

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**RAISSA MOREIRA DE MORAIS**

**FATORES QUE PREDISPÕEM A OCORRÊNCIA DO CARCINOMA OCULAR EM  
VACAS DA RAÇA HOLANDESA**

**LAGES**

**2022**

**RAISSA MOREIRA DE MORAIS**

**FATORES QUE PREDISPÕEM A OCORRÊNCIA DO CARCINOMA OCULAR EM  
VACAS DA RAÇA HOLANDESA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.  
Orientador: Prof. Dr. Aldo Gava.

**LAGES**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Morais, Raissa  
FATORES QUE PREDISPÕEM A OCORRÊNCIA DO  
CARCINOMA OCULAR EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA /  
Raissa Moraes. -- 2022.  
73 p.

Orientador: Aldo Gava  
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação  
em Ciência Animal, Lages, 2022.

1. Carcinoma de células escamosas ocular. 2. Epidemiologia. 3.  
Patogênese. 4. Bovino. I. Gava, Aldo . II. Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

**RAISSA MOREIRA DE MORAIS**

**FATORES QUE PREDISPÕEM A OCORRÊNCIA DO CARCINOMA OCULAR EM  
VACAS DA RAÇA HOLANDESA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Aldo Gava

Universidade do Estado de Santa Catarina

Orientador e Presidente da Comissão

---

Dr. Adriano Tony Ramos

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr. Cláudio Wageck Canal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Fernando Henrique Furlan Gouvêa

Universidade Federal do Mato Grosso

---

Dr. Paulo Fernando de Vargas Peixoto

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Lages, 25 de fevereiro de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram com a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias.

Ao Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Mato Grosso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina.

Aos colegas Médicos Veterinários e produtores rurais.

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas ocular é uma neoplasia maligna de células epiteliais do tecido ocular. Durante quatro anos de estudo, acompanhou-se oito propriedades leiteiras da raça Holandesa localizadas nos estados de Santa Catarina e Paraná, com o objetivo de descrever a ocorrência dessa neoplasia e seus aspectos epidemiológicos, clinicopatológicos e a possível associação entre agentes virais oncogênicos como o papilomavirus bovino e vírus da leucose bovina na patogênese. No presente estudo foram avaliados 16 tumores oculares de vacas com idade entre 4-9 anos. As lesões oculares foram observadas em terceira pálpebra (88%), junção corneoescleral (6%) e entre a terceira pálpebra e junção corneoescleral (6%). Através da avaliação histopatológica os tumores em 44% eram carcinoma células escamosas bem diferenciados, 31% moderadamente diferenciados e 12,5% pobremente diferenciados. Dos 16 tumores oculares estudados, nove foram submetidos a Imunohistoquímica para Ki67, demonstrando marcação positiva. Foram avaliados os resultados da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase para papilomavirus bovino (BPV) e vírus da leucose bovina (BLV) em amostras de CCEO (n=16) e de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas (n=15) de bovinos fêmeas da raça Holandesa. As 31 amostras submetidas a PCR para BPV foram negativas. Um fragmento do gene *env* do BLV em quatro amostras de CCEO (n=4/12) foi amplificado e sequenciado. Apesar da identificação do DNA viral do BLV no tecido neoplásico ocular, ainda é incerto que esseretrovírus possa participar no processo neoplásico do CCEO. O resultado negativo para todas as amostras de BPV sugerem que este vírus não tem participação como precursor do carcinoma ocular bovino apesar do envolvimento em outras neoplasias.

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas ocular. Epidemiologia. Patogênese. Bovino.

## ABSTRACT

Ocular squamous cell carcinoma is a malignant neoplasm of epithelial cells of ocular tissue. For four years of study, eight dairy properties located in the states of Santa Catarina and Paraná, Southern of Brazil with the objective of describing the occurrence of this neoplasia and their epidemiological, clinicopathological aspects and the possible association between viral agents oncogenic as bovine papillomavirus and bovine leucosis virus on pathogenesis. In the present study, 16 ocular tumors of cows aged 4-9 years were evaluated. Ocular lesions were observed in the third eyelids (88%), corneoscleral junction (6%), and between the third eyelid and corneoscleral junction (6%). Through histopathological assessment tumors at 44% were carcinoma well-differentiated squamous cells, 31% moderately differentiated and 12.5% poorly differentiated. Of the 16 ocular tumors, nine were submitted to immunohistochemistry for Ki67, demonstrating positive marking. We evaluate the results of the polymerase reaction technique (PCR) for Bovine leukosis virus (BLV) and Bovine papillomavirus (BPV) in OSCC samples (n = 16) and third eyelid without macroscopic changes (n = 15). A fragment of the BLV *env* gene in four samples of OSCC (n=4/12) was amplified and sequenced. The other samples of OSCC and third eyelid tested were negative. Despite the identification of BLV viral DNA in ocular neoplastic tissue, it is still uncertain whether this retrovirus can participate in the neoplastic process of OSCC. The negative result for all BPV samples suggests that this virus has no role as a precursor of bovine ocular carcinoma despite involvement in other neoplasms.

**Keywords:** Ocular squamous cell carcinoma. Epidemiology. Pathogenesis. Cattle.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 RAÇAS SUSCETÍVEIS, GENÉTICA E REGIÕES ANATÔMICAS.....	12
2.2 AGENTES INFECCIOSOS.....	14
2.3 GÊNERO E IDADE.....	15
2.4 CONDIÇÃO NUTRICIONAL.....	16
2.5 ACHADOS CLINICOPATOLÓGICOS.....	16
<b>3 REFERENCIAS.....</b>	<b>19</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA E FORMULAÇÃO DO PROBLEMA.....</b>	<b>25</b>
<b>5 HIPÓTESES.....</b>	<b>25</b>
<b>6 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>8 CAPÍTULO.....</b>	<b>31</b>
8. 1 CAPÍTULO 1: PESQUISA RELACIONADA AO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLINICOPATOLÓGICOS E ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O ANTICORPO KI67 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS OCULAR DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA.....	32
8. 2 CAPÍTULO 2: PESQUISA RELACIONADA À DETECÇÃO DO DNA DO PAPILOMAVIRUS BOVINO (BPV) E VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (BLV) ATRAVÉS DA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE.....	59
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos foi observado uma frequente ocorrência de neoplasma maligno em estruturas oculares de vacas Holandesas e que resultam em perdas econômicas para os produtores leiteiros da região Sul do Brasil. O Carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) ou “câncer de olho” é uma neoplasia primária de células epiteliais que ocorre no tecido ocular, incluindo superfícies epiteliais da córnea e conjuntiva, junção corneoescleral e terceira pálpebra (ANDERSON et al., 1957; GHARAGOZLOU et al., 2007; TSUJITA & PLUMMER, 2010; DUBIELZIG, 2017).

