



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DE TUMORES EM BOVINOS, OVINOS, EQÜINOS E SUÍNOS

ADRIANO TONY RAMOS
Médico Veterinário

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da UFPEL, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, sob a orientação da Profa Dra Cristina Gevehr Fernandes, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2004



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DE TUMORES EM BOVINOS, OVINOS, EQUÍNOS E SUÍNOS

ADRIANO TONY RAMOS
Médico Veterinário

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da UFPEL, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, sob a orientação da Profa Dra Cristina Gevehr Fernandes, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2004

Prof^a. Cristina G. Fernandes (orientadora)

Prof. Claudio S. L. de Barros

Dra. Ana Lucia Schild

Prof^a. Maria Del Carmen Méndez

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

R176e Ramos, Adriano Tony

Estudo de tumores em bovinos , ovinos, eqüinos e suínos /
Adriano Tony Ramos ; orientador Cristina Gevehr Fernandes . –
Pelotas, 2004. –51 f. : il. Dissertação (Mestrado). Ciências. Fa-
culdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas,. Pelotas,
2004.

1. Neoplasia 2. Bovino 3. Ovino 4. Eqüino 5. Suíno 6.
Histologia 7. Epidemiologia I .Fernandes, Cristina Gevehr (orien-
tador) II .Título.

CDD 636.0896

ÍNDICE

Índice de Tabelas	iv
Índice de Figuras	v
Sumário	vi
Summary	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. TRABALHO 1: Tumores em Animais de Produção: Aspectos Comparativos.....	3
Resumo	4
Abstract	4
Introdução.....	4
Material e Métodos	5
Resultados.....	6
Discussão	8
Agradecimentos.....	10
Referências	10
3. TRABALHO 2: Carcinoma de Células Escamosas em Bovinos, Ovinos e Eqüinos: Estudo de 50 Casos	15
Resumo	16
Abstract	16
Introdução.....	16
Material e Métodos	18
Resultados.....	18
Discussão	20
Agradecimentos.....	22
Referências	22
4. TRABALHO 3: Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística	27
Resumo	28
Abstract	28
Introdução.....	28
Materiais e métodos	29
Resultados.....	30
Discussão	31
Agradecimentos.....	32
Referências	32
ANEXOS.....	41
Anexo 1. Normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	42
Anexo 2. Normas da revista Journal of Comparative Pathology.....	45
Anexo 3. Normas da revista The Veterinary Journal.	47
Anexo 4. Protocolo de realização do exame de PCR.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estudo das Neoplasias em Animais de Produção. Tumores diagnosticados em cada espécie.....	12
Tabela 2. Estudo das Neoplasias em Animais de Produção. Distribuição de casos por raça e sexo. PSI: puro sangue inglês; SRD: sem raça definida; NI: não informados.	13
Tabela 3. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Seqüência de bases usadas no PCR.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estudo das Neoplasias em Animais de Produção. Neoplasias diagnosticadas por faixa etária em cada espécie.....	14
Figura 2. Carcinoma de Células Escamosas em Animais de Produção. Variação da incidência de carcinoma de células escamosas com relação a idade dos animais afetados.....	24
Figura 3. Carcinoma de Células Escamosas em Animais de Produção. Porcentagem de contribuição de cada grau de diferenciação tumoral para o total de casos nas espécies bovina, ovina e eqüina.	25
Figura 4. Carcinoma de Células Escamosas em Animais de Produção. Graus de diferenciação dos carcinomas de células escamosas. A) bem diferenciado, B) diferenciados e C) pobremente diferenciados. D) arranjo em trabéculas e ninhos. E) pérola de queratina (detalhe canto inferior esquerdo). F) aspecto pleomórfico evidente dos tumores pobremente diferenciados	26
Figura 5. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Número de sarcóides recebidos a cada ano no LRD–UFPel.....	34
Figura 6. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Incidência do tumor de acordo com a idade dos animais.....	35
Figura 7. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Gráfico representando a distribuição do tumor quanto ao sexo dos animais. F: fêmeas;M: machos; NI: não informados.....	36
Figura 8. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Representação da distribuição dos tumores nas raças de eqüinos. PSI: puro sangue inglês; SRD: sem raça definida; NI: não informados.....	37
Figura 9. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Distribuição dos sarcóides de acordo com a localização corpórea dos tumores. NI: não informados, MT: múltiplos tumores.	38
Figura 10. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Eletroforese em gel de agarose indicando o produto do PCR do DNA do PVB. Nas colunas A e E, demonstram-se as amostras de papilomas bovinos positivos para o PVB-1 e 2. Nas colunas B, C e D, encontram-se amostras de sarcóide positivos para PVB-1 e 2. Nas colunas G, amostras de papilomas bovinos positivos para o PVB-1. Nas colunas H, I e J, amostras de sarcóide eqüino negativos para PVB-1. Na coluna K, papiloma bovino negativo para p PVB-1. Nas colunas F e L, controle negativo para PVB-1 e PVB-2 respectivamente. Na coluna M marcador com 100 pb.....	39

SUMÁRIO

RAMOS, ADRIANO TONY, Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2004. **Estudo de Tumores em: Bovinos, Ovinos, Eqüinos e Suínos.** Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Gevehr Fernandes.

Foi realizado um estudo retrospectivo da casuística de tumores em animais de produção, recebidos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas no período de 1978 a 2002. Foram recebidos 6.267 materiais dessas espécies, para análise, os quais foram destinados a diferentes laboratórios (patologia, microbiologia, parasitologia e/ou virologia). Foram então estudadas 175 neoplasias distribuídas entre as espécies bovina (98), ovina (09), eqüina (65) e suína (03). As neoplasias foram quantificadas e realizou-se um estudo histológico detalhado das mesmas no sentido de padronizar a classificação (nomenclatura) ou até reclassificá-las. Foram trabalhados dados epidemiológicos, como sexo, idade, raça e localização corpórea dos tumores. A partir do trabalho inicial optou-se por um estudo mais detalhado dos sarcóides eqüinos e dos carcinomas de células escamosas, que foram considerados devido à sua prevalência. Os sarcóides, que totalizavam 28 casos, despertaram o interesse também pelos seus aspectos etiopatogênicos. Nos 50 casos de carcinomas de células escamosas buscou-se enfocar a classificação dos padrões de diferenciação desses tumores.

Termos de indexação: neoplasia, bovino, ovino, eqüino, suíno, epidemiologia, histologia.

SUMMARY

RAMOS, ADRIANO TONY, Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2004. **Study of Tumors in: Cattles, Sheeps, Horses and Pigs.** Adviser: Prof^a. Cristina Gevehr Fernandes, DVM, MSc, PhD.

A thorough study of tumors in farm animals from 1978 to 2002 was performed at the Regional Diagnostic Laboratory of the Veterinary School in Pelotas, Southern Brazil. From 6267 samples, 175 were tumors, 98 were tumors of cattle, 9 were tumors of sheep, 65 were tumors of horses and 3 samples were tumors of swine. The tumors were studied histologically to standardize the classification or even rename them if necessary, considering the introduction of new diagnostic tools, such as immunohistochemistry. Epidemiological data as sex, age, breed and anatomical distribution of the lesions were also considered. From the initial group of tumors, equine sarcoid and squamous cell carcinoma were further analyzed, due to their high incidence. /sarcoids summed up 28 and called our attention because of their etiopathogenetic aspects. Regarding the 50 squamous cell carcinomas we focused on the differentiation patterns

Key-words: tumors, cattle, sheep, equine, swine, epidemiology, histology.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os termos “neoplasia” e “tumor” são sinônimos. A definição literal da palavra neoplasia é crescimento novo, é definida como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais e não está coordenado com ele, persistindo mesmo após cessado o estímulo que induziu a alteração (Cotran et al. XXXX).

O estudo de tumores vem sempre ganhando espaço devido ao aumento do número de casos de neoplasias em humanos e em animais. Em animais domésticos os dados são escassos por haver pouco interesse por parte das autoridades, poucos centros de diagnóstico capacitados e poucos estudos sobre essa doença. Em animais de companhia (cães e gatos) ocorre um interesse maior, devido ao valor afetivo desses animais os quais também são mais longevos que os animais de produção.

A mudança do modo de vida dos animais, pelo fato da domesticação, é um dos principais fatores para o aumento da incidência de tumores, porque este “novo modo de vida” cria situações pré-malignas, que unidas a outros fatores facilitam o surgimento de neoplasias (Misdorp, 1990).

Estudos prospectivos são praticamente impossíveis. Por outro lado, os estudos retrospectivos são de difícil realização, principalmente os que abrangem longos períodos, devido a vários fatores que impedem a obtenção de um resultado não tendencioso, como por exemplo a colheita de dados e de material completo, conservação do material a ser utilizado para novas técnicas e diferenças de padrões de dados e materiais, já que provavelmente foram colhidos por pessoas diferentes ao longo dos anos.

A utilização de uma nomenclatura padrão deve servir ao propósito de facilitar o intercâmbio de informações entre pesquisadores de todo mundo. E no futuro permitir um levantamento de dados global sobre a situação desta enfermidade em animais domésticos

A necessidade de um estudo consistente, e a possibilidade de obtenção de um material expressivo para tal, motivou a realização deste trabalho de dissertação de mestrado que é apresentada na forma de três artigos*, redigidos e apresentados conforme as instruções das respectivas revistas. Os trabalhos abordam aspectos gerais de neoplasias. O primeiro se refere ao estudo da epidemiologia e incidência de tumores em animais de produção tais como bovinos, ovinos, eqüinos e suínos. No segundo, a incidência de carcinomas de células escamosas em bovinos, ovinos e eqüinos foi quantificada e avaliaram-se diferentes aspectos desses tumores. O terceiro relata a incidência de casos de sarcóide em eqüinos, bem como, faz uma análise clínico-patológica e de aspectos da etiologia dos mesmos.

* conforme regulamentação do Programa de Pós-graduação em Veterinária, normatizado de acordo com a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da UFPel.

Esse estudo caracteriza-se por ser inovador em abranger várias espécies e todos os tipos de tumores. Os trabalhos sobre carcinoma de células escamosas e sarcóide, foram realizados devido ao fato de que o número de neoplasias desse tipo se destacou no levantamento da casuística, além disso a etiologia e patogenia não estão esclarecidas nessas espécies e muitas informações novas estão surgindo graças a técnicas de biologia molecular.

Relatos de estudos retrospectivos devem servir para encorajar a dividirmos dados sobre a prevalência de neoplasias nas diferentes espécies animais.

2. TRABALHO 1: TUMORES EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: ASPECTOS COMPARATIVOS

Este trabalho será enviado à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, e está redigido conforme as normas da mesma.

TUMORES EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO: ASPECTOS COMPARATIVOS

Ramos, Adriano Tony; Souza, Arlete Benta; Norte, Diego Mollerke; Fernandes, Cristina Gevehr; Ferreira, João Luiz Montiel.

RESUMO

Com o objetivo realizar um estudo retrospectivo de tumores em animais de produção (bovinos, ovinos, eqüinos e suínos), foi realizada uma revisão nos casos suspeitos de neoplasias recebidos pelo Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas em um período de 24 anos (1978 – 2002). Buscou-se relatar os aspectos epidemiológicos de neoplasias nestas espécies, e realizar uma classificação concisa para padronizar a nomenclatura, seguindo padrões internacionais de classificação histológica de tumores. O estudo foi realizado a partir de um universo 6267 materiais. Obtiveram-se 175 casos de tumores quantitativamente distribuídos entre as espécies bovina (98), ovina (9), eqüina (65) e suína (3). Estes tumores, foram reclassificados segundo padrões internacionais. Dados referentes à epidemiologia dos mesmos foram tabulados para averiguação da sua prevalência quanto a raça, sexo, idade e origem do tumor. Os tumores com maior casuística foram os linfossarcomas nos bovinos, os carcinomas de células escamosas nos bovinos e ovinos e os sarcóides nos eqüinos.

Termos de indexação: tumores, epidemiologia, bovinos, ovinos, eqüinos, suínos.

ABSTRACT

TUMORS IN FARM ANIMALS: COMPARATIVE ASPECTS.

A complete study on all neoplastic lesions in farm animals (cattle, sheep, horses and swine) diagnosed in a 24 years period (1978-2002) at the Regional Diagnostic Laboratory of the Veterinary School in Pelotas, Southern Brazil, was performed. The analysis included the review of epidemiological data and the standardization of classification parameters considering current rules of the international classification of tumors. Six thousand two hundred and sixty seven samples were analyzed. The distribution among the species was: 98 in cattle, 9 in sheep, 65 in horses and 3 in pigs. Prevalence studies over breed, sex, age and anatomical distribution of the tumors were made. Lymphosarcoma in cattle, squamous cell carcinoma in cattle and sheep, and sarcois in horses were the tumors with higher incidence.

Index terms: tumors, epidemiology, cattles, sheeps, horses, pigs.

INTRODUÇÃO

Dados sobre a incidência de tumores em animais de produção são escassos. A freqüência de um tipo pode ser estimada somente em termos gerais, ou pela comparação com a freqüência de outros tumores que ocorrem na mesma espécie (Beveridge & Sobin 1974). Um grande progresso tem ocorrido, nos últimos anos, no entendimento da complexa patogenia das neoplasias em animais domésticos (Cullen et al. 2002).

A classificação de tumores em animais domésticos, baseada em critérios histológicos definidos, é necessária para evitar mal entendidos na troca de informações entre profissionais da área e para a comparação epidemiológica e estudos terapêuticos. A maior parte das classificações é baseada na combinação de critérios histogenéticos (órgãos ou tecidos de origem), critérios histológicos (descrição), e critérios biológicos (benignos ou malignos) (Beveridge & Sobin 1974, Misdorp 1990).

A diferença entre as várias classificações gera confusões em levantamentos epidemiológicos e em relatos de casos. Isto pode comprometer o prognóstico e decisões quanto à conduta clínica, além de dificultar novos estudos. A uniformização da nomenclatura é desejável para que dados epidemiológicos obtidos em regiões diferentes possam ser comparados e medidas terapêuticas ou preventivas possam, também, ser comparadas em diferentes centros de pesquisa. (Chandrassoma & Taylor 1993).

Enfim, devido a dificuldades naturais que muitas vezes inviabilizam o estudo prospectivo de neoplasias, buscam-se estudos retrospectivos detalhados como uma ferramenta importante para o melhor entendimento da biologia dos tumores. Acredita-se que através desses estudos poderão ser obtidos dados importantes acerca do comportamento, epidemiologia e etiologia de diferentes tumores (Misdorp 1990).

Esse trabalho teve, por objetivo a revisão e quantificação acuradas da casuística de neoplasias em bovinos, ovinos, eqüinos e suínos do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da UFPel, no período de 1978 a 2002.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se o levantamento do banco de dados, laminário e coleção de blocos do LRD-UFPel, abrangendo o período de 1978 a 2002. Buscou-se identificar as neoplasias diagnosticadas nas espécies bovina, ovina, eqüina e suína. Os dados foram tabulados e analisados.

A maioria do material analisado estava em blocos de parafina ou em lâminas histológicas. Alguns cortes antigos foram descorados com ácido acético e re-corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). O material que estava em blocos de parafina foi cortado a 5 micrômetros, corado pela HE e examinado por microscopia óptica.

