

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

JACQUES DOUGLAS COIMBRA DIAS

**HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA: DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS TIPO 2
PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR**

ALEGRE – ES

2010

JACQUES DOUGLAS COIMBRA DIAS

**HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA: DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS TIPO 2
PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR**

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 Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico – Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes

ALEGRE – ES

2010

JACQUES DOUGLAS COIMBRA DIAS

HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA: DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS TIPO
2 PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR

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 Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico – Cirúrgicas

Aprovada em ____ de _____ de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza
Universidade Federal de Ouro Preto

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Ademir Silveira Dias e Neuza da Mota
Coimbra.*

*Ao meu irmão Wiverson Coimbra
Silveira.*

Aos meus grandes mestres e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, paz e condições por ter concluído mais essa etapa da minha vida.

Ao meu pai, mãe, irmão pela paciência, compreensão, incentivo nos momentos difíceis e a força para enfrentar as dificuldades.

Ao meu orientador e co-orientadora Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior e Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes respectivamente, por terem me aceitado e pelos ensinamentos compartilhados.

Quero aqui registrar o nome da primeira turma do curso de pós graduação em Ciências Veterinárias do CCA/UFES, Ana Elisa Pato Salgado, Bethânia Ribeiro Almeida, César Otaviano Penna Júnior, Danielle Porcari Alves, Edson Vilele de Melo Filho, Fernando Borges Miranda, Flávia Mara Machado, Jacques Douglas Coimbra Dias, Leonardo Oliveira Trivilin, Marcelo Carvalho dos Santos, Márcio Sérgio Bissoli Vargas, Marilda Onchero Taffarel, Milena Batista Carneiro e Raphael Pires Bolzan.

As minhas queridas amigas Danielle Porcari Alves e Bethânia Ribeiro Almeida, pela luz no fim do túnel.

Aos grandes amigos Fernando Borges Miranda, Flávia Mara Machado, Marcelo Carvalho dos Santos e Raphael Pires Bolzan, pela força, paciência e por me hospedarem em suas casas, meu muito obrigado.

Ao grande amigo Leonardo Oliveira Trivilin pela ajuda na elaboração e execução do projeto e por ter me amparado nos momentos de desespero, muito obrigado.

A minha amiga Mariana Drummond Costa Ignacchiti pela grande ajuda na realização das análises da PCR.

E a todos que fizeram parte direta ou indiretamente de um capítulo da minha caminhada, meu muito obrigado.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo por me ter proporcionado mais essa conquista pessoal, e todos os professores que compartilharam seus conhecimentos para os futuros profissionais.

*“Porque Deus amou o mundo de tal maneira,
que deu o seu filho unigênito para que todo aquele
que n’Ele crê não pereça, mas tenha a vida
eterna”*

João 3:16

*“E se conheceres a verdade e a verdade vos
libertará”*

João 8:32

RESUMO

A hematúria enzootica bovina (HEB) é uma doença de ocorrência mundial e apresenta uma prevalência variada em áreas endêmicas, que pode chegar a 90% em animais com idade superior a dois anos. A técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi desenvolvida e padronizada para a detecção do papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2). Esta técnica é baseada na amplificação enzimática de um fragmento altamente conservado de 386 pb do gene. A infecção com o papilomavírus bovino Tipo 2 (BPV-2) também tem sido implicada na etiologia desta enfermidade. Objetivou-se com este estudo realizar a avaliação macroscópica das lesões de bexiga de bovino e detectar a presença do papilomavírus tipo 2 pela técnica de reação em cadeia de polimerase – PCR. Para isso foram coletadas 50 bexigas de bovinos que apresentaram lesões macroscópicas, sendo cada uma dividida em quatro quadrantes, referenciadas no órgão para os cortes como A, B, C e D, para avaliação histopatológica. A caracterização macroscópica incluiu a definição dos tipos de lesões em: hemorragias difusas ou focais, lesões verrucosas ou hemangiomas, lesões ulceradas, dentre outras. A análise histopatológica revelou cinco amostras positivas para neoplasia (2,5%). Pelo método de reação em cadeia pela polimerase, todas as amostras foram consideradas neoplásicas e apresentaram o papilomavírus bovino tipo 2. A presença do papilomavírus bovino tipo 2 nas lesões neoplásicas de bexiga urinária de bovinos, confirmada pela técnica de PCR, indica que este vírus pode estar diretamente envolvido na patogênese da hematúria enzootica bovina (HEB) em associação com o consumo da samambaia, sendo uma planta endêmica na região.

PALAVRAS CHAVE: neoplasias, bexiga, PCR, bovino

ABSTRACT

The bovine enzootic hematuria (BEH) is a disease of worldwide occurrence and presents a varied prevalence in endemic areas, which can reach 90% in animals older than two years. The technique of polymerase chain reaction (PCR) was developed and standardized for the detection of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2). This technique was based on enzymatic amplification of a fragment of 386 bp highly conserved gene. Infection with bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) has also been implicated in the etiology of this disease. The objective of this study was to make a macroscopic lesions of bovine bladder and the presence of human papillomavirus type 2 by the technique of polymerase chain reaction - PCR. For this 50 bladders were collected from cattle with gross lesions, each being divided into four quadrants, referenced in the body for cuts such as A, B, C and D, for histopathologic evaluation. The characterization included the definition of macroscopic types of lesions: focal or diffuse hemorrhages, lesions or verrucous hemangiomas ulcerated lesions, among others. Histopathologic analysis showed five samples positive for cancer (2.5%). The method of polymerase chain reaction, all samples were considered malignant and showed the bovine papillomavirus type 2. The presence of bovine papillomavirus type 2 in neoplastic lesions of the urinary bladder of cattle, confirmed by PCR indicates that this virus may be directly involved in the pathogenesis of bovine enzootic hematuria (BEH) in association with the consumption of the fern, and one plant endemic in the region.

KEY WORDS: neoplastic, bladder, PCR, bovine

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomacrografia de bexiga urinária de bovino proveniente do matadouro frigorífico de Muniz Freire – ES, revelando lesões macroscópicas. Divisão anatômica do órgão em quadrantes A, B, C e D.....29
- Figura 2. Fotomacrografia de bexiga urinária de bovino proveniente do matadouro frigorífico de Muniz Freire – ES, revelando lesões macroscópicas do tipo hemorrágicas (seta).....33
- Figura 3. Fotomacrografia de bexiga urinária de bovino proveniente do matadouro frigorífico de Muniz Freire – ES, revelando lesões macroscópicas do tipo hemangiomas (seta).....33
- Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo, mostrando os resultados de PCR, para o vírus do Papilomavírus Bovino Tipo 2 (BPV2). PM – Padrão do peso molecular de 100pb. **4A.** 1, 2, 3, 4, 5 e 6 Amostras positivas para BPV2 (fragmento de 386 pb). **4B.** 1, 2, 3, 4 e 5 - Amostras negativas para BPV2.....37

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Achados macroscópicos em bexigas..... | 31 |
| Tabela 2. Distribuição anatômica das lesões macroscópicas nos quadrantes da bexiga..... | 35 |
| Tabela 3. Classificação histomorfológica dos tumores de bexiga urinária de bovinos com HEB provenientes do matadouro frigorífico de Muniz Freire - ES, entre setembro e novembro de 2009..... | 36 |

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
BPV-2 – Papilomavírus Bovino Tipo 2
HEB – Hematúria Enzoótica Bovina
HOVET – Hospital Veterinário
CCA – Centro de Ciências Agrárias
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
°C – Grau Celsius
mg – Miligrama
μL – Microlitro
mM – Milimol
pH – Potencial Hidrogênio Iônico
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
μg – Micrograma
NaCl – Cloreto de Sódio
M – Mol
CTAB – Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
SDS – Dodecilsulfato de Sódio
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
g – Grama
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ng – Nanograma
Taq – *Thermus aquaticus*
u/mL – Unidades por mililitro
RNAse – Ribonuclease

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA. | 13 |
| 2.1 Características botânicas e princípios tóxicos de <i>Pteridium aquilinum</i> | 13 |
| 2.2 Distribuição geográfica da planta | 14 |
| 2.3 Forma clínica da HEB | 15 |
| 2.4 Achados macroscópicos e microscópicos da bexiga de animais com HEB | 16 |
| 2.5 Relação da HEB com papilomavírus | 18 |
| 2.6 Diagnóstico métodos diretos e métodos indiretos | 20 |
| 2.7 Imunoprofilaxia | 22 |
| 2.8 Medidas de controle | 23 |
| 3 CAPÍTULO 1 - HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA: DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS TIPO 2 PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR | 24 |
| 3.1 RESUMO | 25 |
| 3.2 ABSTRACT | 26 |
| 3.3 INTRODUÇÃO | 27 |
| 3.4 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.4.1 Seleção e coleta da amostra | 28 |
| 3.4.2 Processamento das amostras | 29 |
| 3.4.2.1 Processamento e Análise Histopatológica | 29 |
| 3.4.2.2 Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) | 30 |
| 3.4.2.2.1 Extração do DNA | 30 |
| 3.4.2.2.2 Análises do PCR | 31 |
| 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 3.6 CONCLUSÕES | 39 |
| 3.5 REFERÊNCIAS | 40 |
| 4 REFERÊNCIAS | 43 |

1 INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica é uma doença que acometem bovinos e é causada pela intoxicação por *Pteridium aquilinum*. Caracteriza-se pela presença de neoplasias na bexiga com conseqüente hematúria, anemia, emagrecimento progressivo e morte e afeta animais de ambos os sexos com idades superiores a dois anos de idade. Esta doença tem sido relatada no Brasil e em outras partes do mundo, sendo responsável por perdas econômicas significativas (TOKARNIA et al., 2000).

Pteridium aquilinum é uma planta conhecida no Brasil como samambaia, samambaia-do-campo, samambaia-das-taperas, samambaia-pluma ou pluma-grande (TOKARNIA et al. 2000). Esta planta possui várias substâncias responsáveis por outros quadros de intoxicação em bovinos como a diátese hemorrágica e os carcinomas das vias digestivas superiores (SOUTO et al., 2006).