Esse neoplasma tem distribuição mundial, com relatos nas Américas, Europa, Austrália e África. Sua incidência é maior em locais que possuam dias longos com exposição a luz solar e altitudes elevadas (ANDERSON & BADZIOCH 1991). Bovinos acima dos cinco anos são os mais afetados e raramente com menos de três anos (GHARAGOZLOU et al., 2007; TSUJITA & PLUMMER, 2010; FORNAZARI et al., 2017).

No Brasil, o carcinoma ocular, assim como o periocular têm sido relatados em bovinos da raça Holandesa, Hereford, Simental e Charolês (GALERA & MARTINS, 2001; LUCENA et al., 2011). Em bovinos de aptidão leiteira as fêmeas são mais afetadas por permanecerem na propriedade até o final da vida reprodutiva, ao contrário dos machos, que são abatidos ou comercializados antes de atingirem a vida adulta (CARVALHO et al., 2012).

É um dos mais frequentes neoplasmas em bovinos e responsável por grandes perdas econômicas devido à redução na vida reprodutiva e condenação de carcaças em abatedouros (BARROS et al., 2006; DUBIELZIG, 2017). É responsável também pela maior causa de enucleações entre as outras enfermidades oculares (SCHULZ & ANDERSON, 2010).

A etiologia para o desenvolvimento do CCEO ainda não está esclarecida, mas sugerem-se que possa ser multifatorial (TSUJITA & PLUMMER, 2010). Em carcinomas de células escamosas (CCE), fatores ambientais como a exposição prolongada a raios ultravioletas (UV) em pele e estruturas despigmentadas e sem pelos é implicado como um dos principais protagonistas ao aparecimento desse neoplasma em humanos e animais (ANDERSON & SKINNER, 1961; NEWTON et al., 1996; HESSE et al., 2015; GARCÍA et al., 2018).

Em bovinos a etiologia do CCEO está associado à exposição à raios UV e a suscetibilidade genética e aspectos fenotípicos, como a falta de pigmentação nas estruturas oculares e pele orbital (ANDERSON, 1960, PUGLIESE et al., 2014; FORNAZARI et al., 2017). A radiação ultravioleta possui características carcinogênicas e pode ocasionar mutação

em genes supressores de neoplasias com função de controlar a integridade do genoma (VAN DER POLS et al., 2006; LIU et al., 2010).

Além dos fatores ambientais, genéticos e fenotípicos, alguns agentes infecciosos que possuem potencial carcinogênico também são implicados na patogênese do CCEO em diversas espécies (MARÀ et al., 2005; TSUJITA & PLUMMER, 2010; HOLLHUMER et al., 2020). Em bovinos durante anos, o papilomavirus bovino (BPV) é um dos principais agentes virais associado na possível etiologia desse neoplasma (DMOCHOWSKI, 1961; FORD et al., 1982). Como o BPV, o vírus da leucose bovina (BLV) é outro agente infeccioso com capacidade oncogênica e de grande importância em rebanhos leiteiros do Brasil e de outros países (POLAT et al., 2017). Através da enzima transcriptase reversa, o BLV utiliza o RNA viral para a formação do DNA (provírus) e se integra ao material genético do hospedeiro (GILLET et al., 2016).

O CCEO inicia como lesões precursoras benignas como placas e papilomas na córnea, conjuntiva ocular e terceira pálpebra e desenvolve diretamente a partir da placa ou segue a sequência placa para papiloma até se tornar maligno (RUSSELL et al., 1956; TSUJITA & PLUMMER, 2010). Microscopicamente, o CCEO é classificado de acordo com a graduação como bem diferenciados quando há grandes ilhas de células neoplásicas, diferenciação escamosa óbvia e formação largas pérolas de queratina; moderadamente diferenciados quando há médias à pequenas ilhas de células neoplásicas, diferenciação escamosa de algumas células e médias à pequenas pérolas de queratinas; e pobremente diferenciados ou anaplásicos caracterizados por pequenas ilhas de células neoplásicas, deficiente diferenciação escamosa e queratinização celular individual (CARVALHO et al., 2005; FORNAZARI et al., 2017).

Tanto a graduação histológica como a avaliação da proliferação celular através da proteína Ki67 servem como importantes ferramentas diagnóstica e de prognóstico para prever o comportamento biológico de diversas neoplasias e do CCEO (CARVALHO et al., 2005; JING et al., 2019; WUNSCHER et al., 2021).

Baseado no que é descrito na literatura sobre Carcinoma de células escamosas ocular em bovinos, sabe-se que patogênese não é totalmente compreendida, portanto, os objetivos deste estudo foram 1) relatar a epidemiologia do neoplasma ocular; 2) descrever as características clinicopatológicas; 3) avaliar a expressão do marcador Ki67 e correlacionar sua expressão e as características histológicas; 4) detectar a possível presença do DNA de papilomavirus bovino e do vírus da leucose bovina em amostras com carcinoma ocular e de

amostras de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas e avaliar sua possível relação no aparecimento da neoplasia em bovinos fêmeas da raça Holandesa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) é uma neoplasma epitelial maligno que não possui etiologia definida e diversos fatores são implicados na possível patogênese como as características genóticas e fenóticas de raças predispostas, agentes infecciosos oncogênicos e fatores ambientais (elevada altitude, menor latitude com exposição maior e direta de raios solares) (TSUJITA & PLUMMER, 2010).

### 2.1 RAÇAS SUSCETÍVEIS, GENÉTICA E REGIÕES ANATÔMICAS

Os carcinomas de células escamosas ocular (CCEO) e periocular possuem incidência maior em *Bos taurus* do que *Bos indicus*, sendo descritas em raças de aptidão leiteira como Holandesa, Jersey, Guernsey, Shorthorn, Ayrshire, Pardo-Suiça (Brown Swiss) e Normanda, e raças de corte como Hereford, Brahman e Simental (RUSSEL et al., 1956; TSUJITA & PLUMMER, 2010). No Brasil, o carcinoma ocular tem sido relatado principalmente na raça Holandês (FORNAZARI et al., 2017) e raças de corte como Hereford, Simental e Charolês (GALERA & MARTINS, 2001; RAMOS et al., 2007; LUCENA et al., 2011).

