346, 2006.

CASAGRANDE, R. A.; TORRES, L. N.; GOMES, M. S.; QUAGGLIA NETO, F.; KANAMURA, C.; KISHIMOTO, L.; MATUSHIMA, E. R. Hemangiossarcoma primário intrauterino em um macaco aranha de cara vermelha (*Ateles paniscus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.37, n.1, p. 59-63, 2009.

CAVAZZOLA, L. T. **Avaliação da expressão da proteína p53 e do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) em pacientes com adenocarcinoma do esôfago**. 2003. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

COTA, J. B. B. **Identificação de proteínas estruturais em tumores de bexiga de bovinos**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2011.

CRISTINA, C.; PEREZ-MILLAN, M. I.; LUQUE, G.; DULCE, R. A.; SEVLEVER, G.; BERNER, S. I.; VILLALOBOS, D. B. VEGF and CD31 Association in pituitary adenomas. **Endocrine Pathology**, Toronto, v.21, p.154–160, 2010.

DELISSER, H. M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; ROBINSON, C. S.; WEXLER, R. S.; KERR, J. S.; GARLANDA, C.; MERWIN, J. R.; MADRI, J. A.; ALBELDA, S. M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.151, n.3, p.671-677, 1997.

DELISSER, H. M.; YAN, H. C.; NEWMAN, P. J.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; ALBELDA, S. M. Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.268, n.21, p.16037-16046, 1993.

DIAS, S.; HATTORI, K.; ZHU, Z.; HEISSIG, B.; CHOY, M.; LANE, W.; WU, Y.; CHADBURN, A.; HYJEK, E.; GILL, M.; HICKLIN, D. J.; WITTE, L.; MOORE, M. A. S.; RAFII, S. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.106, p.511–521, 2000.

DIAZ-RUBIO, E.; SCHMOLL, H. J. The future development of bevacizumab in colorectal cancer. **Oncology**, Philadelphia, v.69, n.3, p.34-45, 2005.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 813p.

ELRAYESS, M. A.; TALMUD, P. J. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) e coronary heart disease. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.121, p.77-79, 2005.

FALBO, M. K.; REIS, A. C. F.; BALARIN, M. R. S.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ARAÚJO JR, J. P.; OKANO, W.; SANDINI, I. E. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.16, n.4, p.547-558, 2005.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, New York, v.1, p.27–30. 1995.

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

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. **Patologia processos gerais**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 329p.

FU, W.; MADAN, E.; YEE, M.; ZHANG, H. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1825, p.140–152, 2012.

FUKUMURA, D.; XAVIER, R.; SUGIURA, T.; CHEN, Y.; PARK, E. C.; LU, N.; SELIG, M.; NIELSEN, G.; TAKSIR, T.; JAIN, R. K.; SEED, B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. **Cell**, Massachusetts, n.94, p.715-725, 1998.

GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, R. A.; PIAZER, J. V. M.; BARROS, C. S. L.; MARTINS, T. B.; ROSA, F. B. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.29, n.7, p.515-525, 2009.

GAVA, A. Intoxicações por plantas de ação antihematopoiética e mutagênica. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C. **Doenças de ruminantes e equinos**. Pelotas: Ed Universitária/UFPel, 1994, p.247-258.

GAVA, A.; NEVES, D. S.; GAVA, D.; SALIBA, T. M.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.44, n.6, p.362-365, 2002.

GIATROMANOLAKI, A.; KOUKOURAKIS, M. I.; THEODOSSIOU, D.; BARBATIS, K.; O'BYRNE, K.; HARRIS, A. L.; GATTER, K. C. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.3, p.2485-2492, 1997.

GONZÁLES, C. E.; CHAVERA, A. C.; PERALES, R. C.; FALCÓN, N. P. Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la Zona de Oxapampa, Pasco. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v.15, n.1, p.25-36, 2004.

HAIXIA, D.; JINGSONG, Z.; LEI, J.; HAIRONG, D.; JUN, W.; HANG, X.; WEIXIAN, C. Gene expression of neuropilin-1 and its receptors, VEGF/Semaphorin 3a, in normal and cancer cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, New Jersey, v.59, p.39–47, 2011.

HOQUE, M.; SOMVANSHI, R.; SINGH, G. R.; MOGHA, I. V. Ultrasonographic of urinary bladder in normal, fern fed and enzootic bovine haematuria-affected cattle. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v.49, p.403-407, 2002.

IVASKA, J.; PALLARI, H. M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, Philadelphia, v.313, n.10, p.2050-2062, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KONDI-PAFITI, A.; KAIRI-VASSILATOU, E.; IAVAZZO, C.; VOUZA, E.; MAVRIGIANNAKI, P.; VLAHODIMITROPOULOS, D.; LIAPIS, A. Clinicopathological features and immunoprofile of 30 cases of Brenner ovarian tumors. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, New Jersey, Published online: 25 december 2011. Doi: 10.1007/s00404-011-2182-5.

KYUNG, Y. S.; PARK, H. Y.; LEE, G. Preservation of uroplakins by 2-mercaptoethanesulfonate in cyclophosphamide-induced rat cystitis. **Archives of Toxicology**, Dortmund, v.85, p.51–57, 2011.