Estudos relataram que a progressão das neoplasias encontradas na bexiga de animais com hematúria enzoótica bovina pode estar associada com a infecção do papilomavírus bovino - BPV (SANTOS et al., 1998).

O diagnóstico do BPV por meio de técnicas convencionais é difícil devido às características da replicação dos genes do BPV *in vitro* (BLOCH et al., 1997). Estes autores demonstraram também que os avanços nas técnicas de diagnóstico molecular tornaram possível a identificação da infecção causada pelo papilomavírus a partir da identificação do genoma viral, utilizando as técnicas de hibridização molecular ou pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Gross e Barroso (1999) citaram que existem outras técnicas como a citologia, histopatologia e imunoistoquímica, porém algumas técnicas apresentam uma menor sensibilidade, levando assim à demora para a conclusão dos resultados.

Objetivou-se com esta revisão descrever aspectos importantes sobre a hematúria enzoótica bovina e sobre a influência do papilomavírus bovino tipo 2

na etiologia desta enfermidade, bem como a utilização da técnica de reação em cadeia de polimerase como método de diagnóstico para este vírus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características botânicas e princípios tóxicos de *Pteridium aquilinum*

Pteridium aquilinum é uma espécie de planta conhecida no Brasil como samambaia, samambaia-do-campo, samambaia-das-taperas, samambaia-pluma ou pluma-grande (TOKARNIA et al., 2000).

Esta planta é planta rizomatosa, apresentando folhas de 60 a 180 cm de comprimento e 60 a 120 cm de largura, com as pinas profundamente lobadas, glabras, com as pinas lanuginosas e ferrugineas na face dorsal. O gênero *Pteridium* ocorre nos cinco continentes e não é encontrado apenas nas calotas polares, mas em regiões de clima seco e árido ou em regiões de florestas tropicais fechadas (ALONSO-AMELOT, 1999).

Trotter (1990) demonstrou que a samambaia apresenta adaptação a diversos ambientes, e uma alta capacidade invasora e cosmopolita devido a seus esporos, pois se deslocam por centenas de quilômetros com o auxílio dos ventos, permitindo assim sua colonização em diversas áreas. Durão et al. (1995) relataram também que essa planta se desenvolve em solos pobres, com baixos níveis de cálcio, fósforo, ácidos e com umidade relativa do ar elevada.

A samambaia possui diferentes princípios tóxicos como, por exemplo, o ptaquilosideo-norsesquiterpeno que é considerado por vários autores como a principal responsável pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos, comprovado por Hirono et al., (1984).

Tokarnia et al. (2000) citaram que as toxinas presentes na planta *Pteridium aquilinum* levam a diversas enfermidades conforme a espécie animal. Em bovinos, esta planta é responsável por três quadros clínicos distintos, diátese hemorrágica aguda, hematuria enzoótica e carcinoma de vias

digestivas superiores (SOUTO et al., 2006). Evans (1968) registrou também intoxicação crônica em ovelhas, levando o aparecimento de tumores intestinais.

Hopkins (1986) destacou outros princípios tóxicos como o tanino, quercetina, ácido chiquímico, prumasina, ptaquilosideo, aquilideo A e canferol, como agentes carcinogênicos.

A intoxicação por *P. aquilium* não só acomete animais como também humanos, pois o consumo da samambaia direta ou indiretamente pode levar a sérias complicações (SMITH et al., 1999). Alonso-Amelot et al. (2002) relataram que em várias partes do mundo existe uma alta incidência de câncer de esôfago em humanos associado ao consumo prolongado da samambaia.

2.2 Distribuição geográfica da planta

No Brasil, a samambaia ocorre em regiões montanhosas, do sul da Bahia até Rio Grande do Sul, sendo também invasora em áreas do Estado do Amazonas, Acre, Mato Grosso, Pernambuco e Espírito Santo (TOKARNIA et al., 2000).

Marçal et al. (2001) também enfatizaram sua presença em várias localidades da região sudeste e sul do Brasil, sendo que em épocas de inverno ocorre uma maior manifestação clínica da intoxicação na forma de surtos agudos, devido à escassez de pastagens e o fato de a samambaia apresentar uma grande resistência ao clima seco. No estado do Paraná esta planta tem proliferado muito devido às condições edafoclimáticas favoráveis em pastagens utilizadas para o rebanho bovino.

Silva et al. (2009) relataram a presença da hematuria enzoótica bovina na microrregião do Caparaó localizada no Sul do estado do Espírito Santo, sendo uma das principais doenças que acometem o gado leiteiro dessa região. Ainda segundo os autores, esta região compreende municípios pequenos, com grande área rural e com carência em tecnologia, mão de obra qualificada e assistência técnica, o que tem favorecido o aparecimento da doença e a existência da planta nas áreas de pastagens.

2.3 Forma clínica da hematúria enzoótica bovina (HEB)

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma das formas clínicas da intoxicação por *P. aquilinum* de caráter não infeccioso e crônico que se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões hemangiomas na parede da bexiga e clinicamente por hematúria intermitente e morte por anemia (RADOSTITIS et al., 2007). Ocorre perda de sangue sem reposição pela medula óssea (anemia aplástica), podendo acometer vacas prenhes e causar aborto (MARÇAL et al., 2001).

Durão et al. (1995) retrataram os sinais clínicos em animais adultos, com idade de três a quatro anos, sendo que sua evolução ocorre devido às crises de hematúria com associação a disúria e poliúria, que podem durar de semanas a anos, como também, outras associações mais graves com as neoplasias do trato alimentar.

De acordo com Moreira-Souto et al. (2006), o diagnóstico de HEB é estabelecido com base na epidemiologia, sinais clínicos e nas lesões macroscópicas e microscópicas da bexiga. De acordo com estes autores o primeiro passo após as manifestações clínicas da intoxicação pela samambaia em bovinos é ir *in loco* para observar a presença da planta no pasto e realizar uma anamnese investigativa para que possa anteceder ao diagnóstico.

Tokarnia et al. (1979) relataram a necessidade do diagnóstico diferencial de HEB com outras enfermidades com sinais clínicos similares como a hemoglobinúria. Polack (1990) citou que Leptospirose, Babesiose, Anaplasmosse, Hemoglobinúria bacilar, intoxicação por *Crotalaria sp* e por trevo doce mofado, são exemplos importantes de enfermidades com sinais clínicos semelhantes que devem ser investigadas.

Marçal (1990) relatou que nos casos de neoplasias do trato digestivo superior causado também pela intoxicação por samambaia, devem ser diferenciadas de casos de tuberculose ou actinobacilose, pois as características de emagrecimento progressivo e dificuldade de deglutição levam à dificuldade no diagnóstico.

2.4 Achados macroscópicos e microscópicos da bexiga de animais com HEB

Dyce et al. (2004) descreveram que a bexiga é um órgão de estocagem, que pode sofrer uma distensão, pois não apresenta ter tamanho, posição ou relações constantes. Em ruminantes, a localização da bexiga é na cavidade pélvica, no entanto, esta pode adentrar a cavidade abdominal quando repleta.

Junqueira e Carneiro (2008) descreveram o aspecto anatopatológico da bexiga como uma camada de mucosa interna formada por um epitélio de transição com espessura variável de 3 a 14 camadas de células e por uma lâmina própria de tecido conjuntivo evidenciando numerosos nódulos de linfóides e exocitose linfocitária. A túnica muscular é composta por três camadas mal definidas com um padrão próprio de entrelaçamento, que compõem uma característica marcante da bexiga com apresentação das fibras disposta longitudinalmente na camada interna, com fibras longitudinalmente na camada externa e circularmente na camada média, e a membrana adventícia externa envolve a bexiga exceto na parte superior onde é coberto por uma membrana serosa (DELLMANN e BROWN, 1982).

As lesões de bexiga causadas pela HEB são muito variadas podendo-se apresentar em forma de couve-flor, hemangiomas ou lesões hemorrágicas (TOKARNIA et al., 2000). As lesões neoplásicas e não neoplásicas são semelhantes às lesões que ocorrem na bexiga de seres humanos (PEIXOTO et al., 2003).

Dentre as lesões não neoplásicas associadas aos quadros de HEB destacam-se as lesões de hiperplasia, hipoplasia, descamação, degeneração do epitélio e infiltrado mononuclear difuso na bexiga (CRUZ e BRACARENSE, 2004).

Murphy et al. (2004) relataram que em seres humanos as metaplasias da bexiga são classificadas em três tipos, escamosa, intestinal e nefrogênica, podendo apresentar outras formas como cartilaginosa, óssea e mielóide, porém estas são mais raras.

Carvalho et al. (2006) descreveram os processos metaplásicos na HEB, do tipo intestinal e escamoso, e uma outra forma semelhante ao que foi descrito em humanos a metaplasia e adenoma nefrogênico.

A proliferação de ninhos de Brum, que é um conjunto de células basais ou intermediárias do urotélio, proliferadas, na lâmina própria ou sem conexão com o urotélio, pode levar a outra lesão chamada de cistite glandular. Esta lesão ocorre quando há o revestimento interno das células colunares da mucosa por mucina. Quando as células assumem o aspecto das células que revestem o cólon intestinal, é chamada de cistite intestinal (RAMMANY, 2008).

A inflamação causada pela HEB pode ser classificada em graus que vai do severo ao moderado, por meio da infiltração das células de forma difusa ou focal, tipicamente por linfocítica ou linfoplasmocitária (CARVALHO et al., 2006).

Peixoto et al. (2003) relataram as dificuldades de identificar na nomenclatura os processos tumorais das neoplasias existentes na bexiga, pois não existe padronização utilizada pelos autores para descreverem as lesões causadas pela hematúria enzoótica bovina.