A hereditariedade é um dos fatores relacionados ao aparecimento dessa neoplasia. Em um estudo realizado com 140 acasalamentos entre bovinos em que o pai ou a mãe apresentaram a neoplasia, a incidência entre a progênie foi de 22% à 26%, sugerindo que a herança genética é um fator determinante para a ocorrência dessa neoplasia (WOODWARD & KNAPP, 1950; BLACKWELL et al., 1956).

Características genóticas e fenóticas estão envolvidas na suscetibilidade de determinadas raças para o desenvolvimento desse neoplasma (ANDERSON, 1960). Em um estudo realizado por Anderson (1991) avaliou 2831 bovinos Hereford com o objetivo estudar se havia correlação entre o desenvolvimento dos carcinomas de olho com a hereditariedade, características fenóticas e genóticas. O efeito genético sobre a pigmentação determinou, na maioria das vezes, o grau de suscetibilidade do olho a ação de agentes carcinogênicos e a pigmentação corneoescleral demonstrou um efeito protetor direto no desenvolvimento de lesões na junção corneoescleral.

As lesões oculares podem ocorrer em ambos os olhos e envolver um ou mais locais anatômicos (ANDERSON, 1960). Em bovinos o desenvolvimento do carcinoma ocular é observado principalmente na conjuntiva lateral e junção corneoescleral (ANDERSON, 1960; ANDERSON & BADZIOCH, 1991; TSUJITA & PLUMMER, 2010). A pálpebra inferior, terceira pálpebra e canto medial são menos afetadas (ANDERSON, 1960; TSUJITA &

PLUMMER, 2010). Em alguns estudos a incidência desses neoplasmas na conjuntiva e terceira pálpebra totalizou 70% dos sítios das lesões (GHARAGOZLOU et al., 2007). De acordo com Russel et al., (1956) a junção corneoescleral é o local mais comum para a origem do carcinoma ocular e aproximadamente 75% dos neoplasmas surgem no limbo ou córnea.

De acordo com Anderson et al. (1960) a pigmentação circular tem influência direta na suscetibilidade palpebral ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas e inibe o aparecimento de lesões em regiões pigmentadas da pálpebra, porém, esse mesmo estudo demonstrou que a pigmentação circular não tem influência na suscetibilidade ao desenvolvimento dos neoplasmas na região do globo ocular ou terceira pálpebra, devido a pequena associação entre eles.

Um dos fatores relacionados ao aparecimento do carcinoma de células escamosas (CCE) é a exposição prolongada de raios ultravioletas (UV) em pele despigmentada e sem pelos, devido que a melanina atua como fotoprotetor nas regiões epidérmicas e mucosas (ANDERSON & SKINNER, 1961; NEWTON et al., 1996; HESSE et al., 2015; GARCÍA et al., 2018). No oeste e sudoeste dos Estados Unidos, a incidência de carcinomas de células escamosas em bovinos é consequência da alta insolação, diferente do que ocorre em outros lugares do país (RUSSEL et al., 1956).

De acordo com Silva et al., (2001), a quantidade de radiação transmitida através da pelagem é dependente da coloração e das características estruturais como o comprimento, espessura, diâmetro, número e inclinação dos pelos sobre a superfície da epiderme. Quanto menos pigmentada a epiderme, maior será a transmissão de radiação através da sua superfície. A melhor proteção é proporcionada por pelos negros, visto que o aquecimento é resultado da absorção de radiação térmica.

Em humanos, alguns aspectos clínicos favorecem que o componente ultravioleta da luz solar contribui para o desenvolvimento dos carcinomas de células escamosas. Estudos realizados em camundongos demonstraram que o efeito carcinogênico leva a uma resposta dérmica no homem como eritema, com agravo quando exposta a luz solar prolongada. Os locais do corpo onde se desenvolvem os neoplasmas são aquelas expostos a luz solar, sendo mais prevalente em pessoas de pele clara do que pessoas negras. Outro fator é que a ocorrência de câncer de pele é maior em regiões onde a luz solar é mais intensa (BLUM, 1959).

De acordo com Trosko et al., (1970) a neoplasia induzida por radiação ultravioleta seria resultado de mutação somática como consequência da falha no reparo de dímeros de pirimidina e com desenvolvimento de células defeituosas/neoplásicas. Outros estudos relacionam que a

radiação ultravioleta ocasiona mutação em genes, principalmente naqueles supressores de neoplasias, como o gene supressor de tumor TP53 que é um gene regulador com função de controlar a integridade do genoma (LIU et al., 2010).

Mutações no gene TP53 foram observados em carcinomas cutâneos induzidos por radiação UV em humanos (ORAM et al., 1994; COULTER et al., 1995) e animais (TEIFKE & LÖHR, 1996). Através da técnica de Imunohistoquímica (IHQ), Carvalho et al., (2005) avaliaram o grau de diferenciação celular de carcinoma de células escamosas ocular de 15 bovinos e correlacionaram com a hiperexpressão da proteína p53 e em todas as amostras positivas a imunorreatividade foi restrita ao núcleo das células neoplásicas.

## 2.2 AGENTES INFECCIOSOS

Em humanos e animais alguns agentes virais são responsáveis por induzirem a transformação neoplásica celular (MUNDAY et al., 2014; CANOVA et al., 2021). O papilomavirus bovino (BVP) é citado como um agente etiológico do papiloma de pele em bovinos, responsável por lesões cutâneas e mucosas, que podem regredir ou evoluir para lesões neoplásicas (BATISTA et al., 2013; SAVINI et al., 2016). Em carcinomas de células escamosas ocular, o BPV tem sido envolvido como precursor e responsável pelo desenvolvimento do neoplasma em bovinos (DMOCHOWSKI, 1967; TSUJITA & PLUMMER, 2010).

No estudo ultraestrutural realizado por Ford et al., (1982) de várias lesões oculares precursoras de carcinomas de células escamosas ocular, dentre elas placas conjuntivais, lesões acantóticas, papilomas conjuntivais e pálpebras e lesões proliferativas queratinizadas demonstraram um pequeno número de partículas que se assemelhavam a papilomavírus.

Anson et al., (1982) descreveram a tentativa de detecção de antígenos de herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e tipo 5 (BHV-5) em culturas de CCEO por meio de isolamento viral e imunofluorescência indireta. Das 31 amostras de tecidos neoplásicos oculares avaliadas, não foram isoladas agentes virais, sugerindo que o isolamento prévio BHV 1 em outros estudos possivelmente eram vírus passageiros. Em amostras submetidas a imunofluorescência indireta as culturas de células tumorais testadas com soro anti-BHV-5 apresentaram áreas de fluorescência perinuclear aumentada que se estendia para o citoplasma, principalmente após a situações de estresse como radiação UV e aumento de pH (8,4), sugerindo que a situação de estresse induziu o genoma viral a produzir antígenos virais *in vitro*.