Em alguns casos como adenoma, leiomiossarcoma, schwannoma, sarcoma indiferenciado e plasmocitoma, foram empregadas técnicas de histoquímica (Gomori e Tricrômico de Masson) e de imunoistoquímica, para possibilitar o diagnóstico ou aumentar sua confiabilidade.

Nos procedimentos de imunoistoquímica utilizaram-se como anticorpos primários anti-GFAP, anti-citoqueratinas (AE1/AE3) e anti-vimentina. Realizou-se a inativação da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% e recuperação antigênica com solução de citrato em forno de microondas. O cromógeno utilizado foi o DAB e os cortes foram contra-corados com hematoxilina.

A classificação histológica dos tumores foi baseada na Classificação Histológica Internacional de Tumores de Animais Domésticos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e na classificação utilizada por Moulton (1990).

RESULTADOS

No período 1978 a 2002 foram recebidos 6.267 materiais na forma de cadáveres enviados para necropsia, peças de biopsia ou materiais específicos dessas espécies, para análise no LRD e que foram destinadas a diferentes laboratórios (patologia, microbiologia, parasitologia e/ou virologia). Deste total, 266 casos eram suspeitos de neoplasias. A partir de todos estes materiais foram efetivamente utilizadas neste estudo somente 175 neoplasias, que se encontravam distribuídas durante o período estudado. Dados destes tumores foram resgatados a partir do estudo das fichas correspondentes a cada caso.

Constataram-se então, 98 casos de neoplasias em bovinos que representam 2,22% do total de materiais recebidos dessa espécie(4407), 9 casos em ovinos que representam 1,41% do total de materiais dessa espécie (636), 65 em eqüinos que dos 774 materiais dessa espécie representam 8,39% e 3 em suínos representando 0,6% de 450 materiais recebidos dessa espécie. Os tumores prevalentes, somadas todas as espécies foram os carcinomas de células escamosas, os linfossarcomas e os sarcóides eqüinos. O sistema mais comprometido foi o tegumentar.

Diagnósticos de leiomiossarcoma, diferencial de fibrossarcoma e de sarcomas indiferenciados, foram realizados com auxílio da coloração de tricrômico de Masson e imunoistoquímica para vimentina. Observou-se a coloração vermelha das fibras musculares do leiomiossarcoma no tricrômico e no sarcoma indiferenciado a marcação negativa para vimentina confirmou o diagnóstico.

O diagnóstico de schwannomas foi validado pelos resultados da imunoistoquímica negativos para GFAP e Vimentina.

O diagnóstico de um plasmocitoma foi confirmado com a realização de uma imunoistoquímica com marcação negativa para citoqueratinas (AE1/AE3), diferenciando-o de um carcinoma indiferenciado.

Bovinos. Nos bovinos 42 tumores eram de origem epitelial, 26 de origem hematopoiética, 12 de origem mesenquimal, 9 de origem respiratória, 6 originados no sistema genital, 2 de origem nervosa e 1 de origem endócrina (Tabela 1).

Nos bovinos o sistema mais afetado foi o tegumentar (19). Detectaram-se também tumores no sistema reprodutor masculino (6 tumores penianos). No sistema reprodutor feminino haviam 10 tumores, sendo: 8 na vagina e vulva, 1 no útero e 1 no ovário. Nos linfonodos haviam 8 tumores. No trato digestivo (7) onde 2 localizavam-se no abomaso, 1 na língua, 1 na boca, 1 no esôfago e 1 no abdome. Foram encontrados ainda 6 tumores no olho e 5 no trato respiratório, sendo 4 nos pulmões. Os demais casos (37) estavam distribuídos em diferentes sistemas.

Os tipos de tumores mais prevalentes foram os carcinomas de células escamosas (29), os linfossarcomas (26), papilomas e fibromas (4 cada). Os outros tipos somavam 45 casos. Todos os tumores encontrados estão listados na Tabela 1.

Quanto ao sexo, cerca de 49% dos tumores avaliados acometeram as fêmeas, os machos apresentaram 24% das neoplasias e em 27% não havia informações quanto ao sexo do paciente. As raças mais afetadas foram a Holandesa (21%), a Hereford (9%), Jersey (5%) e Charolesa (4%). Não

foi informada a raça em 38% dos casos, os outros 33% estão distribuídos em outras raças cruzas ou não (Tabela 2).

Quanto à idade foram afetados animais jovens (0 a 2 anos) com 25,50%, animais adultos (3 a 7 anos) com 36,75% e animais senis (acima de 8 anos) com 11,25% e em 30% dos casos a idade não foi informada (Fig. 1).

Ovinos. A maioria dos tumores foram de origem epitelial com 89% dos casos, os outros 11% eram de origem hematopoiética (Tabela 1).

Predominaram os tumores que estavam localizados no sistema tegumentar com 89% dos casos, outros 11% se localizaram no sistema digestivo (língua) e eram do tipo linfossarcoma, outros 11% eram papilomas. Carcinomas de células escamosas na pele totalizavam 77% dos casos (Tabela 1).

A distribuição dos tumores por sexo foi de 33,3 % nas fêmeas, 22,2 % nos machos e 44,5% não informados. As raças mais afetadas foram a Ideal com 33 %, seguida da Corriedale e Ile de France com 22 % e 23% dos casos não foram informados (Tabela 2).

Os animais afetados estavam na faixa dos 4 a 5 anos com 4 casos (adultos de 3 a 7 anos), um ano com 2 casos (jovens de 0 a 2 anos) e 8 anos com 1 caso (senis mais de 7 anos), em 2 casos não foi informada a idade (Fig. 1).

Eqüinos. Os tumores de origem mesenquimal representaram 56,92% (37) do total. Em 15 casos a origem dos tumores foi epitelial, em 7 a origem foi hematopoiética em 3 foram originários das células dos sistema genital, em 2 casos de origem das células nervosas e em 1 caso se originou do sistema urinário.

Os tumores localizados na pele representaram 53% do total. No sistema reprodutor diagnosticou-se 12% dos casos, com 7 casos no trato genital do macho e 1 no ovário, os outros 35% estavam distribuídos sem diferença quantitativa nos demais sistemas.

Nos eqüinos os sarcóides totalizaram 37%, os carcinomas de células escamosas 15%, os papilomas 6%, os demais tipos que totalizavam 42% estão demonstrados na Tabela 1.

A distribuição por sexo foi de 41% nos machos, 31% nas fêmeas, e 28% não informado. A raça mais afetada foi a Crioula com 35%, em seguida os animais sem raça definida com 14%, os Puro Sangue Ingleses com 8%, o Quarto de Milha com 6%, as demais raças com 10% e em 27 % dos casos a raça não foi informada (Tabela 2).

A maioria dos tumores ocorreu em animais de 3 a 7 anos com 40% dos tumores, os animais com menos de 3 anos somaram 10% e os animais de 9 até 25 anos tiveram 26% dos tumores. Em 24% dos casos a idade não foi informada (Fig. 1). Os animais foram divididos em jovens (0 a 5 anos), adultos (6 a 12 anos) e senis (mais de 12 anos).

Suínos. Os tumores se localizaram no sistema digestivo, boca (1) e estômago (1) e no tegumentar (1 no membro anterior). Os tumores foram dos tipos adenoma, fibroma de origem mesenquimal e o melanoma, de origem epitelial respectivamente (Tabela 1).

Os tumores do sistema digestivo ocorreram nas fêmeas (2) e o tumor do sistema tegumentar no macho (1). As raças afetadas foram a Landrace, Duroc e um animal sem raça definida (Tabela 2).

Dois casos ocorreram em animais com 2 anos (adultos de 2 a 5 anos) e um ocorreu em um animal com menos de 1 ano (jovem de 0 a 2 anos) (Fig. 1).

DISCUSSÃO

A falta de entendimento das várias faces de alguns tipos de tumores se dá devido a escassez de relatos de casos, em particular relatos de períodos longos, destes mesmos casos (Dixon & Head 1999).

O comportamento clínico de uma neoplasia pode ser determinado algumas vezes a partir de suas características microscópicas. Porém, uma característica mais útil para a previsão do comportamento biológico de uma neoplasia é seu grau de diferenciação (Jones et al. 2000).

O prognóstico do curso de uma neoplasia varia de paciente para paciente, independentemente se o paciente foi tratado ou não. Isso se deve à existência de um grande número de variantes em cada tipo de tumor e de características específicas da neoplasia, como o estágio clínico e o grau de malignidade histológica (Misdorp 1990). No presente trabalho o curso da neoplasia não foi avaliado devido à falta de informações.

Avaliações retrospectivas são importantes para estabelecer similaridades entre o comportamento de neoplasias de humanos e de várias espécies domésticas, o que possibilita busca de informações sobre a biologia do tumor e em alguns casos pode permitir o estabelecimento de modelos experimentais em animais para o estudo de neoplasias. Como exemplo, verificou-se que em homens e em cães, há estreita relação entre o aparecimento de alguns tipos de tumores e a inalação de poluentes (Baker 1999).

Existe um significativo aumento na frequência de neoplasias com o aumento da idade dos animais (Cullen et al. 2002). A frequência de tumores malignos em bovinos e eqüinos aumenta com a idade (Misdorp 1990). No estudo realizado, a casuística de neoplasias em ovinos e suínos foi relativamente baixa (6,8%) comparados com a casuística em bovinos e eqüinos, concordando com Misdorp (1990) o qual descreve que ovinos e suínos são, normalmente, abatidos antes da meia idade, por isso tem poucas chances de desenvolver tumores.

Além disso, a incidência dos tumores malignos nos bovinos foi maior nos animais adultos e aumentou com a idade, ficando concentrada nos animais adultos, e mesmo nos adultos jovens nos animais com maior idade. Apenas dois animais com idade inferior a 1 ano foram afetados. Outros estudos demonstram que tumores em terneiros são raros e, sua ocorrência em animais jovens indica provável natureza congênita (Misdorp 2002).

Os tumores em bovinos podem ser divididos em: 1) tumores espontâneos do tipo congênito, que ocorrem em fetos e recém nascidos e bezerras muito jovens (menos de 2 meses). 2) tumores espontâneos do tipo juvenil, que ocorrem em bezerras mais velhas (2 a 12 meses); e 3) Tumores iatrogênicos, como os papilomas causados pelo papilomavírus após tatuagem ou descorna ou papilomas da pele e carcinomas de células escamosas após tatuagem com nitrogênio líquido. Esta classificação indica a possível patogenia dos tumores em bezerras, já que os tumores do primeiro grupo, como também os do segundo grupo são congênitos, pois se desenvolvem no estágio embrionário ou imediatamente após este (Misdorp 2002).

Foram observados dois tumores que acometeram animais com menos de 1 ano de idade. O primeiro foi um ependimoma em um terneiro com 2 meses de idade e o segundo era um carcinoma de células escamosas em um animal com 6 meses de idade. De acordo com Misdorp (2002), o ependimoma estaria no grupo dos tumores espontâneos do tipo congênito e o carcinoma de células escamosas nos tipos iatrogênicos. Sanches (2000) descreve um caso de ependimoma em um bovino, fêmea de 7 anos, no sul do Brasil. Os ependimomas são raros em todas as espécies, porém ocorrem com maior frequência em cães, gatos e bovinos (Koestner & Jones 2000). Esses tumores geralmente são de crescimento lento. Em humanos eles representam de 1,2 a 7,8 dos tumores intracraniais, são mais presentes em crianças (11,1%) e a taxa de recorrência pode ser maior que 80% (Pang et al. 2002).

Os linfossarcomas são importantes, especialmente em bovinos, pois sua ocorrência está relacionada com as dimensões do rebanho, o que sugere haver uma predisposição genética para o desenvolvimento desses tumores. A forma mais comum de linfossarcoma surge endemicamente em bovinos adultos com mais de 2 anos. Esta forma atinge diversos sistemas do organismo e normalmente esta associada à infecção pelo vírus da leucemia bovina (Carlson 1993). Somente 1% a 10% desenvolvem a forma tumoral da leucose (Riet-Correa et al. 2001).

Em bovinos o linfoma é mais comum em áreas de predomínio de produção de leite. Não há predisposição por raça ou sexo. Diferenças de incidência entre as raças de carne e de leite se devem à maior diferença na média de idade e fatores de manejo (Jacobs et al. 2002). Neste levantamento 46,2% dos tumores ocorreram em animais de raças leiteiras e 23% em animais de raças de carne e em 30,8% dos casos a raça não foi informada. Quanto ao sexo, 15 casos ocorreram em fêmeas, 4 em machos e 7 não foram informados sobre o sexo dos animais.

O risco da ocorrência de linfossarcomas aumenta com a idade, ocorrem dois picos de incidência, o primeiro em animais até 1 ano e o segundo em animais de 5 a 8 anos (Jacobs et al. 2002). Na casuística encontrada os linfossarcomas se distribuíram mais expressivamente em animais de 5 a 7 anos com 10 casos em animais dessas idades.

Sarcóides são os tumores de pele mais comuns dos eqüinos e ocorrem em cavalos de qualquer idade. A maioria dos casos ocorre em animais com menos de 4 anos de idade (Goldschmidt & Hendrick 2002). Neste estudo observou-se que a incidência maior ocorre de 3 aos 7 anos de idade. Esta foi a neoplasia mais prevalente em eqüinos, com 37% dos diagnósticos.

Embora a raça Crioula tenha sido a mais afetada acredita-se que isso se deva ao fato de que esta é raça mais presente na região, pois não há relato de predisposição racial para qualquer neoplasia.

Dixon & Head (1999) descrevem, em um estudo retrospectivo de tumores da região nasal e paranasal, que a idade média de animais com tumores de origem glandular ou epitelial foi de 14 anos, e para os tumores de origem fibro-óssea ou óssea foi de 4 anos, isto demonstra uma diferença de prevalência quanto à idade em função da origem das células tumorais.

Em suínos as neoplasias são muito raras, pois uma grande proporção da população é abatida antes de atingir a "idade de câncer". As neoplasias mais frequentes são aquelas que afetam suínos jovens (Sobestiansky et al. 1999). Neste estudo foram encontradas mais neoplasias em animais

adultos (2 com 2 anos de idade). Os animais eram provavelmente reprodutores, os quais são abatidos com idade mais avançada.

Existem tendências hereditárias de suínos miniaturas (Sinclair e Hormel) e suínos da raça Duroc a desenvolverem melanomas (Cullen et al. 2002). O melanoma detectado neste estudo afetou um suíno, sem raça definida com 6 meses de idade, localizando-se no membro anterior na região da escápula. Esses tumores ocorrem com maior frequência no flanco e na região posterior do corpo (Sobestiansky et al. 1999).

Quanto ao sexo não foi possível definir preferência devido à existência de muitos casos não informados, o que acarretam a uma conclusão tendenciosa.

O estudo de neoplasias em animais de produção é importante para determinar perdas econômicas.