Dados da Organização Mundial da Saúde (1998) afirmaram que a maior parte dos processos neoplásicos em bexigas de seres humanos são benignos e que as neoplasias encontradas apresentaram um baixo potencial para tumores malignos. Vale ressaltar que os tumores encontrados nas bexigas de seres humanos possuem etiologias distintas das encontradas em bovinos.

Murphy et al. (2004) realizaram um estudo comparativo com Ordóñez e Rosai (1996) onde avaliaram a presença de neoplasias em bexigas de seres humanos e obtiveram resultados significativos de 95% de tumores tem origem epitelial. Nestes 80% eram de caráter maligno e 20% benignos. Em 0,5% houve presença concomitante de dois ou mais tumores diferentes na mesma bexiga.

Em bovinos estes dados mudam significativamente, pois Carvalho et al. (2006) realizaram estudos retrospectivos comparando dados de outros autores e encontraram uma maior prevalência de tumores malignos epiteliais e

benignos mesenquimais, havendo bastante variação entre os estudos. Embora Peixoto et al. (2003) também tenham encontrado coexistência de mais de um tipo de neoplásico em uma mesma bexiga.

2.5 Relação da HEB com papilomavírus

Hopkins (1986) e Campo et al. (1992) relataram envolvimento viral nos casos de hematúria enzoótica pela provável ligação etiológica entre os compostos tóxicos da samambaia e o papilomavírus bovino tipo 2.

Campo et al. (1992) e Borzacchiello et al. (2001) associaram as lesões neoplásicas com estrutura macroscópicas e microscópicas distintas em bexiga e no trato digestório superior em bovinos com a infecção causada pelos BPV-2 e 4, e com fortes indícios da ação da samambaia (*Pteridium aquilinum*) como cofatores oncogênicos devido sua alta toxicidade.

Campo (1997) descreveu algumas alterações neoplásicas causadas pelo papilomavírus no trato digestório superior e de bexiga em bovinos, carcinomas urogenitais e câncer do trato respiratório superior em humanos, câncer do trato digestório e bexiga em humanos, e câncer de pele em humanos e coelhos.

Campo et al. (1999) descreveram que o BPV é um patógeno muito resistente na forma latente em alguns tecidos, uma vez que foi isolado em urotélio normal, naturalmente ou em laboratório, sem qualquer associação com a HEB.

Moura et al. (1988) observaram a correlação de tumores de bexiga causados pelo BPV com relação a indução de lesões semelhantes quando injetados *in loco* o BPV em outros animais saudáveis, porém em animais com presença de carcinoma, apresentaram uma alta incidência de papilomas na região tumoral. Pachauri et al. (1981) relataram a presença do papilomavírus nas formas tumorais mais comuns, papilomas e carcinomas.

Borzacchiello et al. (2001) associaram a relação da intoxicação por *P. aquilinum* ao processo de imunossupressão, pois pode induzir uma maior agilidade do BPV e conseqüentemente o desenvolvimento de papilomas

transicionais, sob a presença de carcinógenos presentes na samambaia, levando ao processo de neoplasias. Campo et al. (1992) afirmaram que dentre os diversos fatores que predisõem a ativação do papilomavírus latente talvez o mais importante seja a imunossupressão.

Hopkins (1986) comprovou a reativação da lesão por meio da ingestão da samambaia ou por algum tipo de trauma físico, e que posteriormente, com a relação da imunossupressão, há o aparecimento clínico de verrugas de pele e tumores de bexiga.

A primeira detecção do DNA deste vírus em tumores de bexiga foi descrito por Campo (1987) onde pode demonstrar, tanto natural quanto experimentalmente, a presença do vírus na forma latente e o seu envolvimento nas neoplasias.

Campo et al. (1992) comprovaram estes dados por meio de um estudo onde o genoma do BPV-2 foi encontrado em 46% nos casos naturais de tumores e 69% nas lesões induzidas experimentalmente, confirmando estritamente a associação entre o vírus e as neoplasias em bexiga de bovino. Os mesmos autores relataram nesse experimento a detecção do genoma do BPV-2 em animais isolados, e que posteriormente, foi inoculado com o papilomavírus tipo 2 ou outro tipo de papilomavírus, mostrando a resistência do vírus na forma latente. Verificou-se ainda que houve ativação do vírus quando o animal foi submetido a fatores carcinogênicos e imunossupressivos da samambaia., no entanto, 20% dos animais controle apresentou o vírus BPV-2.

De Villiers et al. (2004) descreveram que a família *Papillomaviridae* é formada por 16 gêneros e mais de uma centena de tipos virais e até o momento foram caracterizados seis tipos de papilomavírus bovino os BPV-1, BPV-2, BPV-3, BPV-4, BPV-5 e BPV-6. Os gêneros *Delta-papillomavirus* compreendem os BPV-1 e 2, o *Epsilon-papillomavirus* o BPV-5 e o *Xi-papillomavirus* os BPV-3, 4 e 6.

Ogawa et al. (2004) demonstraram a utilização de novos métodos moleculares, passando a reconhecer mais de 16 tipos virais de BPV e com isso facilita o seu diagnóstico.

Campo (1997) classificou em dois subgrupos os seis tipos de BPV, sendo o grupo A composto pelos BPV-1, 2 e 5, que abrange os fibropapilomavírus, e sua infecção começa pela transformação inicial dos fibroblastos sub-epiteliais seguida por acantose e papilomatoses, e o subgrupo B pelos BPV-3, 4 e 6, que compreende os papilomavírus epiteliotróficos, o que ocasiona a indução dos papilomas cutâneos sem envolvimento dos fibroblastos. Jelinek e Tachezy (2005) confirmaram a presença de todos os tipos de BPV na forma de papilomas cutâneos em várias partes do corpo, incluindo úbere em forma de grão de arroz e os tetos.

2.6 Diagnóstico métodos diretos e métodos indiretos

Gross et al. (1999) relataram as principais formas de se diagnosticar as viroses em animais, com a utilização das técnicas convencionais de virologia como a cultura de células, reações sorológicas e por microscopia eletrônica, porém nenhuma das técnicas é utilizada rotineiramente para detectar o papilomavírus, exceto a sorologia para análises do papilomavírus humano (HPV). Estes autores demonstraram que os vírus da família *Papillomaviridae* não podem ser cultivados em sistemas de culturas celulares, sendo realizado o diagnóstico baseado na identificação do DNA viral pelas técnicas de hibridação e PCR.

Cason et al. (1993) e Gross et al. (1999) demonstraram que o exame histopatológico é uma forma de diagnóstico indireto do papilomavírus, pois permite a identificação de neoplasias do intraepiteliais associadas a viroses com características oncogênicas. Estes autores ainda relataram que esta técnica não permite a identificação de qual tipo de vírus está associado ao efeito citopático. Existem também dificuldades na interpretação histológica quando ocorrem as alterações mínimas do vírus-associados causando a inviabilidade para sua identificação na infecção latente. Podemos citar outras técnicas para realizar o diagnóstico como a microscopia eletrônica, imunofluorescência e a sorologia, que é uma das técnicas mais utilizadas em estudos envolvendo o papilomavírus humano (HPV).

Entretanto as formas diretas utilizadas para o diagnóstico do papilomavírus vêm sendo o atual método para realizar sua detecção na forma de esfregaço ou fragmentos de tecidos. A imunistoquímica é uma técnica que pode detectar o revestimento protéico das partículas virais, que, no entanto, não detecta o vírus em sua forma integrada ao genoma da célula hospedeira, devido sua pouca sensibilidade em amostra de tecido neoplásico, não sendo um método indicado para diagnosticar as infecções causadas pelo papilomavírus (GROSS et al., 1999).

Existem também outros métodos moleculares para detecção do genoma do papilomavírus, sendo considerado como principais, a hibridação por *southern blot*, que se trata de um método valioso para a pesquisa do genoma do papilomavírus, no entanto, existem dificuldades para a reprodução dos resultados. A hibridação por *Dot blot* é um método rápido e pouco dispendioso, porém as sondas comerciais disponíveis detectam apenas alguns poucos tipos do HPV (OTTEN et al., 1993 e GROSS et al., 1999).

Santos et al. (1998) e Wosiacki (2002) demonstraram também que a técnica de hibridação *in situ* com filtro (FISH) e a hibridação *in situ* (ISH) são técnicas que permitem a localização do DNA ou RNA em células específicas ou regiões teciduais, porém somente detectam infecções virais com mais de 10 a 20 cópias do genoma viral por célula. A utilização de sondas comerciais disponíveis para ISH é substancialmente menos sensível que a técnica de *Southern blot* ou a de *Dot blot*. A hibridação sanduíche em meio fluido (HCA) é uma das mais antigas técnicas de hibridação de ácidos nucléicos, porém não distingue entre os tipos específicos do vírus e a sua aplicação como método de pesquisa é limitada.

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) tornou-se a mais adequada técnica para a detecção do papilomavírus devido à alta sensibilidade e especificidade, por não requerer o cultivo do vírus. Diferentes sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) foram desenhadas com o objetivo de identificação do BPV-1, BPV-2, BPV-4 e o BPV-5, (BLOCH et al., 1997 e LANCELOTTI et al., 2000). A amplificação do DNA viral pelo PCR é uma técnica que permite a amplificação enzimática *in vitro* de ácidos nucléicos,

DNA ou RNA, que podem ser visualizados por eletroforese (SANTOS et al., 1998; WOSIACKI, 2002).

2.7 Imunoprofilaxia

A criação de imunobiológicos “vacinas” é uma das medidas mais eficientes para diminuir os problemas na saúde pública, pois sob o ponto de vista individual, a vacinação pode determinar entre a saúde e doença ou a vida e a morte.

Hopkins (1986) relatou que a comprovação da associação do papilomavírus tipo 2 na etiologia da HEB poderia ter futuras possibilidades de imunoprofilaxia para essa doença por meio de vacinas específicas e com isso traria grandes benefícios para a pecuária, pois esta doença constitui uma grande perda econômica para produtores rurais.