Em um estudo recente com dez amostras de CCEO de bovinos submetidos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para papiloma genérico e herpesvírus genérico foram negativos, sugerindo que a etiologia de CCEO pode não ter associação viral (FORNAZARI et al., 2017).

Em bovinos, vírus da leucose bovina (BLV) são uns dos principais agentes precursores envolvidos no desenvolvimento neoplásico nessa espécie (MARAWAN et al., 2021). O vírus da leucose bovina (BLV) é o agente etiológico da leucose enzoótica bovina (LEB), uma enfermidade amplamente distribuída nos rebanhos leiteiros e responsável pelo desenvolvimento de linfomas em órgãos incluindo olhos, linfonodos, baço, fígado, rim, coração, medula espinhal, útero e úbere (LEONEL, 2018). A capacidade oncogênica do BLV está relacionada ao oncogene *tax*, o qual tem a capacidade de regular as proteínas virais e também genes do hospedeiro (GRASSMANN et al., 2005; GILLET et al., 2016).

Em bovinos durante a infecção natural pelo BLV, o vírus é encontrado em maior quantidade no epitélio mamário do que nos linfócitos, direcionando um possível tropismo tecidual (BUEHRING et al., 1994). Em humanos, sequências de nucleotídeos do gene *env* do BLV foram encontradas no DNA extraído do tecido mamário neoplásico e se agrupou em G1, que é o genótipo mais prevalente em amostras de gado (CANOVA et al., 2021).

### 2.3 GÊNERO E IDADE

Em estudos realizados por Blackwell et al. (1956) não houve diferença aparente que relacione que a incidência de carcinoma ocular seja maior em fêmeas do que em machos. A incidência de carcinoma ocular é observada principalmente em vacas. Por motivos econômicos, a fêmea permanece na propriedade até a idade adulta, ao contrário dos machos, que são abatidos ou comercializados antes mesmo de atingir a idade para o desenvolvimento das lesões (TSUJITA & PLUMMER, 2010).

O carcinoma ocular tem sido observado em bovinos com idade entre 6 e 9 anos (BLACKWELL et al., 1956; RUSSEL et al., 1976), podendo acometer animais com idade inferior (GUILBERT et al., 1948). Durante o período de um ano Woodward & Knapp (1950) observaram a incidência de carcinoma ocular em bovinos Hereford, onde notou-se que houve um aumento significativo de incidência neoplásica de olho em bovinos com cinco anos de idade e depois voltou a repetir-se aos sete anos. Dos 1566 bovinos avaliados, apenas duas vacas apresentaram carcinoma ocular aos três anos de idade.

Entre 2.087 bovinos da raça Hereford observados, Vogt & Anderson (1964) constataram também que a frequência das lesões aumenta com o decorrer da idade, observados

principalmente nas idades superiores a 40 meses. Essa faixa etária observada em bovinos que desenvolvem carcinoma ocular pode ser consequência da exposição prolongada a agentes que induzem neoplasias, alterações imunológicas e bioquímicas que aumentam com o decorrer da idade (TSUJITA & PLUMMER, 2010).

## 2.4 CONDIÇÃO NUTRICIONAL

Um estudo realizado por Anderson et al., (1970) durante um período de 15 anos, bovinos foram submetidos a diferentes dietas de inverno. Com avançar da idade juntamente com dietas de alto nível (farelo de algodão e aveia) foi observado um aumento no desenvolvimento de lesões. Bovinos em idades menores e submetidos a dieta de alto nível também demonstraram lesões progressivas do que aqueles que recebiam dietas de médio e baixo nível (somente farelo de algodão). A dieta de alto nível mostrou-se ter influência em diversas características, principalmente no aumento da patogênese e manifestação da lesão, diminuição da idade do início das lesões e diminuição da sobrevivência. Essas características indicam que há possivelmente um aumento na atividade fisiológica associado a uma dieta de alto nível, demonstrando que os animais manifestam lesões em idades mais precoces do que aqueles com um baixo nível nutricional.

## 2.5 ACHADOS CLINICOPATOLÓGICOS

Os carcinomas oculares em bovinos podem ocorrer em diferentes locais do olho, sendo os mais comuns a junção corneoescleral e terceira pálpebra (RUSSEL et al., 1956; TSUJITA & PLUMMER, 2010, FORNAZARI et al., 2017). Observa-se uma frequência maior de metástases em tumores originados das pálpebras do que os que se originam na córnea ou junção corneoescleral (TSUJITA & PLUMMER, 2010). Em um estudo realizado no Canadá com identificação de neoplasia em bovinos em abatedouros, metástase foram observadas em 11% dos bovinos com carcinoma invasivo de olho ou pálpebra (HAMIR & PARRY, 1989).

Os CCEO iniciam com lesões precursoras benignas que surgem na córnea, conjuntiva ocular (bulbar), conjuntiva palpebral e terceira pálpebra como placas e papilomas (TSUJITA & PLUMMER, 2010; DUBIELZIG, 2017).

De acordo com RUSSEL et al., (1956), as etapas de placa e papiloma e o CCEO são descritos como:

A primeira etapa é hiperplasia epitelial, caracterizada por ser uma lesão em placa, progredindo posteriormente para papiloma. As lesões em placas são observadas principalmente



ao longo da junção corneoescleral lateral ou medial e caracterizadas macroscopicamente por serem de coloração perolada, branco-acinzentado e com áreas de epitélio espesso, liso ou irregular. As lesões podem ser oblongas ou circulares.

Na junção corneoescleral (limbo) uma única placa pode assumir a conformação curvilínea e até mesmo coalescer e formar uma única massa espessa no epitélio. Esse espessamento pode acometer até um terço da superfície da córnea, devido principalmente a maior extensão lateral e a superfície lisa para o seu desenvolvimento. As placas têm consistência levemente firme mas podem ser duro devido a queratinização acentuada.

O padrão de crescimento das placas é variável e microscopicamente caracteriza-se principalmente por hiperplasia do epitélio, que pode envolver uma ou todas as camadas como estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo. A camada basal não apresenta alteração no início do espessamento, apenas áreas de infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos infiltrando o tecido conjuntivo subepitelial. A hiperplasia acentuada é mais frequente no estrato espinhoso e envolve estrato córneo.