Com base em levantamentos da casuística de uma determinada região é possível identificar o que realmente é problema, direcionando assim novos estudos para a patogenia, etiologia e tratamento. Quando se conhece um determinado tumor, pode-se encontrar soluções para os mesmos, como controle e profilaxia através da escolha de uma determinada raça, da escolha de reprodutores, quando houver predisposição genética ou mudanças no manejo.

Em suínos e ovinos os tumores são pouco importantes, somente 1,41% e 0,6% dos materiais recebidos em ovinos e suínos, respectivamente, eram neoplasias. Embora tenham ocorrido vários casos de CCE em ovinos. Em bovinos, onde 2,22% dos materiais recebidos eram neoplasias, o CCE e os linfossarcomas foram importantes e em eqüinos, onde 8,39% dos materiais eram neoplasias, devem ser levados em consideração os sarcóides.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos de laboratório João Nunes pela confecção das lâminas de HE e Rosária Azambuja pela realização de técnica de imunoistoquímica do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Baker, G. J. 1999. Equine Nasal and Paranasal Tumours. *The Veterinary Journal* 157: 220-221
- Beveridge, W. I. B. & Sobin, L. H. 1974. Introduction. In: *Bulletin of the World Health Organization – International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*; Vol. 50 No. 1-2; p. 1-8.
- Carlson, G. P. 1993. Moléstias do Sistema Hematopoiético e Hemolinfático. In: Smith, B. P. *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*; Ed. Manole p. 1061 – 1118.
- Dixon, P. M. & Head, K. W. 1999. Equine Nasal and Paranasal Sinus Tumours: Part 2: A contribution of 28 Case Reports. *The Veterinary Journal* 157: 279-294.
- Jones, T. C., Hunt, R. D. & King, N. W. 2000. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. p. 87-118. In: Jones, T. C., Hunt, R. D. & King, N. W. *Patologia Veterinarian*. 6ª ed. Editora Manole, São Paulo. 1415 p.

- Jacobs, R. M., Messick, J. B. & Valli, V. E. 2002. Tumors of the Hemolymphatic System, p.119-198. In: Meuten, D. J. Tumors in Domestic Animals; Iowa State Press, p. 788.
- Koestner, A. & Jones, T. C. 2000. Sistema Nervoso. p. 1281-1320. In: Jones, T. C., Hunt, R. D. & King, N. W. Patologia Veterinária. 6ª ed. Editora Manole, São Paulo. 1415 p.
- Chandrassoma, P. & Taylor, C.R. 1993. Patologia Básica; Editora Prentice/Hall do Brasil,. 911 p.
- Cullen, J. M., Page, R. & Misdorp, W. 2002. An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis and Management. p. 3-44 In: Meuten, D. J. Tumors in Domestic Animals; Iowa State Press, p. 788.
- Goldschmidt, M. H. & Hendrick, M. J. 2002. Tumors of the Skin and Soft Tissues. p. 45-118 In: Meuten, D. J. Tumors in Domestic Animals; Iowa State Press, p. 788.
- Moulton, J. E. 1990. Tumors in Domestic Animals; University of California Press 4th ed., p. 672.
- Misdorp, W. 1990. General Considerations. p.1-22 In: Moulton, J. E.; Tumors in Domestic Animals; University of California Press 4th ed., p. 672.
- Misdorp, W. 2002. Tumours in Calves: Comparative Aspects. J. Comp. Path. 127: 96-105
- Pang, K., Ho, W. W. & Wong, C. 2002. Supratentorial Extraventricular Ependymoma: Literature Review and Case Report. Ann. Coll. Surg. H. K. 6: 22-24.
- Braga, F. M. & van der Laan, C. W Riet-Correa, F., Schild, A. L., Méndez, M. C. & Lemos, R. A. A.
- Sanches, A. W. D. 2000. Doenças do Sistema Nervoso Central em Bovinos. Dissertação de mestrado UFSM, RS, Brasil. p. 31.
- Sobestiansky, J.; Barcellos, D.; Mores, N.; Carvalho, L. F.; Oliveira, S. 1999. Clínica e Patologia Suína, Ed. Art 3 Impressos Especiais, Goiânia GO, p. 464.

Tabela 1. Estudo das Neoplasias em Animais de Produção. Tumores diagnosticados em cada espécie.

Origem	Tipos de Tumores	Bovinos	Equinos	Ovinos	Suínos	Total
Endócrino	Carcinoma da córtex da adrenal	1	-	-	-	1
Epitelial	Carcinoma de células escamosas	30	9	7	-	46
	Melanoma	6	-	-	1	7
	Papiloma	5	6	1	-	12
	Tumor misto de glând. sud. apócrina	1	-	-	-	1
Genital	Fibropapiloma *	4	1	-	-	5
	Tumor de células da granulosa	2	2	-	-	4
Hematopoiético	Linfossarcoma	26	2	1	-	29
	Mastocitoma	-	3	-	-	3
	Plasmocitoma	-	2	-	-	2
Mesenquimal	Fibroma ++	6	4	-	1	11
	Fibrossarcoma	2	-	-	-	2
	Hemangioma	-	1	-	-	1
	Hemangiossarcoma	-	2	-	-	2
	Leiomioma	2	-	-	-	2
	Leiomiossarcoma	1	-	-	-	1
	Lipoma	-	1	-	-	1
	Lipossarcoma mixóide	1	-	-	-	1
	Sarcóide eqüino	-	28	-	-	28
	Sarcoma indiferenciado	-	1	-	-	1
	Nervoso	Ependimoma	1	-	-	-
Schwanoma		1	2	-	-	3
Respiratório	Adenocarcinoma+	5	-	-	1	6
	Carcinoma	2	-	-	-	2
	Carcinoma broncogênico	1	-	-	-	1
	Carcinoma epidermóide pulmonar	1	-	-	-	1
Urinário	Nefroblastoma	-	1	-	-	1
Total		98	65	9	3	175

+: nos bovinos no pulmão e no suíno no estômago.

++: incluídos 1 fibroma mole e 1 fibroma durum.

*: um caso em bovino o fibropapiloma era transmissível.

Tabela 2. Estudo das Neoplasias em Animais de Produção. Distribuição de casos por raça e sexo.

Espécie	Raça	Sexo			Total
		F	M	NI	
Bovino	Aberdeen Angus	1	1	-	2
	Charoles	1	3	-	4
	Cruza	3	5	3	11
	Devon	1	-	-	1
	Hereford	7	3	-	10
	Holandes	21	-	2	23
	Ibagé	1	1	1	3
	Jersey	4	-	1	5
	Limousin	1	-	-	1
	Shorthorn	-	1	-	1
	NI	9	11	17	37
Eqüino	Apalloosa	-	2	-	2
	Árabe	-	-	1	1
	Crioulo	8	12	3	23
	Percheron	-	-	1	1
	Porter	-	1	-	1
	PSI	1	4	-	5
	Quarto de Milha	4	-	-	4
	SRD	3	6	1	10
	NI	4	2	12	18
	Ovino	Corriedale	-	-	2
Ideal		1	1	1	3
Ile de France		2	-	-	2
NI		-	1	1	2
Suíno	Duroc	1	-	-	1
	Landrace	1	-	-	1
	SRD	-	1	-	1
Total		74	55	46	175

PSI: puro sangue inglês.

SRD: sem raça definida.

NI: não informados.

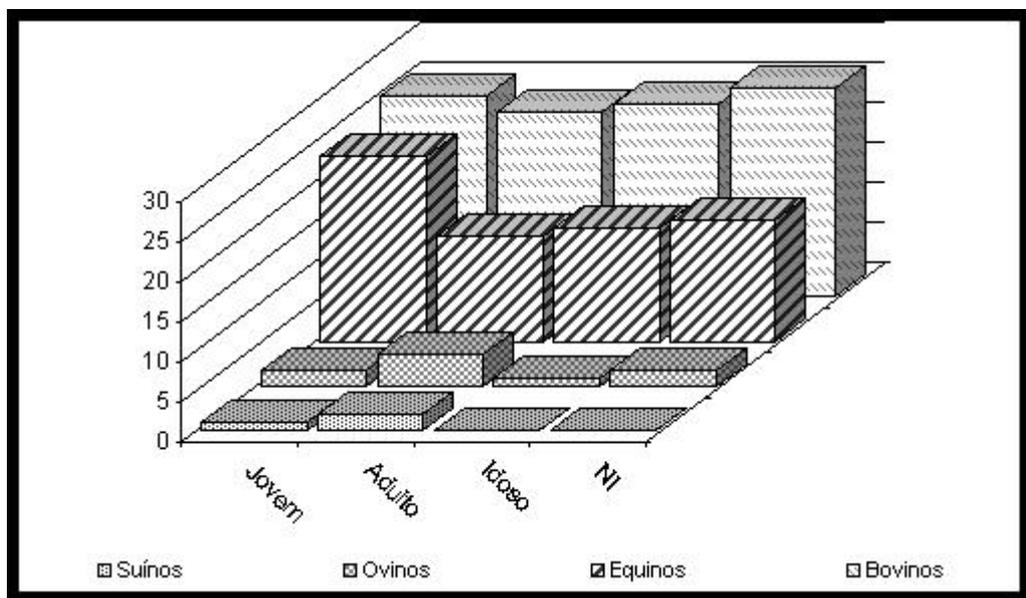


Figura 1. Estudo das Neoplasias em Animais de Produção. Neoplasias diagnosticadas por faixa etária em cada espécie.

3. TRABALHO 2: CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM BOVINOS, OVINOS E EQÜINOS: ESTUDO DE 50 CASOS

Este trabalho será enviado à revista **Journal of Comparative Pathology**, e está redigido conforme as normas da mesma.

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM BOVINOS, OVINOS E EQÜINOS: ESTUDO DE 50 CASOS

Ramos, Adriano Tony; Norte, Diego Mollerke; Elias, Fabiana; Fernandes, Cristina Gevehr.

RESUMO

Realizou-se um estudo retrospectivo dos casos de carcinoma de células escamosas em animais de produção (bovinos, ovinos e eqüinos). O material foi obtido nos arquivos do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Os 50 tumores do tipo carcinoma de células escamosas estavam distribuídos nas diferentes espécies (bovina: 30; ovina: 7 e eqüina: 13). Dados como raça, sexo, idade e localização corpórea, dentro de cada espécie, foram tabulados. Classificaram-se os tumores segundo seu grau de malignidade em bem diferenciados, diferenciados e pobremente diferenciados, através da avaliação histológica dos mesmos.

Termos de indexação: tumores, animais de produção, epidemiologia, carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN CATTLE, SHEEP AND HORSE. STUDY OF 50 CASES

A retrospective study of squamous cell carcinoma in farm animals was made. The samples were obtained at the Regional Diagnostic Laboratory of the Veterinary School in Pelotas, Southern Brazil. The distribution of the neoplasm among the species was as follows: 30 in cattle, 7 in sheep and 13 in horses. Epidemiological data as breed, sex age, and anatomical location of the tumors were statistically analyzed. The histological classification of the tumors graded from well differentiated to poorly differentiated.

Index terms: tumors, farm animals, epidemiology, squamous cell carcinomas.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor maligno dos queratinócitos. É também conhecido por carcinoma de células espinhosas, carcinoma espinocelular ou carcinoma epidermóide (Fernandes, 2001). Existem muitos fatores que estão associados ao desenvolvimento de carcinomas de células escamosas, incluindo a exposição prolongada a luz ultravioleta, falta de pigmento na epiderme, perda de pêlos ou cobertura de pêlos muito esparsa nos locais afetados (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

São neoplasias comuns em todas as espécies e podem ocorrer em animais jovens, mas a incidência aumenta com a idade (Fernandes, 2001; Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Quando os bovinos são expostos à radiação solar, em grandes altitudes há um aumento na incidência desse tipo de tumor. Animais sem pigmentação periocular, incluindo o Hereford e Simmental também apresentam maior susceptibilidade. As raças de eqüinos com maior risco são o

Belga, Clydesdale, Shire e Appaloosa. Não foi notada predisposição sexual (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

O tumor pode ocorrer em qualquer lugar do corpo nas diferentes espécies (Fernandes, 2001; Goldschmidt & Hendrick, 2002). Nos eqüinos e bovinos os carcinomas de células escamosas ocorrem primariamente nas junções muco-cutâneas, particularmente nas pálpebras. Nas ovelhas as orelhas são os sítios mais afetados (Evans, 1993).

A dermatose solar é a primeira alteração significativa nas junções muco-cutâneas ou na pele que está com pouco pêlo e sem pigmentação. Eritema, edema, e descamação são seguidos por formação de crostas e adelgaçamento da epiderme com subsequente ulceração. Quando o tumor começa a invadir a derme, a lesão fica mais endurecida. Com o tempo as úlceras aumentam de tamanho e profundidade, e infecções bacterianas secundárias resultam em um exsudato purulento na superfície da massa tumoral (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

A queratose actínica ou carcinoma de células escamosas exibe uma hiperplasia dérmica, hiperqueratose, paraqueratose, acantose, aumento da rede dérmica e displasia dos queratinócitos (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Os tumores podem ser de dois tipos: produtivos ou erosivos. Os produtivos possuem aspecto papilar de tamanho variável com aspecto de couve-flor, normalmente com superfície ulcerada e sangram com facilidade. Os erosivos são os mais comuns e são formados por úlceras cobertas com crostas, que se tornam profundas e formam crateras (Fernandes, 2001).

Na histologia observa-se que a lesão se estende através da derme estando ou não associada à proliferação ou espessamento da epiderme, formando ilhas, cordas e trabéculas de células epiteliais neoplásicas que demonstram um grau variável de diferenciação escamosa. Queratina tem sido observada no citoplasma, assim como um material fibrilar eosinofílico, produzido pelas células neoplásicas. Este material é totalmente variável. Os tumores bem diferenciados são compostos por células escamosas organizadas em cordas ou digitais com centros queratinizados (Weiss & Freze, 1974). Existe a formação de pérolas de queratina distintas (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Weiss & Freze, 1974) e ocorre também queratinização de células únicas (Weiss & Freze, 1974). Desmossomos são fáceis de achar e úteis para distinguir o carcinoma de células escamosas do tumor de células basais. É comum infiltrado inflamatório na periferia (Weiss & Freze, 1974).

Nos tumores diferenciados existe queratinização de células únicas, porém pérolas de queratina e desmossomos são menos comuns (Weiss & Freze, 1974). É possível também reconhecer os desmossomos, principalmente em áreas em que o edema intercelular permite que isto seja identificado mais facilmente (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Nos tumores pobremente diferenciados é difícil de reconhecer entre as células tumorais as células escamosas (Weiss & Freze, 1974), e somente algumas células tem material fibrilar eosinofílico intracitoplasmático (Goldschmidt & Hendrick, 2002). A queratinização é rara e quando presente é restrita a células individuais e acompanhada de cariorexia e não de picnose como nos bem diferenciados (Weiss & Freze, 1974). Células tumorais individuais são grandes e ovóides. Freqüentemente o núcleo vesicular contém um único nucléolo central e proeminente, o citoplasma

abundante varia do eosinofílico pálido ao brilhante e as bordas das células são distinguíveis (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Mitoses são comuns em todos os tipos de CCE porém são mais freqüentes e mais atípicas no tipo pobremente diferenciado (Weiss & Frese, 1974).