Campo (1995) observou em bovinos que receberam vacinas convencionais e produzidas por engenharia genética resultados satisfatórios na regressão de tumores epidermais e do trato digestório de bovinos.

Até o presente momento, só foram reconhecidos dois tipos de vacinas, sendo as vacinas profiláticas que produzem anticorpos vírus-neutralizantes e previnem as infecções e as vacinas terapêuticas que induzem à regressão das lesões já presentes antes que a progressão maligna aconteça. Mesmo assim, existem grandes dificuldades em pesquisar esse tipo de vacina contra o papilomavírus devido à incapacidade de replicação *in vitro* em culturas celulares e suas limitações de adaptações em culturas de tecidos (Campo et al., 1994).

Nicholls e Stanley (2000) estudaram a vacina autógena sendo preparada com verrugas homogeneizadas de bovinos e outras espécies de animais. Segundo estes autores os resultados apresentaram, em alguns casos, regressão espontânea, no entanto, outros experimentos já indicam efeitos positivos sobre essa imunização. Outra opção seria a vacinação com uso do vírions purificados sendo administrado por via intramuscular que protege os

animais de novos desafios do homólogo, apresentando em sua composição partículas semelhante aos vírus e vacina de DNA.

2.8 Medidas de controle

Marçal (2003) indicou atenção especial à profilaxia ao rebanho bovino, por meio de medidas de que venha ajudar a consegue limitar a enfermidade, uma das opções foi a realizar da erradicação da samambaia nos pastos, indo em *in loco* para arrancar a planta na época de rebrota, pois mesmo assim esse procedimento não traz resultados rápidos e ainda assim é o mais utilizado nos dias de hoje, sendo uma forma de reduzir ou acabar com as intoxicações em bovinos nos pastos.

Em São Paulo na década de 90 ocorreu uma disseminação de *Brachiaria decumbens* que é uma gramínea sem exigências para o seu desenvolvimento dando em solo com pouca fertilização. Porém essa disseminação trouxe bons resultados em áreas que era infestado pela samambaia, pois as áreas onde no passado os bovinos sofreram com mortalidade por meio da intoxicação causada pela alimentação da samambaia, foram reduzidas a números significativos (MARÇAL, 1992).

Rajendran et al. (1983) descreveu outras formas para realizar a erradicação e sugeriu novas perspectivas na implantação da tecnologia agrícola, para erradicar a samambaia por meio de cuidado intensivo do solo, com uso de adubações completas e de boa qualidade, calagem e formação de novas pastagens. E se de tudo não dar certo ou não for possível aplicar essa metodologia, pode ser feito uma alternância de pastoreio entre pastos com a samambaia e outros sem a planta, porém se faz necessário a limpeza do pasto em períodos de vinte e um dias, para a retirada da samambaia.

Ainda não existem informações elucidativas relacionadas à HEB e à influência do papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia desta enfermidade na região Sul do Estado do Espírito Santo. Torna-se necessária a realização de um estudo etiológico na região, tendo em vista que existem diferenças de toxicidade da planta entre as diferentes regiões geográficas e na histogênese das neoplasias e lesões não neoplásicas da bexiga.

CAPÍTULO 1

HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA: DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS TIPO
2 PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR

3 CAPÍTULO 1 - HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA: DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS TIPO 2 PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR

3.1 RESUMO: A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença de ocorrência mundial e apresenta uma prevalência variada em áreas endêmicas, que pode chegar a 90% em animais com idade superior a dois anos. A técnica da reacção em cadeia pela polimerase (PCR) foi desenvolvida e padronizada para a detecção do papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2). Esta técnica foi baseada na amplificação enzimática de um fragmento altamente conservado de 386 pb do gene. A infecção com o papilomavírus bovino Tipo 2 (BPV-2) também tem sido implicada na etiologia desta enfermidade. Objetivou-se com este estudo realizar a avaliação macroscópica das lesões de bexiga de bovino e detectar a presença do papilomavírus tipo 2 pela técnica de reacção em cadeia de polimerase – PCR. Para isso foram coletadas 50 bexigas de bovinos que apresentaram lesões macroscópicas, sendo cada uma dividida em quatro quadrantes, referenciadas no órgão para os cortes como A, B, C e D, para avaliação histopatológica. A caracterização macroscópica incluiu a definição dos tipos de lesões em: hemorragias difusas ou focais, lesões verrucosas ou hemangiomatosas, lesões ulceradas, dentre outras. A análise histopatológica revelou cinco amostras positivas para neoplasia (2,5%). Pelo método de reacção em cadeia pela polimerase, todas as amostras foram consideradas neoplásicas e apresentaram o papilomavírus bovino tipo 2. A presença do papilomavírus bovino tipo 2 nas lesões neoplásicas de bexiga urinária de bovinos, confirmada pela técnica de PCR, indica que este vírus pode estar diretamente envolvido na patogênese da hematúria enzoótica bovina (HEB) em associação com o consumo da samambaia, sendo uma planta endêmica na região.

PALAVRAS CHAVE: neoplasias, bexiga, PCR, bovino

3 CHAPTER 1 – BOVINE ENZOOTIC HEMATURIA: DETECTION PAPILOMAVIRUS TYPE 2 BY TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION – PCR

3.2 ABSTRACT: The bovine enzootic hematuria (BEH) is a disease of worldwide occurrence and presents a varied prevalence in endemic areas, which can reach 90% in animals older than two years. The technique of polymerase chain reaction (PCR) was developed and standardized for the detection of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2). This technique was based on enzymatic amplification of a fragment of 386 bp highly conserved gene. Infection with bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) has also been implicated in the etiology of this disease. The objective of this study make a macroscopic lesions of bovine bladder and the presence of human papillomavirus type 2 by the technique of polymerase chain reaction - PCR. For this 50 bladders were collected from cattle with gross lesions, each being divided into four quadrants, referenced in the body for cuts such as A, B, C and D, for histopathologic evaluation. The characterization included the definition of macroscopic types of lesions: focal or diffuse hemorrhages, lesions or verrucous hemangiomas ulcerated lesions, among others. Histopathologic analysis showed five samples positive for cancer (2.5%). The method of polymerase chain reaction, all samples were considered malignant and showed the bovine papillomavirus type 2. The presence of bovine papillomavirus type 2 in neoplastic lesions of the urinary bladder of cattle, confirmed by PCR indicates that this virus may be directly involved in the pathogenesis of bovine enzootic hematuria (BEH) in association with the consumption of the fern, and one plant endemic in the region.

KEY WORDS: neoplastic, bladder, PCR, bovine

3.3 INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma das formas clínicas da intoxicação crônica causada pelo consumo da espécie vegetal (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), variedade *Arachnoideum*, conhecida comumente por samambaia, samambaia-do-campo, samambaia-das-taperas, pluma ou pluma-grande, pertencente à família Polypodiaceae (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000).

Segundo Silva et al. (2009) a samambaia é abundante na microrregião do Caparaó, ES e a prevalência de HEB em bovinos leiteiros nesta região é bastante elevada (56,4%) quando comparada com outros estados do Brasil. O grande número de animais que apresentam esta doença tem levado os produtores a grandes perdas econômicas e a descartar precocemente os animais utilizados em criações leiteiras, enviando-os para o matadouro frigorífico. Não existem relatos até o momento da relação entre os princípios químicos da samambaia e a presença do papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) em bovinos no Sul do Estado do Espírito Santo.

Entretanto Campo et al. (1992) relataram que *P. aquilinum* possui vários princípios carcinogênicos, mutagênicos e imunossupressores, podendo causar diferentes neoplasmas na bexiga.

De acordo com Moreira-Souto et al. (2006) o diagnóstico de HEB é estabelecido com base na epidemiologia, sinais clínicos e nas lesões macroscópicas e microscópicas da bexiga. A co-carcinogenicidade que é a correlação entre o papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) e os compostos químicos da samambaia, tem sido implicada na etiologia da HEB (CAMPO et al., 1992; CAMPO, 2002; WOSIACKI et al., 2005).

De acordo com Wosiacki, (2002) as relações entre o BPV-2 e os tumores de bexiga em bovinos já estão documentadas, no entanto, o envolvimento viral na etiologia da HEB ainda tem sido pouco estudado. Algumas evidências epidemiológicas sugerem que haja progressão das lesões da bexiga em relação à malignidade e que isto é dependente de inter-relações entre o papilomavírus e os compostos químicos da samambaia.

Diante do exposto, nota-se a ausência de estudos convincentes e concretos relacionados a este assunto na região, onde a planta existe em vasta escala. Torna-se, portanto, necessária a realização de estudos que permitam a

obtenção de dados, e assim, contribuir para o estabelecimento de diagnósticos mais precisos em casos de HEB. Além disso, a detecção do BPV-2 em lesões neoplásicas pode servir como base para estudos futuros no sentido de combate e controle da HEB, uma vez que a comprovação do envolvimento do BPV-2 na etiologia desta enfermidade poderá abrir perspectivas para o emprego de vacinas específicas no controle imunoprolático desta importante doença dos bovinos.

Objetivou-se com esse estudo detectar a presença do papilomavírus bovino tipo 2 por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase em amostras de bexigas urinárias de bovinos apresentando neoplasias associadas à hematúria enzoótica bovina.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Seleção e coleta da amostra

Para a realização do experimento foram utilizadas amostras de bexigas de bovinos coletadas no matadouro frigorífico de Muniz Freire, Espírito Santo. As bexigas foram selecionadas quanto à presença de lesões macroscópicas caracterizadas por hemorragias difusas ou focais, lesões verrucosas ou hemangiomas, lesões ulceradas, dentre outras. No total foram coletadas e utilizadas 50 bexigas.

As bexigas foram analisadas, no próprio matadouro, por meio da abertura pela face ventral, no sentido caudo-cranial, com corte que se iniciava da base (uretra) até ao fundo (cicatriz do úraco) para observação da mucosa e confirmação da lesão.