O papiloma é um estágio intermediário no desenvolvimento do CCEO, caracterizado por ser de aspecto irregular com extremidades livres que se projetam para o exterior a partir de uma base, podendo fundir-se numa placa subjacente. As lesões podem ter até 3 cm de diâmetro. O local mais frequente de ocorrer os papilomas é na junção corneoescleral, principalmente na região lateral. Microscopicamente os papilomas apresentam projeções fibrosas com a vascularização na base da lesão direcionadas para fora e recobertos pelo epitélio. No epitélio normalmente observa-se acantose e a hiperqueratose varia de escassa a acentuada.

O CCEO pode iniciar diretamente a partir da placa ou seguir a sequência placa para papiloma, até se tornar maligno. O local mais comum de ocorrer os carcinomas invasivos é o limbo lateral, caracterizado por ser semelhante aos outros carcinomas escamosos, porém, sua superfície pode ser papilar, granular, ulcerada ou hemorrágica. Na córnea os carcinomas têm aspecto exofítico, podendo ser substituída pela massa neoplásica com obliteração da câmara anterior pela pressão ou invadida, afetando a câmara anterior, corpo ciliar e câmara posterior.

Os neoplasmas que se originam na terceira pálpebra se estendem e acometem a pálpebra adjacente, a conjuntiva palpebral e conjuntiva ocular. A neoplasia se estende e substitui toda a estrutura, com acometimento da cartilagem. Na conjuntiva ocular o carcinoma se estende afetando episclera, porém raramente acomete a esclera.

Os CCEO podem ser classificados de acordo com o grau de diferenciação celular, caracterizados microscopicamente pela intensidade de queratinização, diferenciação escamosa

e formação de ilhas de células neoplásicas e invasividade. Os CCEO bem diferenciados apresentam grandes pérolas de queratina e formação de grandes ilhas de células neoplásicas com diferenciação escamosa e sinais mínimos de invasão dos tecidos adjacentes. Os moderadamente diferenciados caracterizam-se pelo grau moderado de queratinização e diferenciação com aumento do número de células pouco diferenciadas, pérolas de queratina e formação de ilhas de células neoplásicas de tamanho pequeno a médio e pequenas ilhas de células neoplásicas invasivas ou não invasivas ao redor do tumor principal. Os CCEO pobremente diferenciados são neoplasias que consistem em queratinização de células individuais, algumas ilhas de células neoplásicas de pequeno porte, diferenciação celular deficiente e invasão profunda longe do tumor principal (CARVALHO et al., 2005; GHARAGOZLOU et al., 2007; DUBIELZIG, 2017).

### 3 REFERENCIAS

ANDERSON, D.E. Studies on bovine ocular squamous carcinoma (“cancer eye”): V. Genetic Aspects. **Journal of Heredity**. v.51, n. 2, p. 51-58, mar. 1960. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106951>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jhered/article-abstract/51/2/51/840091?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ANDERSON, D.E.; SKINNER, P.E. Studies on Bovine Ocular Squamous Carcinoma (“cancer eye”) XI. Effects of Sunlight. **Journal of Animal Science**. v. 20, n. 3, p. 474-477, ago. 1961. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1961.203474x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/20/3/474/4740272?redirectedFrom=PDF>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ANDERSON, D.E.; POPE, L.S.; STEPHENS, D. Nutrition and cancer in cattle. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 45, n. 4, p. 697-707, out. 1970. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/45.4.697>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article/45/4/697/981953>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ANDERSON, D.E., BADZIOCH, M. Association between solar radiation and ocular squamous cell carcinoma in cattle. **American Journal of Veterinary Research**. v. 52, n. 5, p. 784-788, mai. 1991. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1854107>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ANDERSON, D.E. Genetic study of eye cancer in cattle. **Journal of Heredity**. v. 82, n. 1, p. 21-26, jan. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/82.1.21>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jhered/article/82/1/21/971930?login=true>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ANSON, M.A.; BENFIELD, D.A.; MCADRAGH, J.P. Bovine herpesvirus-5 (DN-599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary Science**. v. 46, n. 3, p.334-337, jul. 1982. PMC1320334. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1320334/>. Acesso em: 27 nov. 2021.

BARROS, R.R.; RECH, R.R.; VIOTT, A.M.; BARROS, C.S.L. Carcinoma de células escamosas no olho de bovino com invasão cerebral através dos nervos cranianos. **Ciência Rural**. v.36, n. 5, p.1651-1654, out. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S010384782006000500051>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/cDgG7hvz5px5JpvTBNzsTJy/?lang=pt>. Acesso em: 27 nov. 2021.

BATISTA, M.V.; SILVA, M.A.; PONTES, N.E.; REIS, M.C.; CORTEGGIO.; A, CASTRO, R.S.; BORZACCHIELLO, G.; BALBINO, V.Q.; FREITAS, A.C. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **The Veterinary Journal**. v. 197, n. 2, p. 368-373, ago. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023313000427>. Acesso em: 27 nov. 2021.

BLACKWELL, R.L.; ANDERSON, D.E.; KNOX, J.H. Age incidence and heritability of cancer eye in Hereford cattle. **Journal of Animal Science**. v. 15, n. 4, p. 943-951, nov.1956.

DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1956.154943x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/15/4/943/4761635>. Acesso em: 27 nov. 2021.

BLUM, H.F. Carcinogenesis by Ultraviolet Light. Princeton University Press. Princeton, Nova Jersey, pp. 285-305, 1959.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P.M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**. v. 71, n. 3, set. 1994, p. 359-365. PMID: 7933986. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/7933986> . Acesso em: 27 nov. 2021.

CANOVA, R.; WEBER, M.N., BUDASZEWSKI, R.F., DA SILVA, M.S., SCHWINGEL, D., CANAL, C.W., KREUTZ, L.C. Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue is genetically related to the cattle vírus. **One Health**. v. 13, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100252>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771421000422?via%3Dihub>. Acesso em: 25 nov. 2021.

CARVALHO, T.; VALA, H.; PINTO, C.; PINHO, M.; PELETEIRO, M.C. Immunohistochemical Studies of Epithelial Cell Proliferation and p53 Mutation in Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma. **Veterinary Pathology**. v. 42, n. 1, jan. 2005, p. 66-73. DOI:10.1354/vp.42-1-66. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.42-1-66>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

CARVALHO, F.K.L.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F.; MIRANDA NETO, E.G.; SIMÕES, S.V.D.; AZEVEDO, S.S. Fatores de risco associados à ocorrência de carcinoma de células escamosas em ruminantes e equinos no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.9, set. 2012, p.881-886. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000900012>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/Z9cXFjGMYH339DmC4CxVCBz/?lang=pt>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

COULTER, L.K.; WOLBER, R.; TRON, V.A. Site-specific comparison of p53 immunostaining in squamous cell carcinomas. **Human Pathology**. v. 26, n. 5, mai. 1995, p. 531–533. DOI: [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90249-X](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90249-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004681779590249X>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

DMOCHOWSKI, L. Viruses and Tumors: The electron microscope is proving to be a powerful tool for study of viruses and virus-induced tumors. **Science (American Association for the Advancement of Science)**. v. 133, n. 3452, fev. 1961, p. 551-561. DOI: 10.1126/science.133.3452.551. Disponível em: <https://www.scienceorg.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/epdf/10.1126/science.133.3452.551>. Acesso em: 30 nov. 2021.