Em humanos alguns fatores para estabelecer o prognóstico incluem o tamanho do tumor, profundidade da invasão, diferenciação histológica, localização anatômica, invasão perineural, crescimento rápido, histórico de tratamentos anteriores, imunossupressão do hospedeiro e fatores etiológicos como cicatriz de queimaduras, radiação e ulceração crônica (Rinker et al., 2001).

A caracterização do grau de malignidade e do padrão de diferenciação dos CCE permite modificações na conduta clínica e prognóstico dos mesmos, além de propiciar novos estudos que possibilitem o maior entendimento da biologia e etiopatogenia dos mesmos. Em humanos o CCE é facilmente tratável e tem freqüentes recidivas e metástases, o que conduz para uma significativa morbidade e mortalidade. Assim sendo, é importante identificar os tipos mais agressivos e que requerem maior acompanhamento e possivelmente tratamentos adjuvantes (Rinker et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi de realizar um estudo retrospectivo de carcinomas epidermóides em bovinos, ovinos e eqüinos na região sul do Rio Grande do Sul, avaliando-se dados de prevalência desses tumores nessas espécies, bem como os padrões de diferenciação predominantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os tumores foram obtidos através de levantamento no banco de dados, laminário e coleção de blocos do LRD - UFPel e abrangeu o período de 1978 a 2002. Objetivou-se estudar os tumores do tipo carcinoma de células escamosas nas espécies bovina, ovina e eqüina.

O material analisado estava em blocos de parafina ou em lâminas histológicas. Alguns cortes antigos foram descorados com ácido acético e recorados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). O material que estava em blocos de parafina foi cortado, corado pelo HE e examinado por microscopia óptica.

Realizou-se a quantificação da incidência desses tumores nas diferentes espécies, tabulando dados como idade, sexo e raça dos animais afetados e classificando os tumores diagnosticados como CCE segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde e Moulton (1990) em pobremente diferenciados, diferenciados e bem diferenciados.

RESULTADOS

De um total de 175 casos de neoplasias diagnosticadas através de um levantamento prévio da casuística do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, no período de 1978 a 2002, foram obtidos 50 carcinomas de células escamosas. Deste total, 30 tumores em bovinos, 7 em ovinos e 13 em eqüinos. Sendo que os CCE representam 30,6% do total de tumores em bovinos, 77,7% do total de tumores diagnosticados em ovinos e 20% do total de tumores diagnosticados e eqüinos neste período.

Bovinos

Nos bovinos 63,33% ocorreram em fêmeas, 10% em machos e 26,67% dos casos o sexo não foi informado.

As raças bovinas afetadas foram Holandês (11), Hereford (6), Cruza (3), Charolês (1), Jersey (1) e em 8 bovinos não havia informação sobre a raça.

Nesta espécie a distribuição etária foi de 8 tumores em jovens (0–2 anos), 8 tumores em adultos (3–7 anos) e 7 em animais senis (acima de 7anos).O restante não foi informado (7) (Fig. 3).

Ocorreram com maior freqüência tumores localizados na região da vulva e na região dos olhos, ambos com 7 casos. Logo em seguida apresentaram-se os tumores na região dos linfonodos com 5 casos. Os tumores restantes estavam localizados no pulmão (1), esôfago (1) e cabeça (1). Do total 8 casos não foram informados sua localização. Os tumores encontrados nos linfonodos e pulmões provavelmente se tratavam de metástases de tumores primários, os quais não foram detectados pois a maioria desses materiais não procedia de necropsia e sim de fragmentos de órgãos enviados ao LRD.Em 8 casos a localização do tumor não foi informada.

O tipo mais prevalente foi o diferenciado, com 43,75% do total; 31,25% eram do tipo indiferenciado e 25% eram do tipo bem diferenciado (Fig. 4).

Ovinos

Nos ovinos 42,86% dos tumores localizavam-se nas fêmeas, 14,29% nos machos e em 42,86% dos tumores não foram informados quanto ao sexo dos pacientes.

A maioria dos casos ocorreram em animais da raça Ideal (3), seguidos dos animais da raça Ile de france (2) e Corriedale (1). Em um caso a raça não foi informada.

Nesta espécie 2 tumores estavam em animais jovens (0 - 2 anos), 3 em animais adultos (3 – 7 anos) e 1 em um animal senil (acima de 7 anos) (Fig. 3).

A incidência maior foi na região da cabeça (narinas e orelhas) com 4 casos. Os outros 3 casos localizavam-se na vulva (1), no olho (1) e um animal possuía tumores generalizados.

Predominaram os carcinomas de células escamosas do tipo indiferenciado com 66,67% dos casos e 33,33% do tipo bem diferenciado. Não houve relato de casos de carcinomas do tipo diferenciado (Fig. 4).

Eqüinos

Nos eqüinos a maioria dos tumores do tipo carcinoma de células escamosas ocorreram nos machos (66,67%), seguidos das fêmeas (25,00%) e os que o sexo do paciente não foi informado (8,33%).

Os eqüinos sem raça definida foram os mais afetados com 3 casos, seguidos das raças Crioula e Quarto de milha com 2 casos cada, e das raças Apaloosa, Porter com 1 caso cada. Em 4 casos a raça não foi informada.

Em 6 casos os tumores estavam em animais adultos (6–12 anos) e 5 tumores em animais senis (acima de 12 anos). Em 2 casos a idade não foi informada (Fig. 3).

O maior número de tumores ocorreu na região da genitália dos machos com 6 casos. Dos demais, 2 casos se localizavam no membro anterior, 2 outros na região dos olhos e em 3 casos a localização não foi informada.

Os carcinomas foram na maioria do tipo bem diferenciado, representando 55,56% do total, 33,33% foram bem diferenciados e 11,11% do tipo indiferenciado (Fig. 4).

DISCUSSÃO

O carcinoma de células escamosas é o segundo tipo de câncer de pele mais comum em humanos (Rinker et al., 2001). O CCE ocorre em todas as espécies domésticas (Evans, 1993), e é comum nos eqüinos, bovinos, felinos e caninos, relativamente incomum nos ovinos, e raro nos caprinos e suínos (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Constitui-se no tumor ocular mais comum no bovino, e o segundo tumor mais comum identificado no cavalo. Na casuística encontrada foi mais comum nos ovinos com 77,7% de todas as neoplasias diagnosticadas no período.

As lesões precursoras contêm células descamativas, queratinizadas anucleadas e células nas camadas mais profundas com núcleos aumentados e aglomerações grosseiras de cromatina. Nas biopsias a membrana basal se encontra íntegra. Nas lesões malignas encontramos células pleomórficas com formas bizarras, grandes núcleos hiper cromáticos com grandes aglomerados de cromatina e nucléolos proeminentes. Normalmente encontra-se a formação de pérolas de queratina (Moore, 1993).

Existe uma expressiva relação na distribuição corpórea dos carcinomas de células escamosas e espécie animal afetada. Nos eqüinos, esses tumores freqüentemente ocorrem no pênis e bainha prepucial de animais castrados e garanhões idosos. Ocorrem também nos lábios, focinho e orelhas dos cavalos (Evans, 1993). Neste estudo, 6 tumores foram encontrados nos órgãos reprodutores de machos, dos quais 4 eram do tipo diferenciado e 2 eram do tipo bem diferenciado. A idade média dos animais portadores de carcinomas de células escamosas no órgão reprodutor ficou em 16 anos.

Nos animais o CCE ocular é a neoplasia economicamente mais importante para os bovinos e em termos de prevalência é o mais importante para os eqüinos (Moore, 1993). Nesse levantamento 23,33% dos tumores em bovinos se localizavam nos olhos,

O carcinoma de células escamosas do olho de bovinos é mais comum em animais mais idosos, com a prevalência etária de pico ficando em torno dos 7–8 anos (Moore, 1993). No presente estudo os tumores de olho foram encontrados em animais de 7–10 anos de idade sendo a maioria dos casos na raça Hereford (4 de 7 casos).

A prevalência de carcinomas epidermóides oculares incluindo tumores não invasivos, envolvendo rebanhos Hereford em locais com muita iluminação solar varia de 20 a 40 por cento, dos quais 10% terão alto grau de malignidade (Moore 1993). Em apenas um dos casos avaliados neste relato o tumor era pobremente diferenciado (25%). Em 57% dos casos os animais eram da raça Hereford, porcentagem maior que a observada por Moore (1993). Em dois casos os animais pertenciam a raça Holandesa. As raças de leite, e especialmente as fêmeas destas raças, devem ter maior susceptibilidade a esses tumores, provavelmente por possuírem a áreas de pelagem branca e também uma longevidade maior que as raças de corte.

O CCE é descrito por Evans (1993) como o tumor mais comum da orelha dos ovinos. Neste estudo retrospectivo o carcinoma foi encontrado em 6 animais na região da cabeça e em dois destes

casos a neoplasia se localizava na orelha (um generalizado). A região é desprovida de lã e nela os tumores tem localização muito freqüente (Dodd, 1923; Lloyd, 1961).

Esta neoplasia ocorre também no períneo, focinho e pálpebra (Davis & Shorten, 1952; Monlux et al., 1956; Lloyd, 1961, Vandergraff, 1976). Dos casos de tumores localizados na cabeça, 4 estavam situados nas narinas dos animais (57%). Nos garanhões, a neoplasia mais comum na genitália é o carcinoma de células escamosas. Geralmente esses tumores são bem diferenciados e circundados por eosinófilos (Youngquist, 1993). Na casuística avaliada somente 33% dos tumores da genitália em eqüinos foram bem diferenciados, e 67% foram do tipo diferenciados.

O carcinoma de células escamosas ocular tem sido descrito em uma grande variedade de raças bovinas. Na raça Hereford o diagnóstico é mais freqüente, devido a raça ser comumente empregada na criação extensiva e por possuir uma característica vigorosa a apresentar a cara branca, portanto a seleção para pele periocular pigmentada reduz a ocorrência desse tumor (Moore, 1993).

Alguns subtipos histológicos, são descritos em humanos: queratoacantoma, acantolítico, células fusiformes, verrucoso, células claras, papilar e anel de sinete, pigmentados e carcinoma de células escamosas desmoplásico (Rinker et al., 2001). Nesse estudo os subtipos não foram avaliados por falta de informações, principalmente a respeito da macroscopia.

Em ovinos, Riet-Correa et al. (1981) descrevem tumores do tipo bem diferenciado no focinho, orelha e lábio inferior. No olho foram descritos casos de tumores do tipo bem diferenciado e um tumor do tipo pouco diferenciado. Os tipos de tumores encontrados em ovinos foram os indiferenciados (66,67%) e os bem diferenciados (33,33%) (Fig. 5). Assim sendo, verificou-se que não há relação que indique a prevalência de um determinado grau de diferenciação escamosa em uma determinada espécie.

Não se observou também qualquer relação de um determinado grau de diferenciação do tumor com a idade dos animais.

O desenvolvimento dos CCE está ligado à exposição à radiação solar, entretanto, outros fatores predisponentes podem estar envolvidos (Fernandes, 2001).

A etiologia provavelmente seja multifatorial, com fatores genéticos, ambientais e virais comprovados ou suspeitos (Moore, 1993). A causa da neoplasia seria a ação das radiações solares sobre áreas de pele despigmentada e desprovida de lã (Lloyd 1961; Vandergraff 1976)

Marder et al. (2000) relata a possibilidade do surgimento de um carcinoma de células escamosas após a marcação a fogo de um bizão americano. Essa relação é citada em bovinos após marcações a frio ou com nitrogênio líquido (Yeruhan et al., 1996, Misdorp, 2002) ou calor (Yeruhan et al., 1996). Moore (1993) relata a possibilidade de que o carcinoma epidermóide ocular bovino possa ser induzido por agentes virais como o vírus do papiloma.

Um caso dos casos de carcinoma de células escamosas detectado nesse estudo ocorreu no esôfago de um bovino proveniente de uma região onde existe samambaia (*Pteridium aquilinum*). Em animais que ingerem samambaia o papiloma vírus bovino tipo 4, induz a formação de papilomas no trato gastrointestinal superior, que tem grandes chances de se transformar em câncer (Campo, 2002).

O papiloma vírus bovino tipo 4 infecta mucosa do trato gastrointestinal superior, rapidamente transforma as proteínas e gera papilomas. Essas são lesões hiper proliferativas benignas, em um animal saudável e imunocompetente regredem através de uma resposta imune celular. Nos bovinos que comem a samambaia, o sistema imune está cronicamente imunossuprimido por substâncias presentes na planta não havendo resposta efetiva. A rápida divisão das células do papiloma inicia a divisão da camada abaixo da pele que resulta em uma transformação total em carcinoma escamoso (Campo, 2002).

Para Moore (1993) o tumor se desenvolve, em qualquer espécie, através de uma série de estágios pré-malignos (placas hiperplásicas e papilomas) progredindo ao longo de meses e anos até carcinoma *in situ* e até um carcinoma epidermóide invasivo.

AGRADECIMENTOS

Ao técnico do laboratório de histopatologia João Nunes pela confecção das lâminas para este trabalho e ao Méd. Vet. MSc. João Luiz Montiel Ferreira pelo auxílio na coleta de dados.

REFERÊNCIAS

- Campo M. S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research* **89**, 249-261.
- Davis C. L. & Shorten H. L. (1952). Carcinoma of the eye of sheep. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **121**, 20 – 24.
- Dodd S. (1923). Cancer of the ear of sheep. *Journal of Comparative Pathology*, **36**, 231-242.
- Evans A. G. (1993). Moléstias da Pele/Dermatopatias In: *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*, 1ª ed., B. P. Smith, Eds, Ed Manole. São Paulo, p. 1249 – 1286.
- Fernandes C.G. (2001). Neoplasias em Ruminantes e Eqüinos.. In: *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*, 2ª ed., F. Riet-Correa, A. L. Schild, M. C. Méndez & R. A. A. Lemos, Eds, Vol: 2 p. 538–544.
- Goldschmidt M. H. & Hendrick M. J. (2002). Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: *Tumors in Domestic Animals* 4th ed., D. J. Meuten, Iowa State Press, p. 45–118.
- Lloyd L. C. 1961. Epithelial tumours of the skin of sheep. *British Journal of Cancer*, **15**, 780–789.
- Marder M. Z., Cummings D. W., Zegarelli D. J., Neuschaefer K. & Pulse C. L. (2000). Squamous Cell Carcinoma in an American Bison (*Bison bison bison*). *Veterinary Pathology*, **37**, 343–345.
- Misdorp W. (2002). Tumours in Calves: Comparative Aspects. *Journal of Comparative Pathology*, **127**, 96–105.
- Monlux A. W., Anderson W. A. & Davis C. L. (1956). A survey of tumours occurring in cattle, sheep and swine. *American Journal of Veterinary Research*, **17**, 646–677.
- Moore C. P. (1993). Moléstias do Olho In: *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*, 1ª ed., B. P. Smith, Ed, Editora Manole. São Paulo, p. 1189–1248.
- Moulton J. E. (1990). *Tumors in Domestic Animals*; 3rd ed., University of California Press, p. 672.
- Riet-Correa F., Cassal A. B., Scarsi R. M., Schild A. L. & Méndez M. C. (1981). Carcinomas

- epidermóides em ovinos em um estabelecimento do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **1**(2), 65–68.
- Rinker M. H., Fenske A. N., Scalf L. A. & Glass L. F. (2001). Histologic variants of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Control*, **8**(4), 354–363.
- Vandergraff R. (1976). Squamous cell carcinoma of the vulva in Merino sheep. *Australian Veterinary Journal*, **52**, 21–23.
- Weiss E. & Freze K. (1974). Tumours of the Skin. In: *Bulletin of the World Health Organization—International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*; Vol. 50 No. 1-2; p. 79–100.
- Yeruhan I., Perl S. & Nyska A. (1996). Skin tumors in cattle and sheep after freeze- or heat-branding. *Journal of Comparative Pathology*, **114**, 101–105.
- Youngquist R. S. (1993). Moléstias do Sistema Reprodutor In: *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*; 1ª ed., B. P. Smith, Ed, Editora Manole. São Paulo, p. 1351–1425.