As bexigas com lesões foram embaladas individualmente e identificadas com o número de abate e do lote, acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET/CCA-UFES). No laboratório, as bexigas foram divididas em quatro quadrantes: A, B, C e D, totalizando 200 amostras. Os quadrantes A e B se referiam à porção superior da bexiga e os quadrantes C e D, inferior, conforme ilustra a Figura 1.

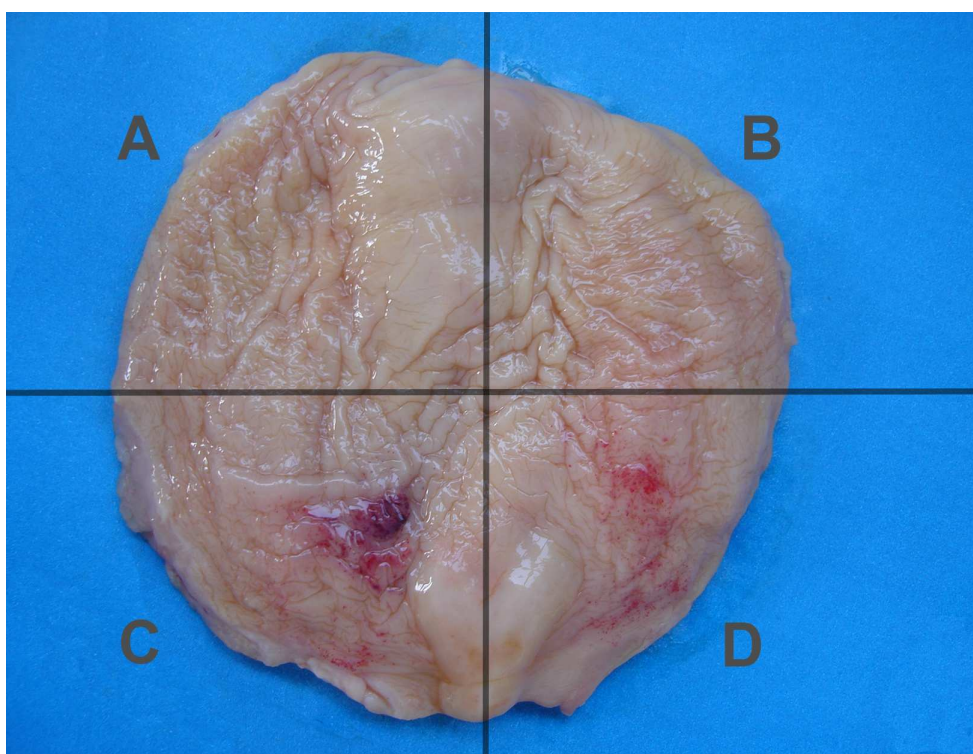


Figura 1. Fotomacrografia de bexiga urinária de bovino proveniente do matadouro frigorífico de Muniz Freire – ES, revelando lesões macroscópicas. Divisão anatômica do órgão em quadrantes superiores A e B, quadrantes inferiores C e D.

De cada quadrante foram retirados dois fragmentos, com o auxílio de uma tesoura e fazendo um corte de 4 cm aproximadamente, sendo uma destinada a análise por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) e o outro para o processamento histopatológico. Para a PCR, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e acondicionadas no freezer a -20°C . Para a histopatologia, as amostras foram colocadas em cassetes plásticos, identificadas e fixadas em solução de formalina 10%.

3.4.2 Processamento das amostras

3.4.2.1 Processamento e análise histopatológica

O material fixado em formalina foi submetido ao processamento histológico que consistiu na desidratação (álcool absoluto), diafanização (xilol absoluto) e inclusão em parafina histológica derretida a 60°C . Em seguida, as amostras foram submetidas à microtomia em micrótomo rotativo manual para a

secção de cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura que foram depositados em lâminas histológicas e corados pelo método Hematoxilina-Eosina (LUNA, 1968). O material foi submetido à microscopia e avaliado por um patologista veterinário. Após esta avaliação foram emitidos laudos histopatológicos que serviram de base para a realização da reação em cadeia de polimerase – PCR.

Neste estudo, utilizou-se para PCR somente as amostras que apresentaram lesões neoplásicas, malignas ou benignas.

3.4.2.2 Técnica de reação em cadeia de polimerase – PCR

As amostras mantidas em freezer foram utilizadas para a técnica de PCR conforme o resultado obtido na avaliação microscópica.

3.4.2.2.1 Extração do DNA

Para cada 100 mg de tecido coletado com neoplásicas foram previamente pulverizados foram adicionados 250 µL do tampão de lise (Tris 0,05 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, 1% de N-Laurilsarcosina e 100 µg/mL de proteinase K) e mantidos a 37°C durante 1 hora. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de NaCl 5M, e a mistura incubada por 10 minutos a 65°C. Posteriormente foram adicionados 50 µL de uma solução de CTAB/NaCl a 10%, seguido por uma incubação por 20 minutos 65°C. Em seguida, foi adicionada à mistura uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1) na proporção de 1:1 e o material centrifugado a 12000 G por 10 minutos a 4°C.

Já na fase aquosa, contendo o DNA, foi transferida para tubo de poliestireno estéril. Com a finalidade de precipitar o DNA genômico, foi adicionada à fase aquosa igual volume de isopropanol, o tubo foi lentamente invertido por três vezes e incubado a 4°C, durante 20 minutos. Após a incubação, o DNA foi recuperado por centrifugação a 12000 G por 10 minutos a 4°C. O DNA foi lavado com etanol a 70%, centrifugado (1000 G por 5 minutos a 4°C), seco a vácuo, ressuspenso em 30µL de tampão de extração de água deionizada estéril e armazenados a 4°C até o momento do uso.

3.4.2.2 Análises da PCR

Em tubo de poliestireno estéril de 200µL foi adicionado à mistura reacional para um volume final de 50µL, contendo os seguintes componentes: água (RNase livre) volume final para 25 µl, tampão da enzima Taq DNA Polimerase (5x), 1,5 µl MgCl₂ (50mM), oligoiniciadores específicos *BPVCON* 5'-*TGTTCCCAAAGTGTCTG*-3' e o *BPV2* 5'-*ATTCTAAAGGAGGACACG*-3' (10mM), dNTPs (10mM), 5 ηg de DNA e Taq DNA Platinum 5u/mL.

Logo após a adição de todos os componentes reacionais, a mistura foi encubada em termociclador de acordo com a seguinte estratégia de amplificação: um passo inicial de 94°C por três minutos, seguido de 40 ciclos dimensionados em desnaturação a 94°C por um minuto; emparelhamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 1 minuto e meio a 45°C; extensão da enzima a 72°C por 1 minuto e meio. Como controle negativo foram utilizadas cinco bexigas sem a presença de lesões macroscópicas para comprovação da ausência do vírus.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram acompanhados dois abates com intervalo de dois meses no matadouro frigorífico de Muniz Freire, Espírito Santo. Os animais abatidos eram procedentes das cidades de Irupi-ES, Guaçuí-ES, Muniz Freire-ES, Alegre-ES e Mutum-MG. No total foram acompanhados abates de 131 animais, sendo examinadas todas as bexigas urinárias para verificação de lesões macroscópicas, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Achados Macroscópicos em Bexigas.

| Localidades | Animais | Bexigas com Lesões Macroscópicas |
|--------------------|----------------|-----------------------------------------|
| Alegre-ES | 20 | 10 (50%) |
| Irupi-ES | 39 | 17 (43,6%) |
| Muniz Freire-ES | 25 | 07 (28%) |
| Guacuí-ES | 20 | 06 (30%) |
| Mutum-MG | 27 | 10 (37%) |
| Total | 131 | 50 Bexigas |

Silva et al. (2009) encontraram presença da planta nos dez municípios que compõem a microrregião do Caparaó, ES, sendo estes, Alegre, Guaçuí, Divino de São Lourenço, Muniz Freire, Iúna, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Dolores do Rio Preto e São José do Calçado.

Tokarnia, Döbereiner e Peixoto, (2000) e Riet-Corrêa et al. (2007) encontraram a presença da samambaia em quase todo o país, nas regiões que apresentaram solos ácidos e arenosos. Há registros do seu desenvolvimento também em regiões com solos pobres, ácidos, com baixos níveis de cálcio e de fósforo e com umidade relativa do ar elevada, sendo condições adequadas para o crescimento e proliferação da samambaia (DURÃO, FERREIRA e CABRAL, 1995).

Evans (1986), Polack (1990) e Tokarnia, Döbereiner e Peixoto, (2000) destacaram que a samambaia é comum em regiões com características montanhosas, como o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, áreas dos estados do Amazonas, Acre, Mato Grosso, Pernambuco, São Paulo, norte do Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo.

Do total de 50 bexigas analisadas, apresentaram algum tipo de lesões macroscópicas. Dentre as lesões observadas prevaleceram às hemorragias petequiais ou equimóticas focais ou difusas em 86% das amostras (43/50) seguidas das lesões hemangiomas em 26% (13/50) e lesões papilomas em 4% (02/50), conforme ilustram as Figuras 2 e 3, respectivamente.