DUBIELZIG, R.R. Tumors of the eye. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5th. Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017. p. 892-922.

FORD, J.N.; JENNINGS, P.A.; SPRADBROW, P.B.; FRANCIS, J. Evidence for papillomaviruses in ocular lesions in cattle. **Research in Veterinary Science**. v. 32, n.2, p. 257-259, mar. 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32425-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32425-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0034528818324251?via%3Dihub>. Acesso em: 30 nov. 2021.

FORNAZARI, G.A.; KRAVETZ, J.; KIUPEL, M.; SLEDGE, D.; FILHO, I.R.B.; MONTIANI-FERREIRA, F. Ocular squamous cell carcinoma in Holstein cows from the South of Brazil. **Veterinary world**. v. 10, n. 12, dez. 2017, p. 1413-1420. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1413-1420>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5771165/>. Acesso em: 30 novembro 2021.

GALERA, P.D.; MARTINS, E.A.N. Ceratectomia superficial em carcinoma de células escamosas ocular em bovino Simental: Relato de caso. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53, n. 5, out. 2001, p. 585-588. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000500013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/zws8WvdQTs9YMb7Zk7tw3Ls/?lang=pt>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

GARCÍA, J.A.; QUINTEROS, C.; ROMERO, A.; DUTRA, F. Occurrence of squamous cell carcinoma in Milchschaaf sheep in Uruguay. **Ciência Rural**. v. 48, n. 01, 2018. DOI: [doi.org/10.1590/0103-8478cr20170406](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170406). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170406>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

GHARAGOZLOU, M.J.; HEKMATI, P.; ASHRAFIHELAN, J. A clinical and histopathological study of ocular neoplasms in dairy cattle. **Veterinarski arhiv**. v. 77, n. 5, 2007, p. 409-426. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/24762>. Acesso em: 12 dezembro 2021.

GRASSMANN, R.; ABOUD, M.; JEANG, K.T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. **Oncogene**. v. 24, n. 39, p. 5976-5985, set. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208978>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1208978.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2021

GILLET, N.A.; HAMAIDIA, M.; DE BROGNIEZ, A.; GUTIERREZ, G.; RENOTTE, N.; REICHERT, M.; TRONO, K.; WILLEMS, L. Bovine leukemia virus small noncoding RNAs are functional elements that regulate replication and contribute to oncogenesis in vivo. **PLoS Pathogens**. v.12, n. 4, e1005588, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005588>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article/comments?id=10.1371/journal.ppat.100>. Acesso em: 24 nov. 2021.

GUILBERT, H. R.; WAHID, A.; WAGNON, K. A., GREGORY, P. W. Observations on pigmentation of eyelids of Hereford cattle in relation to occurrence of ocular epitheliomas. **Journal Animal Science**. v. 7, n. 4, nov. 1948, p. 426-429. DOI: <https://doi.org/10.2527/1948.74426x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/7/4/426/4785955>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

HAMIR, A.N.; PARRY, O.B. An abattoir study of bovine neoplasms with particular reference to ocular squamous cell carcinoma in Canada. **Veterinary Record**. v.106, n. 26, jun. 1980, p. 551-553. DOI: 10.1136/vr.106.26.551. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE8106545>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

HESSE, K.L.; FREDO, G.; GUIMARÃES, L.L.B.; REIS, M.O.; PIGATTO, J.A.T.; PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L. Neoplasmas oculares e de anexos em cães e gatos no Rio Grande do Sul: 265 casos (2009-2014). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 1, jan. 2015, p. 49-54. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100011>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pvb/a/swhYVByNnTyNZMLQgrVLmKB/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

HOLLHUMER, R.; MICHELOW, P.; WILLIAMS, S. Ocular surface squamous neoplasia: Population demographics, pathogenesis and risk factors. **African Vision and Eye Health**. v. 79, n. 1, a553, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.4102/aveh.v79i1.553>. Disponível em: <https://avehjournal.org/index.php/aveh/article/view/553/1230>. Acesso em: 24 nov. 2021.

JING, Y.; ZHOU, Q.; ZHU, H.; ZHANG, Y.; SONG, Y.; ZHANG, X.; HUANG, X.; YANG, Y.; NI, Y.; HU, Q. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**. v.17, n. 1, jan. 2019, p. 974-980. DOI: 10.3892/ol.2018.9647. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6312995/>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

LEONEL, M.S. Enzootic bovine leukosis. **OIE Terrestrial Manual**, v. 3, n. 1, p. 56, 2018.

LIU, D.P.; SONG, H.; XU, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. **Oncogene**. v. 29, n. 7, fev. 2010, p. 949. DOI: <http://dx-doi.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1038/onc.2009.376>. Disponível em: Gale Academic OneFile, [link.gale.com/apps/doc/A219655818/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=c998fa9e](http://link.gale.com/apps/doc/A219655818/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=c998fa9e). Acesso em: 11 dezembro 2021.

LUCENA, R.B.; RISSI, D.R.; KOMMERS, G.D.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J.C.; MACÊDO, J.T.; FLORES, M.M.; BARROS, C.S. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. **Journal Comparative Pathology**. v.145, n. 1, jul. 2011, p. 20-24. DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.11.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997510003324?via%3Dihub>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

MARÀ, M.; DI GUARDO, G.; VENUTI, A.; MARRUCHELLA, G.; PALMIERI, C.; DE RUGERIIS, M.; PETRIZZI, L.; SIMEONE, P.; RIZZO, C.; SALDA, L.D. Spontaneous Ocular Squamous Cell Carcinoma in twin goats: pathological and biomolecular studies. **Journal of Comparative Pathology**. v. 132, n. 1, p. 96-100, jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.06.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997504000817?via%3Dihub>. Acesso em: 24 novembro 2021.