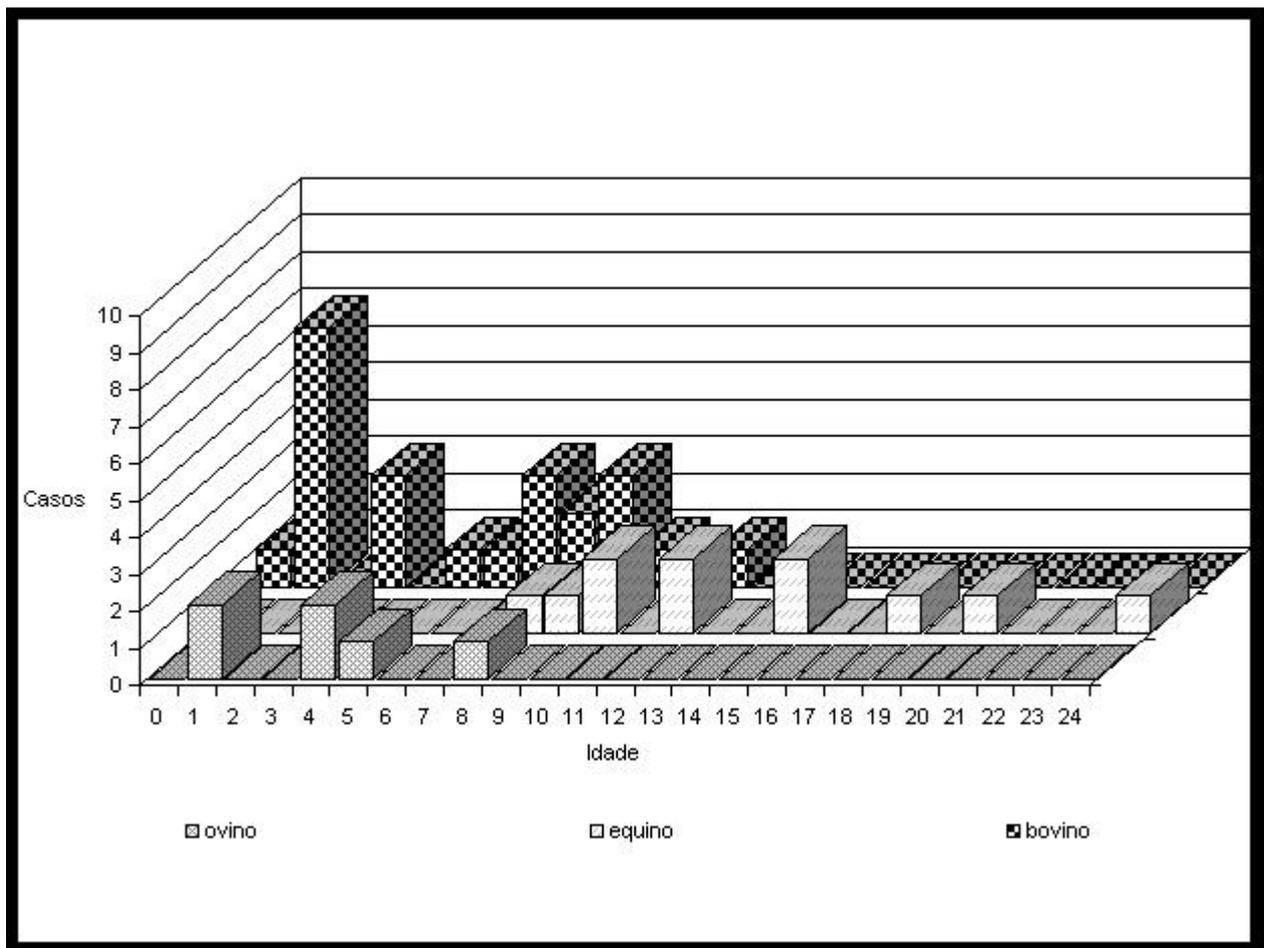


Figura 2. Carcinoma de Células Escamosas em Animais de Produção. Variação da incidência de carcinoma de células escamosas com relação a idade dos animais afetados.

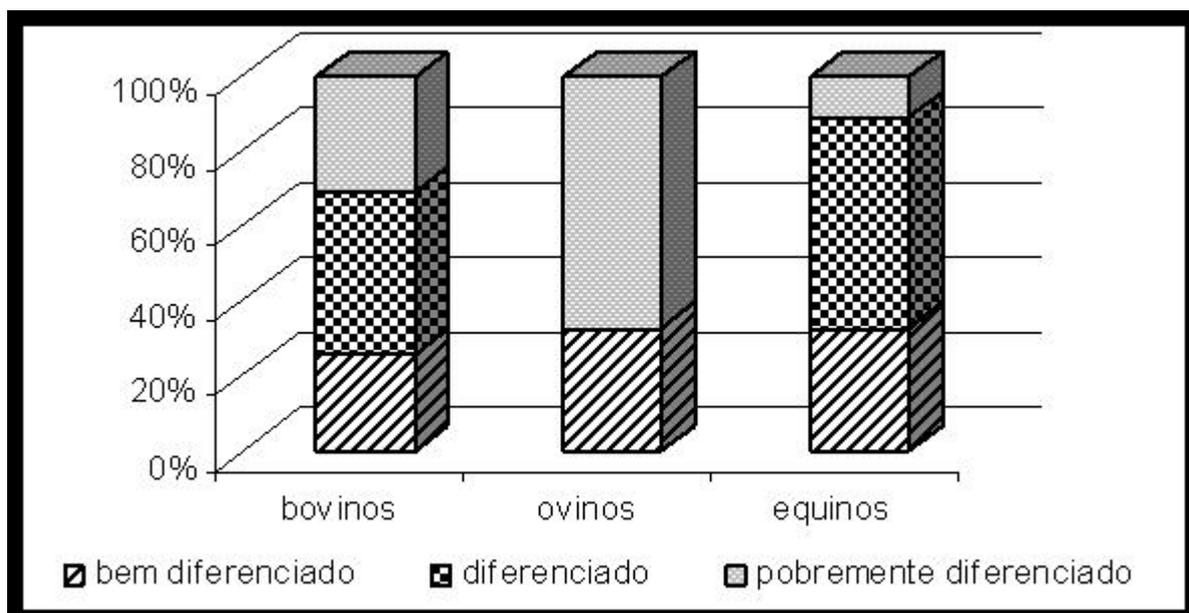


Figura 3. Carcinoma de Células Escamosas em Animais de Produção. Porcentagem de contribuição de cada grau de diferenciação tumoral para o total de casos nas espécies bovina, ovina e eqüina.

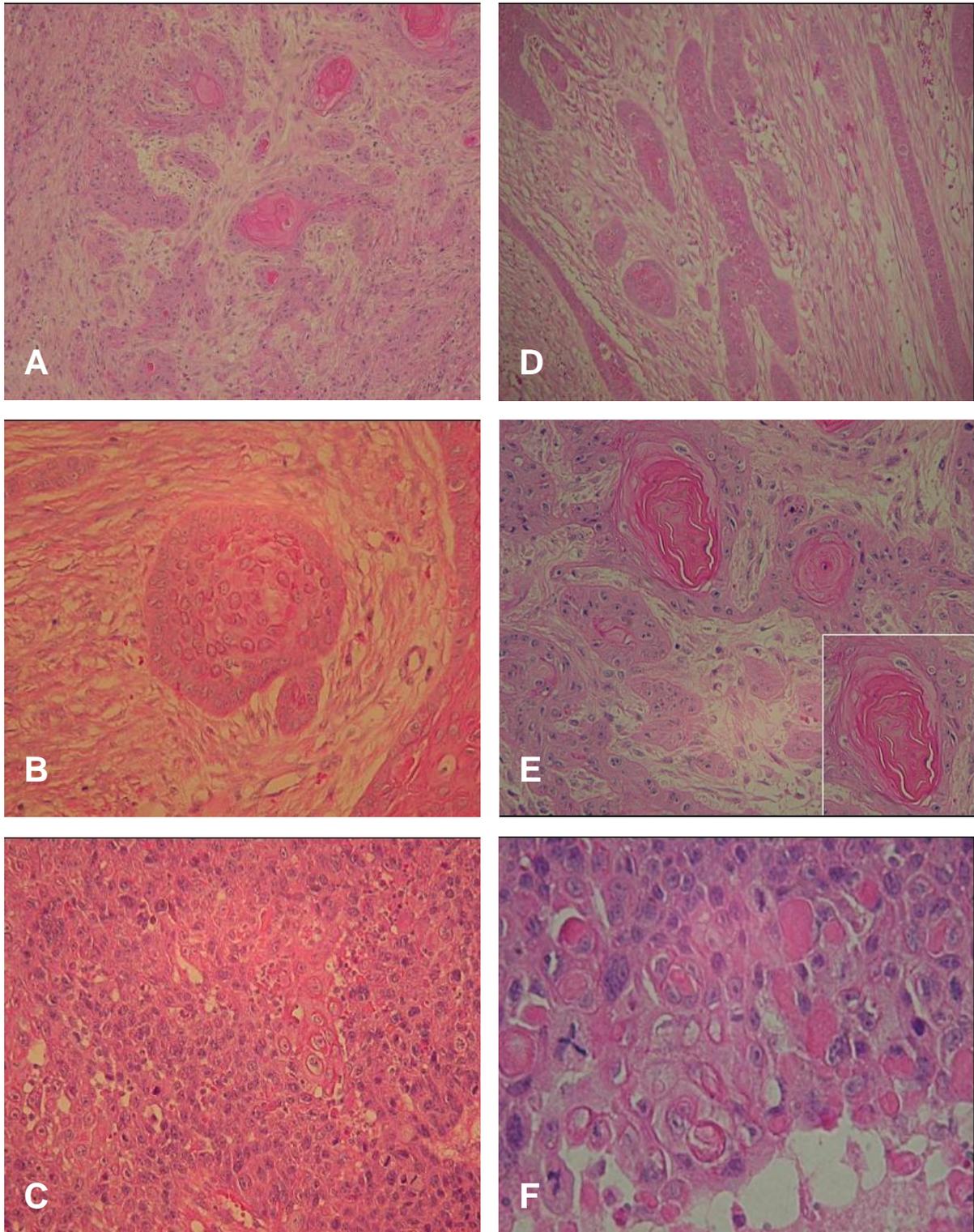


Figura 4. Carcinoma de Células Escamosas em Animais de Produção. Graus de diferenciação dos carcinomas de células escamosas. A) bem diferenciado, B) diferenciados e C) pobremente diferenciados. D) arranjo em trabéculas e ninhos. E) pérola de queratina (detalhe canto inferior esquerdo). F) aspecto pleomórfico evidente dos tumores pobremente diferenciados

4. TRABALHO 3: SARCÓIDE EQÜINO: ESTUDO DE CASUÍSTICA

Este trabalho será enviado à revista **The Veterinary Journal**, e está redigido conforme as normas da mesma.

SARCÓIDE EQÜINO: ESTUDO DE CASUÍSTICA

Ramos, Adriano Tony; Coimbra, Helen Silveira; Fernandes, Cristina Gevehr; Schuch, Luiz Filipe Damé; Norte, Diego Mollerke.

RESUMO

Neste estudo objetivou-se estudar aspectos epidemiológicos e etiológicos de 28 sarcóides eqüinos. Dados como raça, idade, sexo dos animais afetados e localização corpórea do tumor foram observados. No estudo etiológico utilizou-se a reação da polimerase em cadeia para avaliar o papel do papiloma vírus bovino neste tipo de tumor. Um número maior de casos foi encontrado nos animais da raça Crioula. Os tumores estavam igualmente distribuídos pelo corpo dos animais. A maioria dos tumores ocorreram nos animais com idade entre 3-7 anos. O exame de reação em cadeia da polimerase foi positivo para o papiloma vírus bovino tipo 2 em todas as 3 amostras.

Termos de indexação: tumores, sarcóide eqüino, epidemiologia, Papiloma Vírus Bovino, PCR.

ABSTRACT

EQUINE SARCOID: A 28 CASES STUDY

Epidemiological and etiological data of 28 equine sarcoid were analyzed. Data as breed, age, sex and anatomical distribution of the tumors were statistically analyzed. Polymerase Chain Reaction was performed to detect Bovine Papilloma Virus type 1 and 2 on tumor cells. It was observed a high prevalence on a local breed (Crioula). An even skin distribution of the lesions was also observed. Higher prevalence on females and in 3-7 year-old animals was depicted. Polymerase Chain Reaction only detected the presence of Bovine Papilloma Virus type 2 on three samples.

Index terms: tumors, equine sarcoid, epidemiology, Bovine Papilloma Virus, PCR.

INTRODUÇÃO

Sarcóides são os tumores de pele mais comuns dos eqüinos. São neoplasias benignas, localmente invasivas e geralmente únicas. São tumores com um componente epidérmico variável muito propenso a recidivas (Knottenbelt & Matthews, 2001). O nome sarcóide é utilizado para enfatizar as diferenças clínicas e patológicas deste tumor em relação ao papiloma, fibroma, fibrossarcoma e para sugerir uma aparência sarcomatosa da lesão. A doença tem ocorrência mundial (Knottenbelt & Kelly, 2000).

Essas lesões ocorrem em cavalos de qualquer tipo (trabalho, corrida, etc.), cor e sem predileção por sexo. (Knottenbelt & Kelly, 2000). Embora a doença acometa animais de qualquer idade (Knottenbelt & Kelly, 2000; Goldschmidt & Hendrick, 2002), a maioria dos casos ocorre em animais com menos de 4 anos de idade (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Em alguns países, 50% dos tumores de pele de eqüinos são sarcóides (Weiss, 1974). O sarcóide ocorre em qualquer parte do corpo, mais freqüentemente na cabeça, lábio, pernas e tronco ventral. Cerca de 40% dos cavalos afetados tem múltiplos sarcóides (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

Na maioria dos casos, o diagnóstico é relativamente simples, porém outras vezes pode ser problemático, e podem ocorrer confusões em reconhecer os vários tipos clínicos de sarcóides. As diversas manifestações clínicas do tumor e seu aspecto similar com outras doenças de pele sugerem que um diagnóstico definitivo é desejável a partir de uma perspectiva clínica (Knottenbelt & Matthews, 2001). Os diagnósticos diferenciais de sarcóide são os fibrossarcomas, os schwannomas, o carcinoma de células escamosas, a habronemose e a pitiose.