LISTI, F.; CANDORE, G.; LIO, D.; CAVALLONE, L.; COLONNA-ROMANO, G.; CARUSO, M.; HOFFMANN, E.; CARUSO, C. Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients Sicily. **European Journal of Immunogenetics**, New Jersey, v.31, p.175-178, 2004.

LUCENA, R. B.; CARMO, P. M. S.; OLIVEIRA-FILHO, J. C.; PIEREZAN, F.; TESSELE, B.; GIARETTA, P. R.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Carcinoma de células renais em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.31, n.6, p.487-494, 2011.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476p.

MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; REICHERT NETTO, N. C.; MONTEIRO, F. A. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça aberdeen angus. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.1, p.77-81, 2002.

MARINHO, V. F. Z.; METZE, K.; SANCHES, F. S. F.; ROCHA, G. F. S.; GOBBI, H. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.54, n.3, p.203-207, 2008.

MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPELER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. **Cell**, Massachusetts, v.31, p.11-24, 1982.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 360p.

MOSTOFI, F. K.; DAVIS, C. J. Histological typing of urinary bladder tumors. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International histological classification of tumors**. Springer: Berlin, 1999, p.7-13.

NUNES, L. C. Aspectos Clínico-epidemiológicos da hematúria enzoótica bovina na região sul do Espírito Santo. **Jornal de Olho no Amanhã**, Vitória, p.4-5, 01 jun. 2009.

NUNES, L. C.; DONATELE, D. M.; SCARDUA, C. M.; DÓREA, M. D.; MONTEIRO, L. N.; BERNARDO, C. C.; CALAIS JR, A. Upper urinary tract lesions associated with enzootic bovine hematuria. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; WIERENGA, T. (Eds). **Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins**. CABI: Cambridge. 20, 2011. p.384-387.

OLIVEIRA, L. G. P. **Novos aspectos patológicos e patogénicos da hematúria enzoótica bovina**. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Clínicas e Patológicas) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PASTOR-NAVARRO, T.; BEAMUD-CORTE´S, M.; FORNAS-BUIL, E.; MORATALLA-CHARCOS, L. M.; OSCA-GARCÍA, J. M.; GIL-SALOM, M. Células madre y medicina regenerativa em urología, 2.<sup>a</sup> parte: urotelio, vejiga, uretra y próstata. **Actas Urológicas Españolas**, Madrid, v.34, n.7, p.592–597, 2010.

PAVLOV, K. A.; GERSHTEIN, E. S.; DUBOVA, E. A.; SHCHEGOLEV, A. I. Vascular endothelial growth factor and type 2 receptor for this factor in vascular malformations. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, London, v.150, n.4, p.481-484, 2011.

PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, p.65-81, 2003.

PERETTI, V.; CIOTOLA, F.; ALBARELLA, S.; RUSSO, V.; DI MEO, G. P.; IANNUZZI, L.; ROPERTO, F.; BARBIERI, V. Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. **Mutagenesis**, Oxford, v.22, n.5, p.317–320, 2007.

PIACENTI, A. M.; OCARINO, N. M.; SILVA, A. E.; RACHID, M. A.; FRANÇA, S. A.; SERAKIDES, R. Mesotelioma pleural com metástase renal em gato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.4, p.558-561, 2004.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: O Gatilho Proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v.25, n.4, p.396-402, 2005.

POHAR-MARINSEK, Z.; LAMOVEC, J. Angiosarcoma in FNA smears: diagnostic accuracy, morphology, immunocytochemistry and differential diagnoses. **Cytopathology**, Oxford, v.21, p.311–319, 2010.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Veterinary medicine. **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. London: Saunders, 2007. 2065p.

RAMOS-VARA, J. A. Imunoistoquímica, não tenha medo do marrom, vermelho e azul. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DA FUNDAÇÃO C. L. DAVIS, 7., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2005.

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A. L.; TROST, M. E.; BRUM, J. S.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.27, n.7, p.261-268, 2007.

ROBERTS, W. G.; PALADE, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.108, p.2369–2379, 1995.

RODRIGUES, A.; MASUDA, E. K.; INKELMANN, M. A.; RAMOS, A. T.; MARQUES, B. M. F. P.; MARTINS, T. B.; KOMMERS, G. D. Carcinossarcoma tireoidiano em um cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1188-1191, 2007.

RUIZ, F. S.; ALESSI, A. C.; CHAGAS, C. A.; PINTO, G. A.; VASSALLO, J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, Rio de Janeiro, v.41, n.4, p.263-270, 2005.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A.; ALVARADO, C. M. Á.; VILLARROEL-NERI, R.; PINO-RAMÍREZ, D.; GARCÍA-BRACHO, D.; SÁNCHEZ-CÓMBITA, G. Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de hematuria enzoótica bovina. **Revista Científica - FCV-LUZ**, Maracaibo, v.16, n.6, p.604 - 612, 2006.

SCHALM, O. M.; JAIN, N. C. **Veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea Fabiger, 1986. 1221p.