MARAWAN, M.A.; ALOUFFI, A.; EL TOKHY, S.; BADAWEY, S.; SHIRANI, I.; DAWOOD, A.; GUO, A.; ALMUTAIRI, M.M.; ALSHAMMARI, F.A.; SELIM, A. Bovine leukaemia virus: current epidemiological circumstance and future prospective. **Viruses**. v. 13, n. 111, p. 2167, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13112167>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/11/2167/htm>. Acesso em: 23 nov. 2021.

MUNDAY, J.S. Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. **Veterinary Pathology**. v. 51, n. 6, p. 1063-1075, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985814537837>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985814537837>. Acesso em: 24 nov. 2021.

NEWTON, R.; FERLAY, J.; REEVES, G.; BERAL, V.; PARKIN, D.M. Effect of ambient solar ultraviolet radiation on incidence of squamous-cell carcinoma of the eye. **American Journal of Ophthalmology**. v. 122, n. 4, out. 1996, p. 606. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)72142-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)72142-7). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939414721427>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

ORAM, Y.; ORENGO, I.; BAER, S.C.; OCAL, T. p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 31, n.1, set. 1994, p. 417-422. DOI: /10.1016/S0190-9622(94)70203-9. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0190962294702039>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**. v. 14, n. 1, p. 1-16, nov. 2017. DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669023/>. Acesso em: 02 dez. 2021.

PUGLIESE, M.; MAZZULLO, G.; NIUTTA, P.P.; PASSANTINO, A. Bovine ocular squamous cellular carcinoma: a report of cases from the Caltagirone area, Italy/Skvamocelularni karcinom oka u goveda: prikaz slucajeva u okolici grada Caltagirone u Italiji. **Veterinarski Arhiv**. v. 84, n. 5, set-out. 2014, p. 449. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A387230935/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=0fb4e050>. Acesso em: 12 dezembro 2021.

RAMOS, A.T.; NORTE, D. M.; ELIAS, F.; FERNANDES, C.G. Squamous cell carcinoma in cattle, sheep and horse: study of 50 cases in south of Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 44 (supl.), 2007, p. 5-13. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26583>. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26583>. Acesso em: 15 dezembro 2021.

RUSSELL, W.O.; WYNNE, E.S.; LOQUVAM, G.S.; MEHL, D.A. Studies on bovine ocular squamous carcinoma (cancer Eye). I. Pathological anatomy and historical review. **Cancer**. v. 9, n.1, jan/fev. 1956, p. 1-52. Disponível em: [https://doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1002/1097-0142\(195601/02\)9:1<1::AID-CNCR2820090102>3.0.CO;2-Z](https://doi.org.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1002/1097-0142(195601/02)9:1<1::AID-CNCR2820090102>3.0.CO;2-Z). Acesso em: 20 novembro 2021.

RUSSELL, W.C.; BRINKS, J.S.; KAINER, R.A. Incidence and Heritability of Ocular Squamous Cell Tumors in Hereford Cattle. **Journal of Animal Science**. v. 43, n. 6, dez. 1976, p. 1156–1162. DOI: 10.2527/jas1976.4361156x. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/articleabstract/43/6/1156/4700366?redirectedFrom=PDF>. Acesso em: 20 novembro 2021.

SAVINI, F.; MANCINI, S.; GALLINA, L.; DONATI, G.; CASÀ, G.; PELI, A.; SCAGLIARINI, A. Bovine papillomatosis: First detection of bovine papillomavirus types 6, 7, 8, 10 and 12 in Italian cattle herds. **Veterinary Journal**. v. 210, abr. 2016, p. 82-84. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.02.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023316000344?via%3Dihub>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

SCHULZ, K.L.; ANDERSON, D.E. Bovine enucleation: A retrospective study of 53 cases (1998–2006). **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**. v. 51, n. 6, jun. 2010, p. 611-614. PMID: 20808572. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871356/>. Acesso em: 20 nov. 2021.

SILVA R.G.; LA SCALA JR. N.; POYAY, P.L.B. Transmissão de Radiação Ultravioleta Através do Pelame e da Epiderme de Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 6,

dez. 2001, p. 1939-1947. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000700034>.  
Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/dBTbRF4BMRcsK3xxrqySyRB/?lang=pt#>.  
Acesso em: 10 dezembro 2021.

TEIFKE, J.P.; LÖHR, C.V. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. **Journal Comparative Pathology**. v. 114, n. 2, fev. 1996, p. 205-210. DOI: 10.1016/s0021-9975(96)80010-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997596800107?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dezembro 2021.

TROSKO, J.E.; KRAUSE, D.; ISOUN, M. Sunlight-induced pyrimidine dimers in human cells in vitro. **Nature**. v. 228, jan. 1970, p. 358-359. DOI: <https://doi.org/10.1038/228358b0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/228358b0>. Acesso em: 10 dezembro 2021.

TSUJITA, H.; PLUMMER, C.E. 2010. Bovine ocular squamous cell carcinoma. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 26, n. 3, p. 511-529, nov. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749072010000368?via%3Dihub>. Acesso em: 20 novembro 2021.

VAN DER POLS, J.; XU, C.; BOYLE, G.; PARSONS, P.; WHITEMAN, D.; GREEN, A. Expression of p53 Tumor Suppressor Protein in Sun-exposed Skin and Associations with Sunscreen Use and Time Spent Outdoors: A Community-based Study. **American Journal of Epidemiology**. v. 163, n. 11, jun. 2006, p. 982-988. DOI: 10.1093/aje/kwj137. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article/163/11/982/168455>. Acesso em: 20 novembro 2021.

VOGT, D.W.; ANDERSON, D.E. Studies on bovine ocular squamous carcinoma ("cancer eye"). XV. Heritability of susceptibility. **Journal of Heredity**. v. 55, n. 3, mai. 1964, p. 133-135. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107311. Disponível em: <https://academic.oup.com/jhered/article-abstract/55/3/133/781613>. Acesso em: 20 novembro 2021.

WOODWARD, R.R.; KNAPP, B. The hereditary aspect of eye cancer in Hereford cattle. **Journal Animal Science**. v. 9, n. 4, nov. 1950, p.578-81. DOI: 10.2527/jas1950.94578x. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/9/4/578/4728627>. Acesso em: 17 dezembro 2021.

WUNSCH, M.; NEUMEIER, M.; UTPATEL, K.; REICHERT, T.E.; ETTL, T.; SPANIER, G. Staging more important than grading? Evaluation of malignancy grading, depth of invasion, and resection margins in oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**. v. 25, n. 3, mar. 2021, p. 1169-1182. DOI: 10.1007/s00784-020-03421-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-020-03421-2#citeas>. Acesso em: 09 dezembro. 2021.