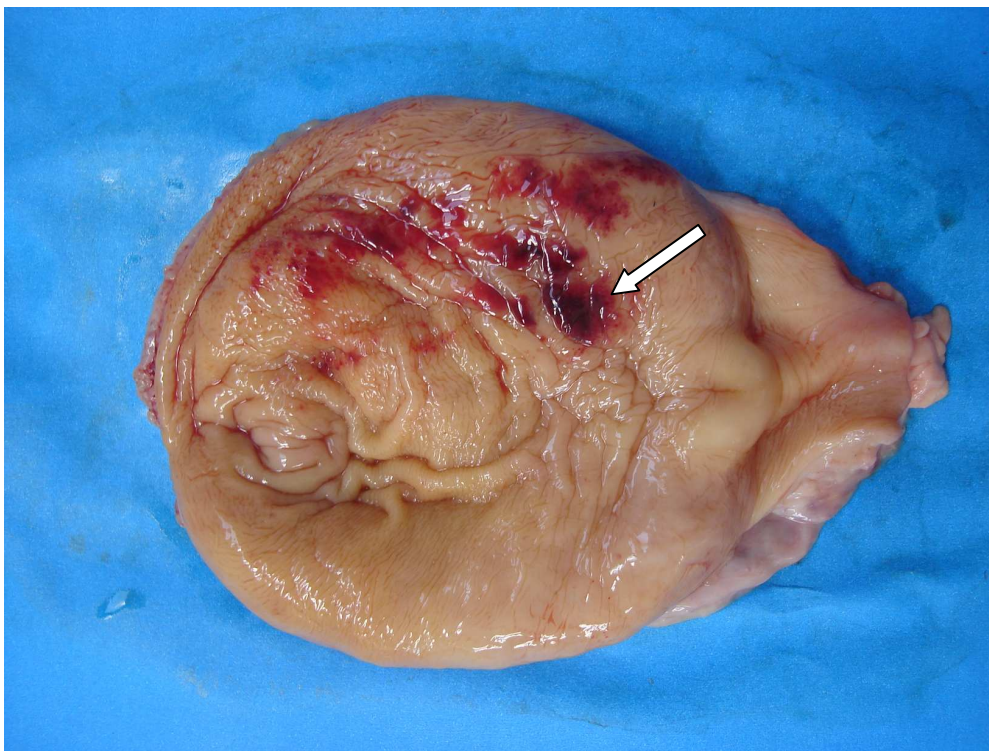


Figura 2. Fotomicrografia de bexiga urinária de bovino proveniente do matadouro frigorífico de Muniz Freire – ES, revelando lesões macroscópicas do tipo hemorrágicas (seta).

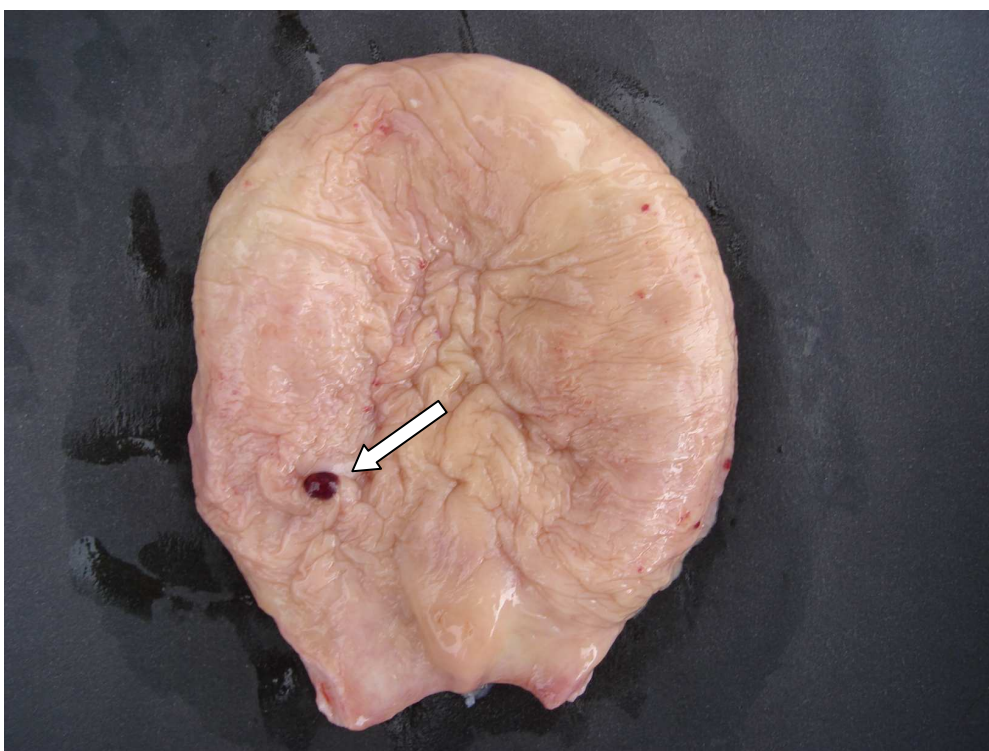


Figura 3. Fotomicrografia de bexiga urinária de bovino proveniente do matadouro frigorífico de Muniz Freire – ES, revelando lesões macroscópicas do tipo hemangiomas (seta).

Segundo Price e Pamucku (1968) a HEB pode ser caracterizada por neoplasias presentes na parede da bexiga e hemorragias da vesícula urinária. Tokarnia, Döbereiner e Peixoto, (2000) realizaram avaliação macroscópica de animais com HEB e demonstraram que as lesões variam desde nódulos de alguns milímetros ou com aspecto de couve-flor de vários centímetros de diâmetro, podendo apresentar colorações branco-amarelada ou avermelhada, focos de hemorragia e crescimentos vasculares. De acordo com estes mesmos autores, nos casos mais graves, pode haver espessamento da parede. Peixoto et al. (2003) também descreveram que as lesões em bexiga de bovinos com HEB apresentam uma diversidade de lesões.

Tokarnia, Döbereiner e Peixoto, (2000) relataram que as neoplasias encontradas em bovinos com HEB têm origem tanto epitelial quanto mesenquimal e raramente geram metástases. Outro fato é que as alterações neoplásicas nem sempre estão envolvidas diretamente com a hematúria, e sim com a presença de congestão e ectasia de vasos sanguíneos. Este fato foi também observado neste estudo, onde as lesões hemorrágicas variando desde petéquias até equimoses prevaleceram, demonstrando que nem sempre o que causa necessariamente a hematúria no bovino são lesões neoplásicas e sim as lesões vasculares.

Estudos realizados por Souza e Graça (1993) no Estado do Rio Grande do Sul revelaram que em 18 animais com hematúria enzoótica bovina (HEB), dez (55,5%) apresentaram tumores na bexiga e hematúria intermitente ou constante. Apenas uma (5,5%) bexiga apresentou lesão papilomatosa e as demais demonstraram focos hemorrágicos e ulcerações na mucosa.

Gabriel et al. (2009) apresentaram uma nova classificação para as lesões macroscópicas, após a observação em onze bexigas de bovinos, a saber: nódulos vesicais multifocais vermelho-escuros ou claros em 4/11(36,36%); alteração da forma normal do órgão e neoplasias vesicais focalmente extensas em 5/11(45,45%); acúmulo de urina com presença de sangue e dois casos com coágulos de sangue aderidos à mucosa 4/11(36,36%); hidronefrose com hidroureter 3/11(27,27%); papilomas vesicais 2/11(18,18%); hemorragias 1/11(9,1%); pielonefrite 1/11(9,1%) e ruptura da bexiga 1/11(9,1%). De acordo com estes mesmos autores, algumas lesões macroscópicas acometiam toda a

extensão da bexiga, formadas por crescimentos exofíticos com superfície irregular, branco-amarelado ou eram endofíticos, com espessamento da parede da bexiga e superfície extensamente ulcerada recoberta por fibrina.

Nossos achados foram semelhantes aos autores citados conforme a tabela 2.

Tabela 2. Distribuição anatômica das lesões macroscópicas nos quadrantes da bexiga.

| Quadrantes Superiores | | |
|------------------------------|-------|-----|
| A | 10/50 | 20% |
| B | 14/50 | 28% |
| Quadrantes Inferiores | | |
| C | 42/50 | 84% |
| D | 34/50 | 68% |

Acredita-se que a maior frequência de lesões na porção caudal da bexiga seja devido ao maior tempo de armazenamento de urina neste local.

Gabriel et al. (2009) avaliando lesões de bexiga em animais com HEB verificaram que a maioria das lesões foram encontradas na região do triângulo vesical, e em alguns casos, as lesões eram localizadas nos linfonodos da cavidade pélvica, com áreas multifocais firmes branco-amareladas. Dos onze animais avaliados por estes autores, apenas em um bovino foram observadas numerosas projeções, longas e finas com consistência gelatinosa (cistite polipóide), sendo agrupadas em áreas multifocais.

Segundo Murphy, Grignon e Perlman, (2004), Moore e Persaud (2000), o local onde ocorrem com maior incidência as lesões não está bem elucidado, pois se estuda a parte anterior (ventral) da bexiga e a parte das paredes laterais. A parede anterior é o local onde geralmente se faz a incisão longitudinal sendo identificada exatamente pelas bordas da bexiga aberta, não apresentando nenhuma relação à parede posterior da bexiga. No entanto, Murphy, Grignon e Perlman, (2004), afirmaram que em seres humanos existem relatos que remanescentes embriológicos do úraco poderiam levar a dar origem a processos neoplásicos incomuns, mesmo assim não foram

encontradas evidências macroscópicas ou microscópicas de lesões específicas nesta região.

Os resultados da histopatologia obtidos por meio dos laudos registrados no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário revelaram que das 200 amostras analisadas cinco apresentaram neoplasias (2,5%), sendo três carcinomas de célula de transição, dois hemangiossarcomas, um adenoma cístico, um hemangioma cavernoso. Em duas amostras foram observadas duas neoplasias concomitantes. Estes dados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 3. Classificação histomorfológica dos tumores de bexiga urinária de bovinos com HEB provenientes do matadouro frigorífico de Muniz Freire-ES, entre setembro e novembro de 2009.

| Animal | Lesão microscópica bexiga urinária | |
|----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| | Benignas | Malignas |
| P104/09 | Adenoma cístico | ---- |
| P114/09 | --- | Carcinoma de células de transição |
| P123/09 | --- | Hemangiossarcoma |
| P129/09 | ---- | Carcinoma de células de transição Hemangiossarcoma |
| P199/09 | Hemangioma cavernoso | Carcinoma de células de transição |

Souza e Graça (1993) no Estado do Rio Grande do Sul encontraram resultados histopatológicos semelhantes ao deste estudo, sendo que em 18 animais com hematúria enzoótica bovina (HEB) nove bexigas com hemangiomas, uma com hemangiossarcoma, uma com carcinoma e uma com papiloma. As demais bexigas estudadas tiveram relação com carcinomas das vias digestivas superiores (CVDS).