Varias vezes o diagnóstico é relativamente simples, porém outras vezes pode ser problemático, e podem ocorrer confusões em reconhecer os 6 tipos clínicos de sarcóides. As diversas manifestações clínicas do tumor e seu aspecto similar com outras doenças de pele sugere que um diagnóstico definitivo é desejável a partir de uma perspectiva clínica (Knottenbelt & Matthews, 2001). Apesar dos sarcóides não metastatazarem, eles exibem uma manifestação clínica variável, desde o crescimento infiltrativo e agressivo até a regressão espontânea (Nasir & Reid, 1999).

Inicialmente foram propostos apenas 4 tipos morfológicos macroscópicos: verrucoso, fibroblástico, misto e plano (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Novos tipos de sarcóides vem sendo constantemente relatados como o oculto (Martens et al, 2000) e o maligno (Pascoe & Knottenbelt, 1999). Histologicamente a maioria das lesões são compostas de um epitélio fino com proeminentes reentrâncias epiteliais as quais se estendem para o interior da proliferação dérmica, na qual fibroblastos estão arranjados em digitais, entrelaçados, ou em forma de zigue-zague e contém pequena quantidade de colágeno. O pleomorfismo nuclear e as mitoses variam, mas podem ser bem pronunciadas em tumores de crescimento rápido ou tumores recorrentes. Pode ser bem difícil diferenciar alguns sarcóides dos fibrossarcomas ou schwannomas, especialmente se o sarcóide estiver ulcerado ou sem o componente epidérmico distinto (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

O tumor é autotransplantado para pele lesada, isto provavelmente por ser induzido por vírus (Weiss, 1974). A etiologia suspeita é o papiloma vírus bovino 1 e 2, pois o DNA do vírus foi encontrado em tumores. Tumores semelhantes são reproduzidos pela injeção intradérmica do papilomavírus bovino em eqüinos (Blood & Radostits, 1990). O papiloma vírus bovino é capaz de induzir transformações malignas em algumas linhagens de células como os fibroblastos de bovinos e eqüinos (Carr et al., 2001). Além disso o fato do tumor ser autotransplantado para pele lesada, corrobora com a possibilidade dele ser induzido por vírus (Weiss, 1974).

Este estudo documenta a evidencia da ativação e a expressão do gene E5 em sarcóides eqüinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo dos tumores do tipo Sarcóide eqüino. O material foi obtido através de levantamento no banco de dados, laminário e coleção de blocos do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) e

abrangeu o período de 1978 a 2002. A maior parte do material avaliado encontrava-se em blocos de parafina nos arquivos do LRD.

O diagnóstico foi confirmado através da avaliação dos tumores por microscopia óptica de cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE).

Três das 28 amostras, das quais havia material conservado sob congelamento, foram submetidas à amplificação de DNA através da técnica de PCR com o objetivo de identificar a presença de DNA de papiloma vírus bovino (PVB) no tecido neoplásico. A técnica foi realizada utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, um capaz de amplificar a região que codifica para a proteína E5, tanto do PVB-1 como do PVB-2, enquanto o segundo par de oligonucleotídeos, permite a amplificação específica de uma região do gene E6 do PVB-1, conforme descrito por Teifke & Weiss (1991) e expresso na Tabela 3. O material foi preparado e o DNA extraído. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador em 40 ciclos de amplificação para proceder a eletroforese em gel de agarose. Consideraram-se positivas para a presença de DNA de PVB-1 aquelas amostras que apresentaram bandas de 243 pb na reação com primers E5 e 250 pb naquelas com E6. Amostras que apresentaram amplificação somente com E5 foram classificadas como PVB-2. Amostras de papilomas bovinos foram utilizadas como controle positivo. Tubos com água ultra pura, foram utilizados como controle negativo.

RESULTADOS

De um total de 6267 materiais, recebidos no LRD, no período de 1978 a 2002. 175 eram tumores. Destes, 65 tumores eram da espécie equina e destes 28 eram sarcóides (43% do total de tumores diagnosticados neste período) (Fig. 6).

O diagnóstico dos sarcóides baseou-se na avaliação histológica. A classificação clínico-macroscópica dos tumores não foi efetuada pois se tratou de um estudo retrospectivo de material arquivado e as informações acerca das características do tumor que constavam nas fichas eram escassas. Apenas em alguns casos em que o tumor avaliado era bastante pequeno, observava-se no próprio corte histológico o aspecto verrucoso.

Os sarcóides equinos tiveram maior prevalência na faixa dos 3 aos 7 anos, sendo que 11 tumores estavam em animais jovens (0 a 5 anos), 9 tumores nos animais adultos (6 a 12 anos), e 5 tumores nos animais senis (13 a 40 anos) e 3 casos não informados (Fig. 7).

Quanto ao sexo, 43% dos tumores ocorreram em fêmeas, 39% ocorreram em machos e em 18% dos casos não foi informado sexo do portador (Fig. 8). A raça mais afetada foi a Crioula seguido pelos animais sem raça definida (SRD) (Fig. 9). Os tumores se localizam em diferentes regiões do corpo do animal, aparecendo com a mesma frequência nos membros, cabeça e tronco com 17,86% em cada. Em 28,57% dos casos os tumores eram múltiplos e estavam distribuídos por todo o corpo e em 17,86% dos casos não foram informadas as localizações dos tumores (Fig. 10).

No exame histológico os tumores apresentaram características típicas dos sarcóides como hiperqueratose, epitélio delgado com digitações que se estendem para o interior do tumor. Na metade dos tumores as digitações se entrelaçavam formando os **rete pegs**. Em todos os tumores, foi notada diminuição do número de folículos pilosos e glândulas sudoríparas. O componente

fibroblástico variava sua densidade, assim como a forma de disposição de suas células, que na maioria das vezes, estavam arranjadas em digitais e algumas vezes entrelaçadas ou em bandas ou em feixes. Na sua totalidade os sarcóides possuíam pouco colágeno. Em alguns casos a epiderme estava ulcerada. Nos casos em que havia ulceração epidérmica, mesmo que parcial, encontrava-se um infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares.

O exame de PCR foi positivo para o papiloma vírus bovino tipo 2 confirmado pela presença de uma banda fluorescente específica aos 250 bp. nas 3 amostras e negativo para o tipo 1 pela ausência da banda aos 243 pb. nas 3 amostras. A autenticidade do teste foi confirmada pelas amostras positivas de papilomas bovinos com bandas semelhantes nos dois casos (E5 e E6) (Fig. 11).

DISCUSSÃO

Os sarcóides eqüinos têm sido descritos freqüentemente como tumores bifásicos com dois componentes: um dérmico e outro epidérmico (Martens et al., 2000).

Os fibroblastos na junção dermo-epidérmica estão freqüentemente dispostos perpendicularmente à membrana basal. A proporção dos componentes dérmico e epidérmico pode variar nos diferentes tipos de sarcóide. Nos tipos verrucosos, em geral, o componente epidérmico é relativamente maior, enquanto que nos tipos fibroblásticos o componente dérmico é maior (Evans, 1993). Esta comparação entre os componentes epidérmico e dérmico, não foi realizada pois as amostras muitas vezes não possuíam padrões para esses tipo de avaliação.

Não foi notado aumento da densidade dos fibroblastos localizados logo abaixo da epiderme como relata Martens et al. (2000) ao descrever o tipo oculto. A presença de outras características foi variável e não foi suficiente para permitir diferenciar os tipos clínicos baseados na histologia (Martens et al., 2000).

Martens et al. (2000) classificam os sarcóides em 5 tipos clínicos: oculto, verrucoso, fibroblástico, nodular e misto. Os sarcóides ocultos apresentam superfície com pouco pêlo, rugosa e circular. O tipo verrucoso aparece como uma lesão vegetativa e séssil. O tipo fibroblástico tem uma aparência ulcerada e brilhosa. O tipo nodular é uma massa firme disfarçada sobre uma pele aparentemente normal. Os mistos são uma combinação dos componentes dos tipos verrucosos, nodulares e fibroblásticos.

Pascoe & Knottenbelt (1999) relatam ainda o tipo maligno na sua classificação. Este último tipo foi descrito como uma variante que se infiltra através dos vasos linfáticos propiciando o desenvolvimento de massas tumorais múltiplas (Knottenbelt et al., 1995).

Os sarcóides ocultos muitas vezes são negligenciados na avaliação histológica e os sarcóides nodulares são algumas vezes identificados como fibromas, neurofibromas ou fibrosarcomas (Martens et al., 2000).

Goldschmidt & Hendrick (2002) relata que a maioria dos casos ocorre em animais com menos de 4 anos de idade. No estudo observou-se que a incidência maior ocorre de 3 aos 7 anos de idade dos animais. Blood & Radostits (1990) citam que pode haver além de uma predisposição familiar, uma tendência à doença ocorrer com maior freqüência em animais com menos de 6 anos de idade.

Para Evans (1993) não há predisposição por idade, raça, sexo ou coloração da pelagem. Não há relatos da prevalência maior do tumor em uma determinada raça. Neste levantamento a raça com maior número de casos foi a Crioula.

A etiologia dos sarcóides é provavelmente multifatorial. Deve estar ligada à combinação de fatores como exposição ao agente viral, predisposição genética (Evans, 1993, Blood & Radostits, 1990) e traumatismo cutâneo (Evans, 1993).

A participação de um componente viral vem sendo exaustivamente estudada. Exames de PCR invariavelmente são positivos para papiloma vírus bovino (PVB) tipo 1 ou 2 (Nasir & Reid, 1999). A partir desta avaliação, demonstrou-se que o PVB 2, também está presente nos sarcóides eqüinos diagnosticados na região sul do Brasil. Assim como para Martens et al. (2000) todos tumores foram positivos para a presença do DNA do papiloma vírus bovino. Os resultados diferem no sentido de ter-se encontrado somente o PVB-2 (100%). Geralmente é relatada maior presença do PVB-1 (74%) do que a presença do PVB-2 (26%) nas amostras (Martens et al., 2000).

Há discussões, porém, quanto à real participação do vírus na etiologia do tumor. O gene E2 está associado à cromossomos mitóticos e conseqüentemente à proliferação celular e a difusão do genoma viral nas células descendentes. O gene E5 está envolvido no mecanismo de contra corrente do MHC I, atuando em vários níveis, incluindo a transcrição do MHC I (Campo, 2002). Nasir & Reid (1999) utilizaram o genoma do papiloma vírus composto de genes precoces (E5 e E6) que são transformadores de proteínas. Numa infecção produtiva os genes precoces são expressos por todo epitélio, porém os genes tardios são expressos somente na diferenciação terminal dos queratinócitos. Assim sendo, é possível que o PVB realmente colaborou no desenvolvimento desses tumores.

Outro ponto que vem sendo questionado é a localização do vírus na lesão. Estudos realizados com hibridização *in situ* revelaram que o DNA viral está no componente fibroblástico próximo da junção dermo-epidérmica (Lory et al., 1993; Teifke et al., 1994). Mais recentemente, o DNA do PVB foi detectado na superfície intacta de tumores, através de exame de PCR de swabs e raspagens de epitélio (Martens et al., 2001).

AGRADECIMENTOS

Ao técnico do Laboratório de Histopatologia do LRD, João Nunes, pela confecção das lâminas, a Med. Vet. MSc. Helen Coimbra pelo apoio técnico na realização do PCR e ao Méd. Vet. MSc. João Luiz Montiel Ferreira pelo auxílio na coleta de dados.

REFERÊNCIAS

- Blood, D. C. & Radostits, O. M. (1990). Clínica Veterinária. 7ª ed. Editora Guanabara-Koogan São Paulo. 1263 p.
- Campo, M. S. 2002 Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research* **89**, 249-261.
- Carr, E. A., Théon, A. P., Madewell, B. R., Hitchcock, M. E., Schlegel, R. & Schiller, J. T. 2001. Expression of a transforming gene (E5) of bovine papillomavirus in sarcóides obtained from horses. *American Journal of Veterinary Research*, **62**(8), 1212-1217.

- Evans, A. G. 1993. Moléstias da Pele/Dermatopatias In: Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais, ed. B. P. Smith, pp. 1249 – 1286. São Paulo: Ed Manole.
- Goldschmidt, M. H. & Hendrick, M. J. (2002). Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Tumors in Domestic Animals, ed. D. J. Meuten, pp. 45-118. Iowa: Iowa State Press.
- Knottenbelt, D. C., Edwards, S. & Daniel, E. (1995). Diagnosis and treatment of equine sarcoid. In Practice, **17**, 123-129.
- Knottenbelt, D. C. & Kelly, A. (2000). The diagnosis and treatment of periorbital sarcoid in the horse: 445 cases from 1974 to 1999. Veterinary Ophthalmology, **3**(2-3), 169-195.
- Knottenbelt, D. C. & Matthews, J. B. (2001). A Positive Step Forwards in the Diagnosis of Equine Sarcoid. The Veterinary Journal, **161**, 224-226.
- Lory, S., von Tscherner, C., Marti, E., Bestetti, G., Grimm, S. & Waldvogel, A. (1993). In situ hybridization of equine sarcoides with bovine papillomavirus virus. Veterinary Record, **132**, 132-133.
- Martens, A., De Moor, A., Demeulemeester & J. , Ducatelle, R. (2000). Histopatological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. Research in Veterinary Science, **69**, 295 – 300.
- Martens, A., De Moor, A. & Ducatelle, R. (2001). PCR Detection of Bovine Papilloma Virus DNA in Superficial Swabs and Scraping from Equine Sarcoids. The Veterinary Journal, **161**, 280-286.
- Nasir, L. & Reid, S. W. J. (1999). Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. Virus Research, **61**, 171-175.
- Pascoe, R. R. & Knottenbelt, D. (1999). Neoplastic conditions. In: Manual of equine dermatology, ed. R. R. Pascoe & D. Knottenbelt, pp. 244-248. London: W. B. Saunders Company Ltd.
- Teifke, J. P., Hardt, M. & Weiss, E. (1994). Detection of bovine papillomavirus DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded equine sarcoides by polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization. European Journal of Veterinary Pathology, **1**, 5-10.
- Teifke, J. P. & Weiss, E. (1991). Detection of bovine papillomavirus DNA in equine sarcoids using the polymerase chain reaction (PCR). Berl Munch Tierarztl Wochenschr ,**104**(6),185-187.
- Weiss, E. (1974). Tumours of the Soft (Mesenchymal) Tissues. In: Bulletin of the World Health Organization – International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals; Vol. 50 No. 1-2; pp. 101-115.