SCHLEGEL, R.; BANKS-SCHLEGEL, S.; MCLEOD, J. A.; PINKNS, G. S. Inmunoperoxidase localization of keratin in human neoplasms. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.101, p.41-50, 1980.

SHIGERU, K.; YASUYOSHI, M.; HIROSHI, K. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: urinary cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, Kyoto, v.11, p.90–107, 2006.

SILVA, M. A.; SCÁRDUA, C. M.; DÓREA, M. D.; NUNES, L. C.; MARTINS, I. V. F.; DONATELE, D. M. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1847-1850, 2009.

SINGH, A. K.; JOSHI, H. C.; RAY, S. N. Studies on bovine haematuria. I. Haematological and biochemical observations on the blood of cattle suffering from haematuria. **Indian Journal Animal Science**, Penicuik, v. 43, n.4, p.296-299, 1972.

SMITH, B. L. The toxicity of bracken fern (Genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. In: FELIX D'MELLO, J. P. **Handbook of plant and fungal toxicans**, Florida: Editora CRC Press, 1997. 63-76p.

SOKER, S.; KAEFER, M.; JOHNSON, M.; KLAGSBRUN, M.; ATALA, A.; FREEMAN, M. R. Vascular endothelial growth factor-mediated autocrine stimulation of prostate tumor cells coincides with progression to a malignant phenotype. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.159, p.651–659, 2001.

SOLER, R.; VIANELLO, A.; FULLHASE, C.; WANG, Z.; ATALA, A.; SOKER, S.; YOO, J. J.; WILLIAMS, J. K. Vascular therapy for radiation cystitis. **Neurourology and Urodynamics**, Malden, v.30, p.428–434, 2011.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; RECH, R. R.; PIAZER, J. V. M. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1647-1650, 2006.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v.10, n.1, p.12-18, 2007.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. 942p.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, Oxford, v.21, n.3, p.387-395, 2000.

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

TORRE, A. C.; SUBIZAR, D.; RAMOS, M. C. G.; ENZ, P. A.; KOWALCZUK, A.; GALIMBERTI, R. ¿Eccema vulvar crônico? **Revista do Hospital Italiano de Buenos Aires**, Buenos Aires, v.28, n.2, 2008.

TORRES-OLIVEIRA, F. J.; LAG-ASTURIANO, E.; TORRES-GÓMEZ, F. J.; VINUESA, P. G. G.; PÉREZ-DUARTE, E.; FONT-CABRERA, J. I. Angiosarcoma primario de aurícula derecha. **Revista Española de Patología**, Madri, v.34, n.1, p.37-43, 2001.

TRINDADE, E. S.; POLCHEIRA, P. A.; BASÍLIO, D. B.; ROCHA, Z. N.; ROCHA JÚNIOR, J. L.; PEREIRA PRIMO, G. R. Doença de Paget invasiva da vulva e região perianal: relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.26, n.4, p.329-335, 2004.

VIOTT, A. M.; RAMOS, A. T.; INKELMANN, M. A.; KOMMERS, G. D.; GRAÇA, D. L. Aspectos histoquímicos e imunoistoquímicos nos neoplasmas do sistema nervoso periférico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1145-1153, 2007.

WEIDNER, N.; FOLKMAN, J. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. (Eds). **Important Advances in Oncology**, Baltimore: Lippincott, 1996. p.167–190.

WU, X. R.; LIN, J. H.; WALZ, T.; HANER, M.; YU, J.; AEBI, U.; SUN, T. T. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.269, p.13716–13724, 1994.

WU, X. R.; MANABE, M.; YU, J.; SUN, T. T. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.265, p.19170–19179, 1990.

YILMAZER, D.; HAN, U.; ONAL, B. A comparison of the vascular density of VEGF expression with microvascular density determined with CD34 and CD31 staining and conventional prognostic markers in renal cell carcinoma. **International Urology and Nephrology**, New Jersey, v.39, p. 691-698, 2007.

YLA-HERTTUALA, S.; RISSANEN, T. T.; VAJANTO, I.; HARTIKAINEN, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. **Journal of the American College of Cardiology**, San Diego, v.49, p.1015–1026, 2007.

YU, J.; LIN, J. H.; WU, X. R.; SUN, T. T. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.125, n.1, p.171-182, 1994.

ZUPANCIC, D.; ZAKRAJSEK, M.; ZHOU, G.; ROMIH, R. Expression and localization of four uroplakins in urothelial preneoplastic lesions. **Histochemistry and Cell Biology**, Heidelberg, v.136, p.491–450, 2011.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S586c Silva, Maria Aparecida da, 1983-  
Caracterização histopatológica e imunoistoquímica de bexigas de bovinos com hematúria enzoótica / Maria Aparecida da Silva. – 2012.  
110 f. : il.

Orientadora: Louisiane de Carvalho Nunes.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Hematúria. 2. Bexiga – Tumores. 3. Bovino – Doenças. 4. Endotélio vascular – Crescimento. 5. Anticorpos monoclonais. 6. CD31. I. Nunes, Louisiane de Carvalho. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

---