No entanto, Oliveira (2009) verificou que as principais neoplasias observadas em animais com HEB são os tumores vasculares (81,5%). Em 12,5% das neoplasias foram encontrados carcinomas uroteliais, e em uma bexiga somente proliferações vasculares hiperplásicas e acentuada hemorragia na lâmina própria. Estudos anteriores demonstraram que a hematúria pode estar associada apenas a alterações inflamatórias e vasculares, não-neoplásicas (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). Murphy, Grignon e Perlman, (2004) explicaram que mesmo pequenas lesões que resultem em

perda de células uroteliais podem causar sangramento devido à presença de pequenos vasos justapostos à camada basal do urotélio. Estes achados ainda não foram descritos em animais com HEB.

O par de oligos utilizados nesse estudo foi idealizado para amplificar um fragmento de 386 pb proveniente do vírus do papiloma bovino tipo 2 – BPV-2 (WOSIACKI, 2002). Após a reação da PCR todas as amostras neoplásicas se mostraram positivas para BPV-2, como observado na figura 4A. Com relação ao controle negativo, não foi visualizado a amplificação de nenhum fragmento (Figura 4B).

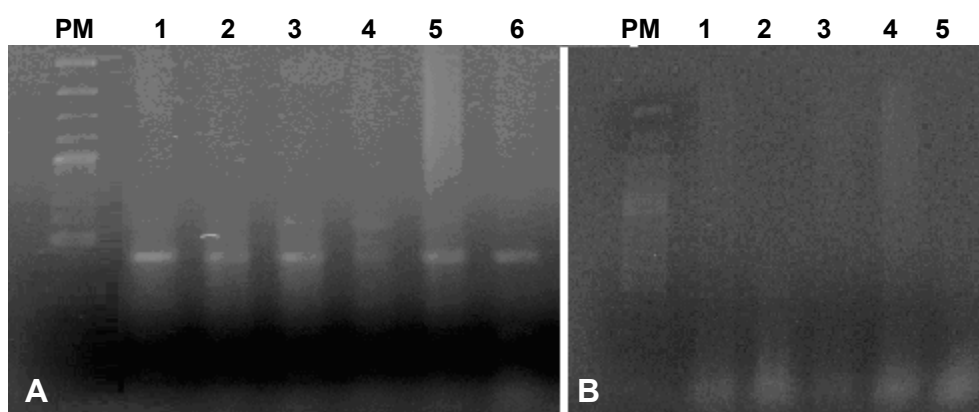


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo, mostrando os resultados da PCR, para o vírus do Papilomavírus Bovino Tipo 2 (BPV2). PM – Padrão do peso molecular de 100pb. **4A.** 1, 2, 3, 4, 5 e 6 Amostras com neoplasias positivas para BPV-2 (fragmento de 386 pb). **4B.** 1, 2, 3, 4 e 5 - Amostras negativas para BPV-2.

A baixa prevalência de neoplasias nas amostras avaliadas talvez se deva ao fato destas serem provenientes de matadouro frigorífico onde a idade média dos animais abatidos foram de 6 anos. Sabe-se que a HEB é uma doença crônica que acomete animais com idade superior a dois anos, e que, na maioria das vezes, ocorre em animais acima de cinco anos. Silva et al. (2009) encontraram a doença em animais entre 4 e 14 anos de idade.

Mesmo com a pequena quantidade de lesões neoplásicas foi possível identificar a presença viral em todas as amostras, utilizando-se o PCR. Estes dados demonstraram que o BPV-2 pode participar diretamente da etiologia da HEB. De acordo com Wosiacki (2002), os avanços nos métodos de análise molecular vêm tornando possível o diagnóstico da infecção pelo papilomavírus a partir da identificação do genoma viral por técnicas de hibridação molecular

ou pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Outras técnicas convencionais como a citologia, a histopatologia e a imunoistoquímica também podem ser utilizadas, porém com menor sensibilidade e, em algumas situações, com demora para a conclusão dos resultados.

A primeira detecção do DNA deste vírus, em tumores de bexiga, foi descrito por Campo em 1987, onde foi observada a presença do vírus em lesões naturais e induzidas, sugerindo a sua relação com a formação dos tumores.

Hopkins (1986) relatou a atividade do vírus BPV-2 nos casos de HEB pela sua provável ligação etiológica entre os compostos tóxicos da samambaia. Borzacchiello et al. (2001) apresentaram a relação da intoxicação por *P. aquilinum* devido ao processo de imunossupressão, pois pode induzir uma maior agilidade do BPV-2 e conseqüentemente o desenvolvimento de papilomas transicionais, sob a presença de carcinógenos presentes na samambaia levando ao processo de malignização.

Campo et al. (1992) comprovaram esses dados por meio de um estudo onde o DNA do BPV-2 foi encontrado em 46% nos casos naturais de tumores e 69% nas lesões induzidas experimentalmente, confirmando estritamente a associação entre o vírus e as neoplasias em bexiga de bovino. Juntamente a esse experimento também foi detectado em animais isolados, e posteriormente foi inoculado com o papilomavírus tipo 2 ou outro tipo de papilomavírus, mostrando a resistência do vírus na forma latente e sendo ativado quando o animal for submetido a fatores carcinogênicos e imunossupressivos da samambaia.

Oliveira, (2009) demonstrou 80% de positividade de para BPV2 em amostras de bexiga, sendo justificada pelo uso da técnica de PCR devido sua sensibilidade. As amostras utilizadas por este autor apresentaram lesões macroscópicas expressivas e verrugosas e todos os animais eram provenientes de regiões onde a presença da samambaia era alta.

Com relação à sensibilidade da técnica de PCR, Oliveira (2009) encontrou diferença entre os resultados da eletroforese utilizando gel de agarose e gel de poliacrilamida, sendo que em agarose houve 62,5% de positividade viral e em poliacrilamida, 80%. Neste estudo não foram utilizados diferentes tipos de

meios para a realização da eletroforese, mesmo assim, houve uma maior sensibilidade utilizando-se a técnica do gel de agarose.

As amostras utilizadas como controle negativo eram provenientes de animais das mesmas regiões, coletadas aleatoriamente, e submetidas às mesmas condições de manejo e pastoreio, porém sem presença de lesões macroscópicas. Todas as cinco amostras avaliadas foram negativas à presença do vírus. Neste contexto, Campo et al. (1999) descreveram o BPV-2 como um patógeno muito resistente na forma latente em alguns tecidos, pois foi isolado em urotélio normal, naturalmente ou em laboratório e sem qualquer associação com a HEB.

3.6 CONCLUSÕES

A presença do papilomavírus bovino tipo 2 nas lesões neoplásicas de bexiga urinária de bovinos, confirmada pela técnica de PCR, indica que este vírus esteja diretamente envolvido na patogênese da hematúria enzoótica bovina (HEB) em associação com a samambaia.

3.7 REFERÊNCIAS¹

BORZACHIELLO, G. AMBROSIO, V. GALATI, P. POGGIALI, A. VENUTI, A. ROPERTO, F. The Pagetoid Variant of Urothelial Carcinoma *In Situ* of Urinary Bladder in a Cow. **Veterinary Pathology**, n. 38, p.113–116, 2001.

CAMPO, M. S. Papillomas and cancer in cattle. **Cancer Survey**, v. 6, n. 1, p. 39 – 54, 1987.

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

CAMPO, M. S. BENISTON, R. G. CONNOLLY, J. A. GRINDLEY, G. J. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In: Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control, J. Taylor and R.T. Smith, Eds, **International Bracken Group Special Publication**, n. 4, Manchester, UK, p. 116–122, 1999.

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

DURÃO, J. F. C. FERREIRA, M. L. CABRAL, A. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.5, n.1, p.11-20, 1995.

EVANS, I. A. The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken. In: Bracken, Ecology, Land use and Control Technology. Ed. Smith L.T.; Taylor, J. A. **Parthenon Publishing Group**, Carnforth, Lancs, p. 139-146, 1986.

¹ Foram seguidas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *NBR 6023*, de 2002.

GABRIEL, A. L. KOMMERS, G. D. MASUDA, E. K. RAFAEL, A. 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** 29(7):515-525, 2009.

HOPKINS, N. C. G. Aetiology of enzootic haematuria. **The Veterinary Record**, London, v.118, p.715-717, 1986.

LUNA, L. G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: MacGraw Hill, pg. 258, 1968.

MOORE, K. L. PERSAUD, T. N. V. Sistema urogenital. In: Embriologia clínica. **6ª ed. Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, RJ. p. 290-310, 2000.

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

MURPHY, W. M. GRIGNON, D. J. PERLMAN, E. J. Tumors of the urinary bladder and related urinary bladder. In: Tumors of the kidney, bladder and related structures. 4ª ed. **American Registry of Pathology**, Washington, DC, p. 241-351, 2004.

OLIVEIRA, L. G. P. Novos Aspectos Patológicos e Patogenéticos da Hematuria Enzoótica Bovina, **Dissertação**, UFRRJ, 2009.

PEIXOTO, P. V. FRANÇA, T. N. BARROS, C. S. L. TOKARNIA, H. C. Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 23(2):65-81, 2003.

POLACK, E. W. Toxicidade da *Pteridium aquilinum* no Estado do Paraná, Curitiba. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** - Universidade Federal do Paraná, 1990.

PRICE, J. M. PAMUKÇU, A. M. The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). **Cancer Research**, 28:2247-2251, 1968.

RIET-CORRÊA, F. SCHILD, A. L. LEMOS, R. A. A. BORGES, J. R. J. Doenças de ruminantes e eqüinos, **3ª ed. Editora Pallotti Vol 2**. 173-176. Santa Maria, RS, 2007.

SILVIA, 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.