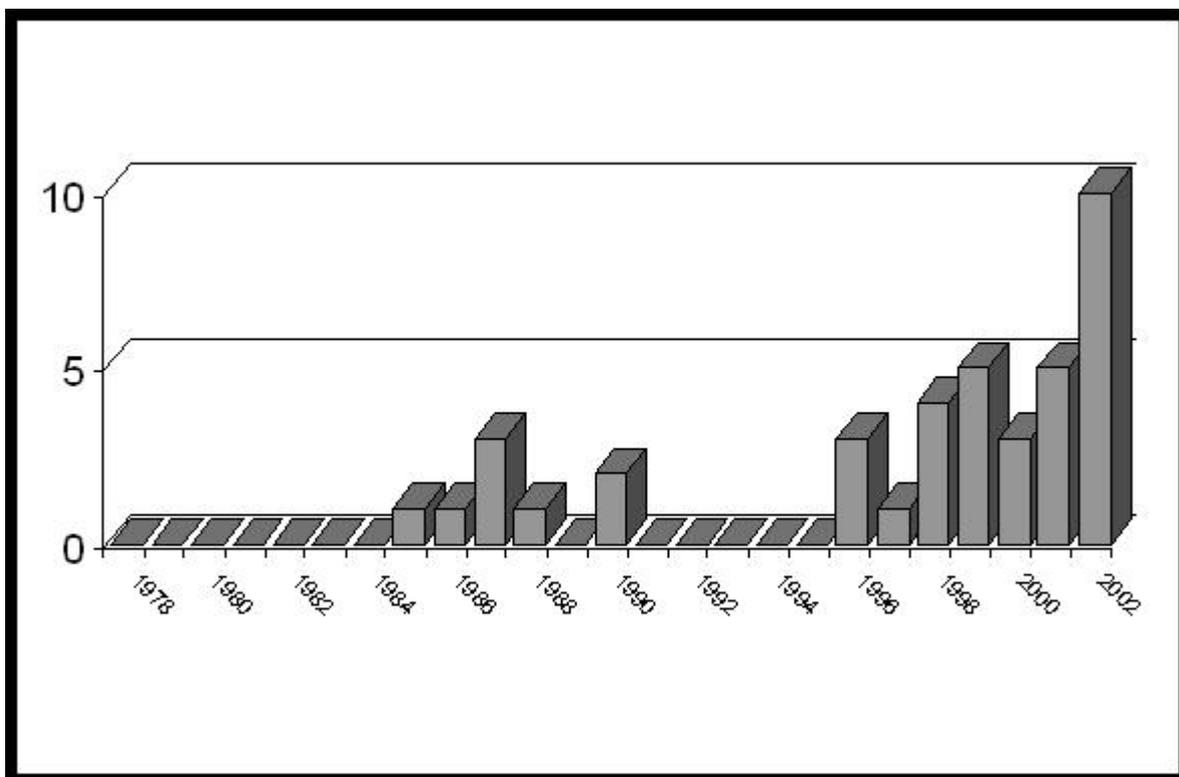


Figura 5. Sarcóide Equino: Estudo de Casuística. Número de sarcóides recebidos a cada ano no LRD-UFPEL.

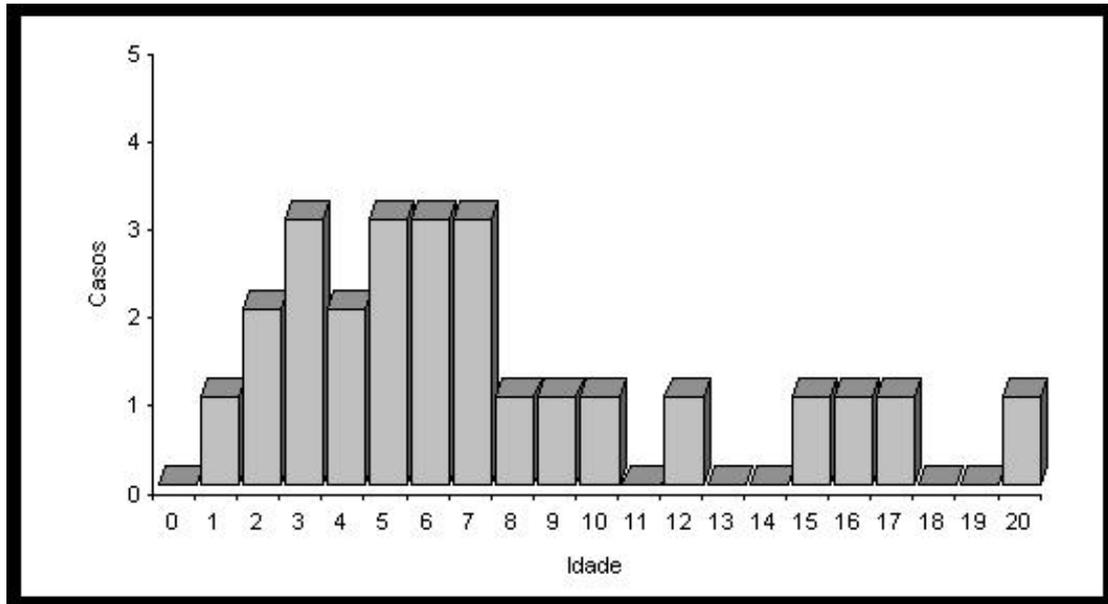


Figura 6. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Incidência do tumor de acordo com a idade dos animais.

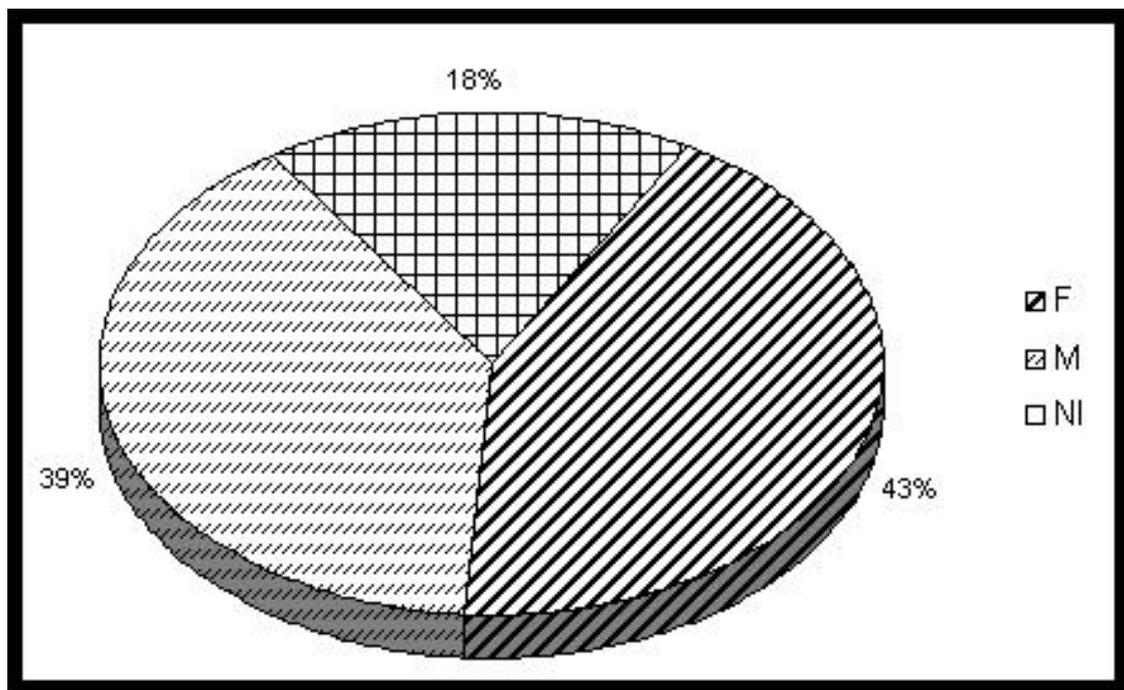


Figura 7. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Gráfico representando a distribuição do tumor quanto ao sexo dos animais. F: fêmeas;M: machos; NI: não informados.

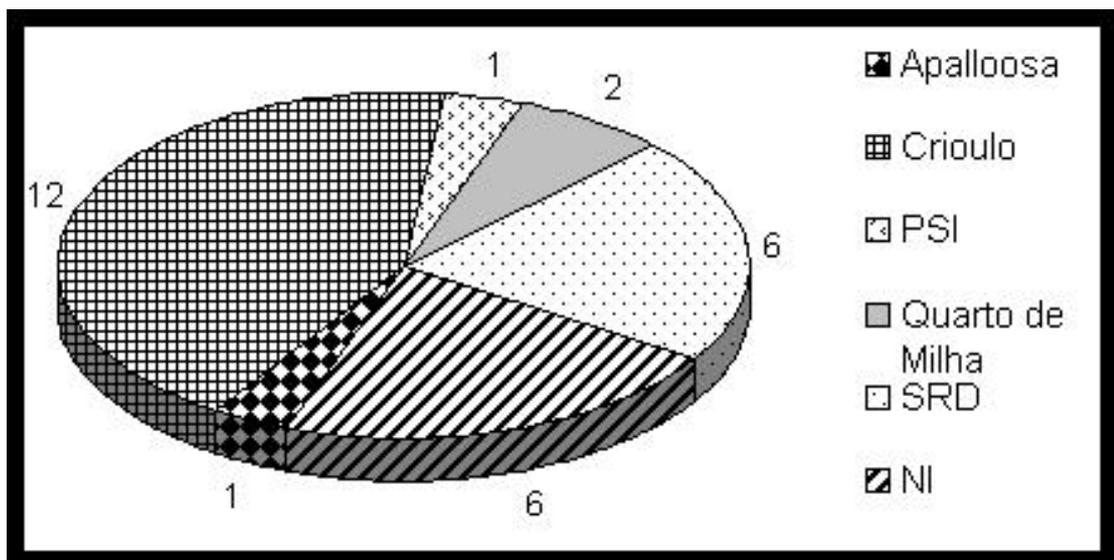


Figura 8. Sarcóide Equino: Estudo de Casuística. Representação da distribuição dos tumores nas raças de eqüinos. PSI: puro sangue inglês; SRD: sem raça definida; NI: não informados.

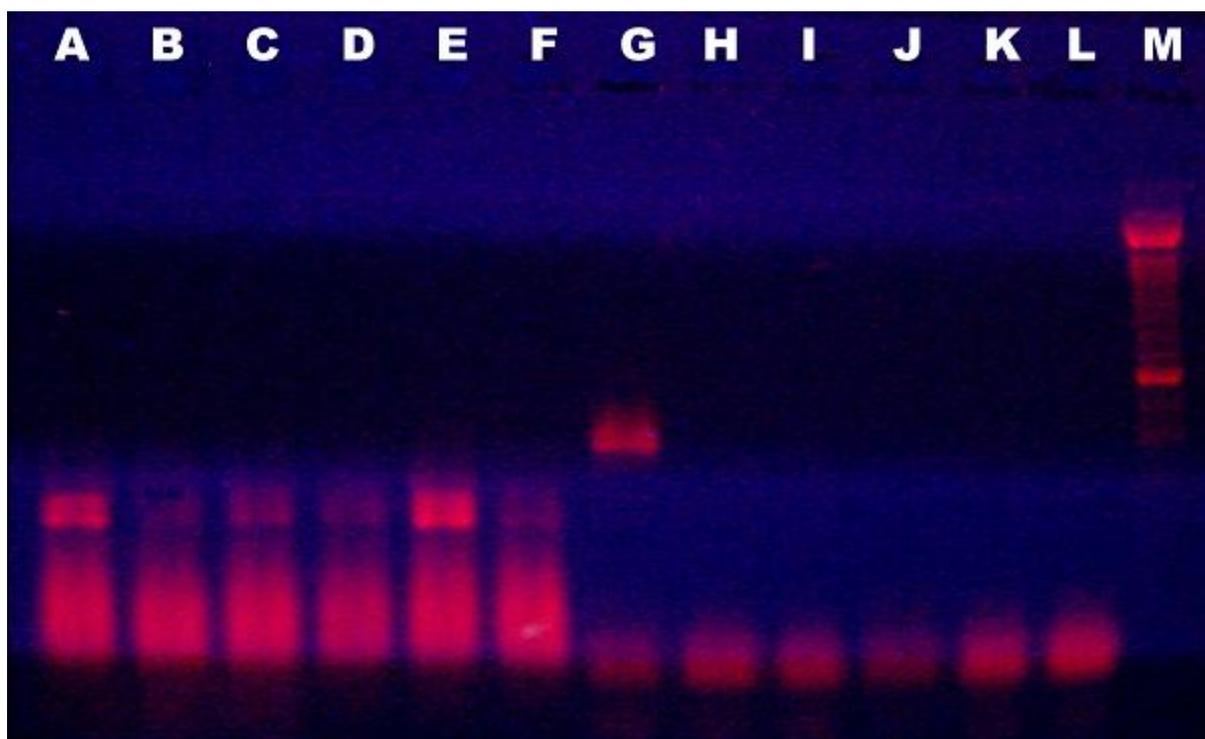


Figura 10. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Eletroforese em gel de agarose indicando o produto do PCR do DNA do PVB. Nas colunas A e E, demonstram-se as amostras de papilomas bovinos positivos para o PVB-1 e 2. Nas colunas B, C e D, encontram-se amostras de sarcóide positivos para PVB-1 e 2. Nas colunas G, amostras de papilomas bovinos positivos para o PVB-1. Nas colunas H, I e J, amostras de sarcóide eqüino negativos para PVB-1. Na coluna K, papiloma bovino negativo para p PVB-1. Nas colunas F e L, controle negativo para PVB-1 e PVB-2 respectivamente. Na coluna M marcador com 100 pb.

Tabela 3. Sarcóide Eqüino: Estudo de Casuística. Seqüência de bases usadas no PCR.

Oligonucleotídeo	Seqüências de bases (5' 3')
E5 +	CAA AGG CAA GAC TTT CTG AAA CAT
E5 -	AGA CCT GTA CAG GAG CAC TCA A
E6 +	ATG GAC CTG aAA ccT TTT gC*
E6 -	TGG GTA tTT GGA CCT TGA AC*

(*) letras minúsculas para "MistMatches" para BPV-2

ANEXOS

Instruções aos Autores

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:
 - a) o *Título* do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;
 - b) *Abstract*, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos "index terms";
 - c) o *Resumo* deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, Resumo e Abstract trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);
 - d) a *Introdução* deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
 - e) em *Material e Métodos* devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;
 - f) em *Resultados* deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;
 - g) na *Discussão* os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
 - h) as *Conclusões* devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;
 - i) *Agradecimentos* devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;
 - j) a lista de *Referências*, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as instruções de "Normalização da Documentação no Brasil" (IBICT-ABNT), "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences) e/ou "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, D.C.).
2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e Abstract serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos ("slides") coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.
5. Os quadros deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de a em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.



Guide for Authors

The Journal exists to publish articles recording research and original scientific findings and topical reviews relevant to the diseases of domesticated and other vertebrate animals. Articles on diseases of man are also appropriate if the present features of special interest when viewed against the general background of vertebrate pathology. The Editorial Board accepts papers on the understanding that they have not been published elsewhere and, if accepted, will not be reprinted in whole or in part without the Board's written approval. The Board reserves the right to reject any manuscript submitted to it.

Articles must be concise and unnecessary duplication of data in text, tables and graphs should be avoided. Allusions to published work must be brief and limited to what is necessary to evaluate the findings in the manuscript. Extensive reviews of the literature will not be accepted.

Papers for publication should be sent to: Dr G. R. Smith, Department of Pathology and Infectious Diseases, The Royal Veterinary College, Royal College Street, London, NW1 0TU or to any member of the Editorial Board.

Number of Copies

Manuscripts should be typed with generous margins and double spacing throughout. Two clearly typed copies, one of which should be the top copy, and two sets of illustrations should be submitted. Papers will be published with the minimum of delay, bearing the dates of receipt and acceptance.

Title

Papers should normally comprise: 1. A Summary of the findings presented in the paper and the conclusions drawn from them. 2. A brief Introduction stating the purpose of the paper. 3. A concise account of the Materials and Methods used. 4. A record of the Results. 5. A Discussion of the significance of the results. 6. Any necessary Acknowledgments for assistance. 7. References to published work cited in the text, in alphabetical order.

Reference Format

The form of references should be: Name, Initials (Date), Title, Periodical or other source in full. Volume number, First and last page numbers, e.g. Komuro, T. (1969). The fine structure of crayfish muscle. *Journal of Electron Microscopy*, **18**, 291-297. In the text, references to publications by three or more authors are given in the style Jones et al. on each occasion.

Titles of books must be given in full with Publisher, place of publication and edition if other than first, e.g. Ebashi, S., and Endo, M. (1968). Calcium ion and muscle contraction. In *Progress in Biophysics*. J. A. V. Butler and N. Noble, Eds, Pergamon Press, New York.

Figures

All illustrative materials must be of high quality. Diagrams and charts should be drawn in indian ink on Bristol-board, smooth surfaced white cartridge paper, or blue, feint-lined graph paper. Their proportions should be related to those of the printed page and they should be about twice as large as their intended final size. All symbols, figures and lettering should be written lightly in pencil on a transparent overlay.

Photomicrographs and photographs should be submitted as sets of separate glossy prints. Text figures and half tones will be inserted in the text at an appropriate place, which authors might like to indicate on their manuscript. Authors may wish to have several half tones grouped into a composite

plate. In this case the author should submit a sketch plan of the suggested layout and not mount or number the photographs as this work will be undertaken by the Publisher. Such composite blocks should be of the same proportion as the page of the Journal. All figures must be numbered lightly in pencil on the back, and where the author wishes to draw attention to particular features by means of arrows or lettering, these should not be superimposed directly on the photographs but their positions should be clearly indicated by drawing them on a piece of tracing paper laid over the surface of the photographs. Although no charge will be made for a reasonable number of text figures or black and white half tones the Publisher reserves the right to require authors to contribute towards the cost of plates. If an author believes that the presentation of his results would be enhanced by the use of colour, an estimate of the cost will be provided on request. The maximum page area available for blocks is 23 x 16.9 cm. Figures designed to span one or both columns on a page should be 8.2 cm or 16.9 cm wide, respectively. Legends to all illustrations should be shown separately and, where appropriate, should state the stain and the magnification. The latter should preferably be given in the form of a magnification bar.

Tables

Tables require captions and should be self explanatory. They should be submitted on separate sheets and designed to fit into the type area of one printed page or less. Extensive tabular matter may not need to be published but can be consulted by interested parties if a footnote indicates where it is available.

Units & Abbreviations

Before submitting manuscripts authors are recommended to consult previous issues of the Journal to see the form in which the article appear. Systeme Internationale (S.I.) units should be used where appropriate including data on chemical pathology.

Case Reports

The Journal will contain a separate section of short papers. This section is intended to include reports of small completed investigations, new techniques or case descriptions. They may not always require the subdivisions of a full length paper but should include a brief summary and essential references. They must not exceed four printed pages, including tables and figures, and should be clearly marked 'Short Paper'. Single Case Reports will only be accepted if they make a significant contribution to knowledge.

From time to time the Journal publishes by invitation Review Articles on topics of broad interest from authors with acknowledged expertise in their field. Only in exceptional circumstances will unsolicited Review Articles be considered.

Copyright Information

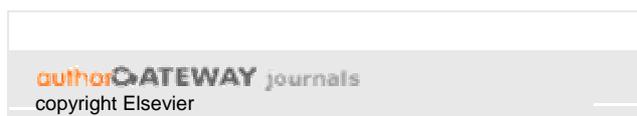
Authors submitting a manuscript do so on the understanding that it is accepted for publication, exclusive copyright in the paper shall be assigned to the Publisher. In consideration for the assignment of copyright, the Publisher will supply 25 offprints of each paper. Further offprints may be ordered at extra cost at the proof stage. The Publisher will not put any limitation on the personal freedom of the author to use material contained in the paper in other works.

Proofs

Page proofs are submitted to authors to check with their manuscript: a charge may be made for amendments introduced at proof stage.

Offprints

In consideration for the assignment of copyright, the Publisher will supply 25 offprints of each paper. Further offprints can be ordered at extra cost at proof stage.





The Veterinary Journal

Guide for Authors

The Veterinary Journal is an international journal of veterinary research which publishes original papers and reviews on all aspects of veterinary science. Contributions reporting investigative work in the scientific disciplines involving veterinary species are particularly welcome. Manuscripts may describe original work in a full paper or a short communication or may form a review of the existing state of knowledge on a particular aspect of veterinary science. Reviews should, in general, be written in support of original investigations. The Journal will reject any paper where there is reason to believe that animals have been subjected to unnecessary pain or distress. Papers are accepted for publication on the understanding that they have not been published and are not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted in triplicate to the Editor. The author should keep a further copy. They should be written in the English language and spelling should follow the Oxford English Dictionary.

Manuscripts may be submitted to:

The Veterinary Journal
Animal Health Trust
Lanwades Park
Kentford
Newmarket
Suffolk, CB8 7DW
UK
E-mail: tvj@aht.org.uk

Ethics

Typescripts that contain the results of animal studies will be accepted for publication only if it is made clear that a high standard of ethics was applied in carrying out the investigations.

Papers reporting clinical studies should, where appropriate, contain a statement that they have been carried out with ethical committee approval. Single case studies are not usually acceptable.

Digital Object Identifier

Digital Object Identifier: Churchill Livingstone assigns a unique digital object identifier (DOI) to every article it publishes. The DOI appears on the title page of the article. It is assigned after the article has been accepted for publication and persists throughout the lifetime of the article. Due to its persistence, it can be used to query Churchill Livingstone for information on the article during the production process, to find the article on the Internet through various Web sites, including IDEAL, and to cite the article in academic references. When using a Churchill Livingstone article in a reference section, it is important to include the article's DOI in the reference as volume and page information is not always available for articles published online. The References section, below, shows samples of DOI included in references. Further information may be found at

Number of Copies

Except in the case of reviews, contributions should be no longer than the equivalent of five journal pages including tables, illustrations and references. A typical page of text in the Journal contains approx. 520 words. Manuscripts should be typed on one side of A4 paper, double spaced and with ample margins; manuscripts which do not conform to these three requirements will be returned for retyping. All contributions may be subject to editorial revision.

Title

The paper should be arranged as follows: title page; a summary of not more than 150 words; main text; acknowledgements; references; tables; figure legends. The title page should contain the paper title, author(s), the name and address of the institution where the work was done and, where it differs, the name and address of the person to whom correspondence should be sent. It must also include a short running title of not more than 45 characters including spaces. Five Key words should be supplied.

Abstracts

An abstract of your manuscript, a maximum of 200 words, summarizing the content, should be provided on a separate sheet following the title page.

Length

Manuscripts must be concise and not exceed approximately 5 printed pages. This is the equivalent to approximately 5000-5500 words. Assume each figure, table and 10 references are equivalent to 200 words.

Reference Format

Only essential references should be included. Text citations can be in either of two ways, (a) with date in parentheses, e.g. as demonstrated by Chirnside (1992); or (b) with names and dates in parentheses, e.g. according to recent findings (Chirnside, 1992). If a citation has more than two authors the first author should be given followed by *et al.* Where lists of references are cited in the text they should be placed in chronological order, e.g. (Jones, 1967; Chirnside, 1992). If more than one reference by the same author(s) published in the same year are cited they should be distinguished from each other by placing a, b, etc. after the year. The reference list at the end of the paper should be alphabetical. All authors should be included. Journal titles should be given in full. References should be set out as follows:

Journal reference

CHIRNSIDE, E.D. (1992). Equine arteritis virus: an overview. *British Veterinary Journal* **148**, 181-97.

Book reference

REEF, V.B. (1992). Ultrasonographic evaluation. In *Equine Respiratory Disorders*, ed. J. Beech, pp. 69-88. Philadelphia: Lea & Febiger.

When citing a Churchill Livingstone journal, include the digital object identifier (DOI), if noted, from the article's title page. Please note the following example:

OFFER, J.E., FISHER, G.E.J., KEMPSON, S.A. & LOGUE, D.N. (2001). The effect of diet in early pregnancy on hoof health during first lactation. *The Veterinary Journal* **161**, 186-193
doi:10.1053/tvjl.2000.0515

Figures

Illustrations, referred to as 'figures', should be submitted larger than the size desired for

reproduction. Line illustrations should be either in black ink on smooth white paper or thin board or a good quality laser printout. Photographs and photomicrographs should be printed on glossy paper. X-ray films should not be submitted, but negatives are acceptable. If labelling is to be done by the Publisher this should be clearly written on a photocopy. All illustrations should bear on the reverse side the first author's name, and the figure number; the 'top' of the figure should be indicated. Illustrations will only be accepted if they are of a high quality and are essential to the comprehension of the paper. They will be printed in black and white. A charge may be made for colour.

Tables

Tables should be typed on separate sheets and numbered in Roman numerals. A brief title should be typed directly above each table. Footnotes to tables should be indicated by *, etc. and typed at the bottom of the relevant table. Information in tables must not be duplicated in figures and vice versa.

Units & Abbreviations

Units, symbols and abbreviations should conform to the International System of Units as defined in Baron D.N. (ed.), (1988) Units, Symbols, and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Authors, 4th ed. London: Royal Society of Medicine. All other abbreviations should be unambiguous and should be clearly explained where they are first mentioned in the text.

Fast Track Publication

The journals has a fast-track system for publication of short reports of recent, important findings. Material for this section must be submitted on disk with an accompanying printout. After review this material will appear in the next available issue. These can usually be published speedily provided that no revision of the manuscript is necessary. They should follow the requirements for full manuscripts but the text must not exceed 1000 words and should not be divided into conventional sections.

Disk/Electronic Submission

When supplying the final version of your article please include, where possible, a disk of your manuscript prepared on PC-compatible or Apple Macintosh computers, along with the hard copy print-out in triplicate. Standard 3.5 inch disks and most word processing packages are acceptable, although any version of WordPerfect or Microsoft Word are preferred.

Please follow these guidelines carefully:

Include an ASCII version on the disk, together with the word processed version if possible.

Ensure that the files are not saved as read-only.

Manuscripts prepared on disks must be accompanied by three hard copies, including all figures, printed with double spacing, and which may be used if setting from the disk proves impracticable.

Ensure the final version of the hard copy and the file on disk are the same. It is the authors' responsibility to ensure complete compatibility. If there are differences the hard copy will be used.

The directives for preparing the paper in the style of the journal as set out above must be followed.

The operating system and the word processing software used to produce the article should be noted on the disk (e.g. DOS/WordPerfect), as well as all file names. If UNIX, method of extraction should also be noted.

The disk/tape should be labelled with the journal reference number (if known), author name(s), hardware and software used to generate the disk file.

Do not include copyright material, e.g. word processing software or operating system files, on the disk because this can create difficulties with Customs clearance.

Package floppy disks in such a way as to avoid damage in the post.

Additional points to note:

Use two carriage returns to end headings and paragraphs.

Type text without end of line hyphenation, except for compound words.

Do not use lower case l (lower case el) for one or O (upper case oh) for 0, as they have different typesetting values.

Footnotes, tables and figure captions should be saved in a separate file from the main text. However, please ensure clear hard copies are supplied as they will probably be typeset from the hard copy.

Be consistent with punctuation and only insert a single space between words and after punctuation.

Please include a list of any special characters you have had to use, e.g. Greek letters, mathematical symbols, etc.

Illustrations submitted on disk:

Authors' illustrations should also, where possible, be supplied as both hard copy and electronic files. Figures drawn using Aldus Freehand (Apple Macintosh) and saved as Encapsulated PostScript files (EPS) are preferred and should be supplied on a separate disk.

Copyright Information

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that, if it is accepted for publication, exclusive copyright in the paper shall be assigned to the Publisher. In consideration for the assignment of copyright, the Publisher will supply 50 offprints of each paper. Further offprints may be ordered at extra cost at proof stage. The Publisher will not put any limitation on the personal freedom of the author to use the material contained in the paper in other works.

Proofs

The first named or the nominated author will be sent proofs for correction. The Publisher reserves the right to charge authors for the cost of changes made to the text or the figures at proof stage when such changes are extensive.



Anexo 4. Protocolo de realização do exame de PCR.

O material previamente congelado foi macerado com uma navalha e digerido com proteinase K (50 µg/ml), por 10 minutos a 56 °C. A extração foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio, seguido pela precipitação com etanol. Após, O sedimento foi seco ao ar e resuspendido em 100µl do tampão TE (Tris HCl 10mM (pH 7,4), EDTA 1mM com pH ajustado para 8,0). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, sendo utilizado em cada reação 1U taq DNA Polymerase (Life Technologies), 20mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 50 mM de KCl (Life Technologies) e 400 µM dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc) MgCl₂ a 1,5 mM, 40 pmol de cada oligonucleotídeos iniciador. Para a realização do PCR utilizou-se 2,5µl do DNA alvo. O volume final de 25 µl foi alcançado acrescentando-se quantidade suficiente para (qsp) de água milli Q estéril. Amplificação do DNA foi realizada em um termociclador Perkin Elmer 480. Após uma desnaturação inicial por 5 min a 95 °C foi feita a amplificação em 40 ciclos. Cada ciclo era composto por 1 min de desnaturação a 92,5 °C, por 1 min de anelamento em 63 °C (E5) e 55 °C (E6) respectivamente e depois um passo de prolongamento (DNA) por 2 minutos em 72 °C. Após o último ciclo foi efetuada uma fase de extensão de 5 min. Após as amostras eram resfriadas a 4 °C até que o material fosse manipulado ou retirado e conservado sob refrigeração até proceder-se à leitura do produto do PCR. Um volume de 15µl do produto do PCR adicionado a 3µl de tampão de corrida (LB-Sacarose à 40%, com azul de bromocresol à 0,06%) foi submetido a eletroforese em gel de agarose (gibcoBRL) à 1,5% conduzida a 100 V por 60 min, e visualizado em transluminador MacoVue, UV-25 hoefer. Considerou-se positivas para a presença de DNA de PVB-1 aquelas amostras que apresentaram bandas de 243 pb na reação com primers E5 e 410 pb naquelas com E6. Amostras que apresentaram amplificação somente com E5 foram classificadas como PVB-2. Amostras de papilomas bovinos previamente caracterizados como PVB-1 e PVB-2 foram utilizadas como controle positivo. Tubos onde o DNA alvo foi substituído por água, foram utilizados como controle negativo.