SOUZA, M. V. GRAÇA, D. L. Intoxicação crônica por *P. aquilinum* (L.) Kuhn (*Polypodiaceae*) em bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 23(2):203-207, 1993.

TOKARNIA, C. H. DÖBEREINER, J. PEIXOTO, P. V. Plantas tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Helianthus**, pg. 320, 2000.

WOSIACKI, S. R. Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico, **Dissertação** (Mestrado em Sanidade Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

WOSIACKI, S. R. BARREIROS, M. A. B. ALFIERI, A. F. ALFIERI, A. A. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological Methods**, v.126, p.215-219, 2005.

4 REFERÊNCIAS²

ALONSO-AMELOT M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista Faculdade Agronomia**, n. 16, p. 528-541, 1999.

ALONSO-AMELOT, M. E. & AVENDANO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: review of the evidence. **Current Medicinal Chemistry**, Mar., vol. 9, n. 6, p.675-86, 2002.

BORZACHIELLO, G. AMBROSIO, V. GALATI, P. POGGIALI, A. VENUTI, A. ROPERTO, F. The Pagetoid Variant of Urothelial Carcinoma *In Situ* of Urinary Bladder in a Cow. **Veterinary Pathology**, n. 38, p.113–116, 2001.

BLOCH, N. SUTTON, R. H. BREEN, M. SPRADBROW, P. B. Identification of papillomavirus in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 1, p. 63 – 68, 1997.

CASON, J. et al. Mapping of linear B cell epitopes on capsid proteins of bovine papillomavirus: identification of three external type-restricted epitopes. **Journal of General Virology**, Reading, v.74, n.12, p.2669-2677, 1993

CAMPO, M. S. Papillomas and cancer in cattle. **Cancer Survery**, v. 6, n. 1, p. 39 – 54, 1987.

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

CAMPO, M. S. O'NEIL, B. W. BARRON, R. J. JARRETT, W. F. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 8, p. 1597 – 1601, 1994.

² Foram seguidas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *NBR 6023*, de 2002.

CAMPO, M. S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 92 – 97, 1995.

CAMPO, M. S. Review Bovine Papillomavirus and Cancer. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 3, p. 175 – 188, 1997.

CAMPO, M. S. BENISTON, R. G. CONNOLLY, J. A. GRINDLEY, G. J. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In: Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control, J. Taylor and R.T. Smith, Eds, **International Bracken Group Special Publication**, n. 4, Manchester, UK, p. 116–122, 1999.

CARVALHO, T. PINTO, C. PELETEIRO, M. C. Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, vol.134, p. 336-346. 2006.

CRUZ, G. D. BRACARENSE, A. P. F. R. L. Toxicidade da samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) para a saúde animal e humana. **Revista Semina**, v. 25, p. 249-258, 2004.

DE VILLIERS, E. M. FAUQUET, C. BROKER, T. R. BERNARD, H. U. & ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, 324:17-27, 2004.

DELLMANN, H. D. BROWN, E. M. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pg. 397, 1982.

DURÃO, J. F. C. FERREIRA, M. L. CABRAL, A. PELETEIRO, M. C. AFONSO, F. CORREIA, J. Aspectos Anatomopatológicos e clínicos da Hematúria Enzoótica dos Bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 90, n. 515, p. 132 – 137, 1995.

DYCE, K. M. SACK, W. O. WENSING, C. J. G, Sistema urogenital. In: DYCE, K.M. **Tratado de Anatomia Veterinária**, 3ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ. p. 164-166, 2004.

EVANS, I. A. & MASON, J. Carcinogenic activity of bracken. **Nature**, vol. 208, p.913-914, 1965.

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

GROSS, G. E. BARRASSO, R. Infecção por Papilomavírus Humano – **Atlas Clínico de HPV**. Porto Alegre: Artmed, p. 45, 1999.

HOPKINS, N. C. G. Aetiology of enzootic haematuria. **The Veterinary Record**, London, v.118, p.715-717, 1986.

HIRONO, I. USHIMARU, Y. KATO, K. MORI, H. SASAOKA, I. Carcinogenicity of boiling water extract of bracken, *Pteridium aquilinum*. **Gann**, v.69, p.383-388, 1978.

HIRONO, I. AISO, S. YAMAJI, T. MORI, H. YAMADA, K. NIWA, H. OJIKI, M. WAKAMATSU, K. KIGOSHI, H. NIIYAMA, K. UOSAKI, Y. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. **Gann**. 75:833-836, 1984.

JELÍNEK, F. TACHEZY, R. Cutaneous papillomatosis in cattle. **Journal Comparative Pathology**, 132:70-81, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. edição, São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.

LANCELLOTTI, C. L. P. LEVI, J. E. SILVA MALG. SCHWARZSCHILD, M. NICOLAU, S. M. Diagnóstico laboratorial. In: CARVALHO, J. J. M. OYAKAMA, N. FOCCHI, J. Editores. **I Consenso Brasileiro de HPV-Papilomavírus Humano**. 1ª edição. São Paulo: BG Cultural; p.45-60, 2000.

LUNA, L. G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: MacGraw Hill, 258p. 1968.

MARÇAL, W. S. Samambaia em pasto é veneno. **Folha de Londrina**, Londrina, 24 mar. Folha Rural, n. 718, p. 13, 1990.

MARÇAL, W. S. Braquiária reduz a intoxicação por samambaia. O Estado de São Paulo, **Suplemento Agrícola**, p.24, 1992.

MARÇAL, W. S. GASTE, L. REICHERT NETTO, N. C. GARGANTINI, M. FERNANDES, R. P. MONTEIRO, A. A. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná – Brasil. **Semina**, Londrina, v.22, n.2, p.139-144, 2001.

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

MARÇAL, W. S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná, **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 197-208, 2003.

MARÇAL, W. S. A toxidez da samambaia nos bovinos. 2000. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/bovino-samambaia.htm>>. Acesso em: 14 / 04 / 2010.

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

MOURA, J. W. SANTOS, R. C. S. DAGLI, M. L. Z. D'ANGELINO, J. L. BIRGEL, E.H.; BEÇAK, W. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. **Experientia**, v. 44, n. 9, p. 785 – 788, 1988.

MURPHY, W. M. GRIGNON, D. J. PERLMAN, E. J. Tumors of the urinary bladder and related urinary bladder. In: Tumors of the kidney, bladder and

related structures. 4ª Edição, **American Registry of Pathology**, Washington, DC, p. 241-351, 2004.

NICHOLLS, P. K. STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 101 – 127, 2000.

OGAWA, T. TOMITA, Y. OKADA, M. SHINOZAKI, H. K. KAIHO, I. & SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papilomas and health teat skin. **Journal of General Virology**, 85:2191-2197, 2004.

OTTEN, N. VON TSCHARNER, C. LAZARY, S. ANTCZAK, D. F. GERBER, H. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. **Archives of Virology**, Wien, v.132, n.1-2, p.121 – 131, 1993.

PACHAURI, S. P. SHARMA, U. K. JOSHI, H. C. Note on pathological studies on the urinary bladder tumours of cattle with chronic hematuria. **Indian Journal Animal Scienci**, v. 51, n. 9, p. 898 – 900, 1981.

PEIXOTO, P. V. FRANÇA, T. N. BARROS, C. S. L. TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 23(2):65-81, 2003.

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

POLACK, E. W. Toxicidade da Pteridium aquilinum (L.) Kuhn no Estado do Paraná. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

RADOSTITIS, O. M. GAY, C. C. HINCHCLIFF, K. W. CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.** 10th Edition, London: Saunders, 2007.

TOKARNIA, C. H. DOBEREINER, J. BARROS, S. S. Plantas tóxicas do Brasil. **Região Sul, Folheto.** UFRRJ, MA/RJ. EMBRAPA/RJ, 1979.

TOKARNIA, C. H. DÖBEREINER, J. PEIXOTO, P. V. Plantas de ação radiomimética. In: **Plantas Tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, p.178-187, 2000.

TOKARNIA, C. H. DÖBEREINER, J. PEIXOTO, P. V. Plantas tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Helianthus**, pg. 320, 2000.

THOMSON, J. A. Morphological and genomic diversity in the genus *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). **Annals of Botany** – London 85: 77–99, 2000.

TROTTER, W. R. Is bracken a health hazard? *Lancet* 336 1563–1565, **British Edition.** 1990.

RAMMANY, D. M. Genital urinary tract In: Web Pathology. Disponível em <<http://webpathology.com/index.asp>> acessado em 07/04/2010.

RAJENDRAN, M. P. CHENNAKESAVALU, M. NARAYANA RAO, C. V. VIRARAGHAVAN, K. DAMODARAN, S. Experimental Production of Enzootic Bovine Haematuria with Bracken Fern. **Indian Journal Animal Scienci**, n. 60. pg. 173 – 178, 1983.

ROSEMBERGER, G. HEESCHEN, W. Adlerfarn (*Pteris aquilina*) – die Ursache dessog. Stallrotes der Rinder (Haematuria vesicalis bovis chronica). **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift DTW**, 67(8):201-208, 1960.

SANTOS, R. C. S. LINDSEY, C. J. FERRAZ, O. P. PINTO, J. R. MIRANDOLA, R. S. BENESI, F. J. BIRGEL, E. H. PEREIRA, C. A. B. BEÇAK, W. Bovine

Papillomavirus Transmission and Chromosomal Aberrations: on experimental model. **Journal of General Virology**, v. 79, pt. 9, p. 2127 – 2135, 1998.

SILVIA, 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.

SMITH, B. L. LAUREN, D. R. PRAKASH, A. S. Bracken fern (*Pteridium*): Toxicity in animal and human health. IV Int. Bracken Group Conf. - Bracken fern: toxicity, biology and control. **Manchester**, p.76-85, 1999.

WOSIACKI, S. R. Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico, **Dissertação** (Mestrado em Sanidade Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

WOSIACKI, S. R. BARREIROS, M. A. B. ALFIERI, A. F. ALFIERI, A. A. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological Methods**, v.126, p.215-219, 2005.