#### **4 JUSTIFICATIVA E FORMULAÇÃO DO PROBLEMA**

A frequente ocorrência de Carcinomas de células escamosas ocular em bovinos na raça Holandesa leva a hipótese que vários fatores estariam envolvidos na patogênese da neoplasia. Deste modo, para melhor compreensão da patogênese dessa enfermidade é necessário avaliar o possível agente causal através de métodos de identificação do DNA viral, como papilomavirus bovino (BPV) e vírus da leucose bovina (BLV). Nas propriedades onde a enfermidade ocorre torna-se necessário estudar a origem genética e observar a possível relação desses carcinomas oculares com características fenotípicas de vacas que apresentam esclera e conjuntiva ocular expostas com maior exposição a luz solar e de vacas cuja a esclera e conjuntiva ocular são protegidas pelas pálpebras. A elucidação da possível participação de agentes virais oncogênicos e a predisposição para uma determinada linhagem genética na formação do Carcinoma ocular trará excelentes benefícios econômicos para criadores da raça Holandesa.

#### **5 HIPÓTESES**

A alta incidência de Carcinomas de células escamosas ocular em vacas da raça Holandesa em propriedades leiteiras é estimulado por vírus oncogênicos como papilomavirus bovino (BPV).

A alta incidência de Carcinomas de células escamosas ocular em vacas da raça Holandesa em propriedades leiteiras é estimulado por radiação ultravioleta.

As características genéticas/fenotípicas são um dos fatores determinantes ao aparecimento do Carcinomas de células escamosas ocular em vacas da raça Holandesa.

#### **6 OBJETIVOS**

Objetivo Geral:

Avaliar o aparecimento do Carcinomas de células escamosas ocular sobre linhagem de vacas da raça Holandesa que, por alteração anatômica possuem esclera e conjuntiva ocular com maior exposição a luz solar e comparar a ocorrência desses neoplasmas em vacas da raça Holandesa de linhagem com esclera e conjuntiva ocular protegidas pela pálpebra;

detectar a presença do papilomavirus bovino (BPV) em amostras de Carcinomas de células escamosas ocular em vacas da raça Holandesa e avaliar sua possível relação na etiologia do neoplasma.

Objetivos Específicos:

Correlacionar as características fenotípicas em bovinos fêmea da raça Holandesa com o aparecimento/desenvolvimento do Carcinoma de células escamosas ocular;

avaliar a expressão do marcador Ki67 e correlacionar sua expressão e as características histológicas em Carcinoma de células escamosas ocular em vacas da raça Holandesa;

correlacionar a presença do papilomavirus bovino (BPV) em amostras com Carcinoma de células escamosas ocular e de amostras de terceira pálpebra sem alteração macroscópica em bovinos fêmea da raça Holandesa.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### Comitê de ética

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) protocolada sob o nº 8198130319.

### 7.1 Epidemiologia

Durante um período de estudo de quatro anos (2017 à 2021) um total de 16 vacas da raça Holandesa preto e branco foram avaliadas. As vacas eram provenientes de oito propriedades leiteiras localizadas nos estados de Santa Catarina e Paraná. Foram registrados localização geográfica e altitude do município, idade, sexo, condição corporal dos bovinos e sistema de criação.

### 7.2 Caracterização clinicopatológicas

Para avaliação macroscópica foram avaliadas as características anatômicas oculares como a exposição da conjuntiva ocular e esclera e a pigmentação da conjuntiva ocular/esclera e região palpebral (Fig1). Características do tumor ocular como localização, tamanho, forma, coloração e metástase foram determinadas para a classificação macroscópica.

As amostras foram coletadas através da biopsia excisional, uma parte fixada em formalina tamponada (48 horas) e processadas rotineiramente para avaliação em microscopia óptica através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e outra metade foram armazenadas a temperatura de -10°C e posteriormente encaminhadas para a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A classificação histológica foi realizada de acordo com Carvalho et al. (2005) e Sistema de Classificação de Broders (1925) com modificações.

### 7.3 Imunohistoquímica (IHQ)

Nove amostras embebidas em parafina foram submetidos ao Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para avaliação Imunohistoquímica (IHQ) para Ki67. Os blocos de tecido foram cortados em seções de 3 µm e montados em lâminas de microscópio revestidas com silano. A recuperação do antígeno foi

realizada com Tampão Tris-EDTA (pH 9,0) a 96°C por 30 minutos. As seções foram então incubadas em solução de metanol:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (97%:3%) por 20 min para bloquear a ligação não específica. Os cortes foram fixados a 37°C por 2 horas com anticorpo monoclonal primário anti-Ki67 pronto para uso (Clone MIB-1, Dako®, Carpinteria, CA, EUA) ou solução salina tampão fosfato (PBS) como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se um linfonodo bovino normal. Em seguida, os cortes foram submetidos ao polímero secundário EnVision™ (Dako®, Carpinteria, CA, EUA) em estufa a 37°C por 30 minutos. O desenvolvimento foi feito com cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation®, Carpinteria, Califórnia) por 2 minutos. Os cortes histológicos foram contraincolorados com hematoxilina de Harris e cobertos com lamínula.

A avaliação da IHQ foi realizada de acordo com Carvalho et al. (2005) com modificações. Em cada amostra, a contagem de núcleos positivos e negativos para um mínimo de 500 células neoplásicas foram contados em 10 campos representativos de alta potência para determinar a proporção de núcleos rotulados. Para pontuação, foi dada preferência às áreas com coloração mais intensa e homogênea. O índice de proliferação ou proporção de positivo células neoplásicas foi calculado em cada neoplasma e expresso em porcentagem. Correlação estatística dos índices de proliferação entre os três diferentes grupos de diferenciação - bem, moderado e pobremente diferenciado - e expressão do marcador Ki67 foi realizado usando teste de coeficiente de correlação de Pearson (*r*).

#### 7.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Quatro das dezesseis (4/16) amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso para realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de BPV (papilomavírus bovino) e doze (12/16) amostras ao Laboratório de Virologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a PCR para detecção de BPV (papilomavírus bovino). E BLV (vírus da leucose bovina).

Posteriormente, amostras de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas e de foram obtidas de quinze (n=15) fêmeas híbridas da raça Holandesa de um estabelecimento de abate localizado na cidade de Pouso Redondo, Planalto Catarinense (27°15'29"49"56'02") e encaminhadas para realização da técnica de PCR para BPV (papilomavirus bovino) e BLV

(vírus da leucose bovina) no Laboratório de Virologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 7.5 Extração do DNA e PCR

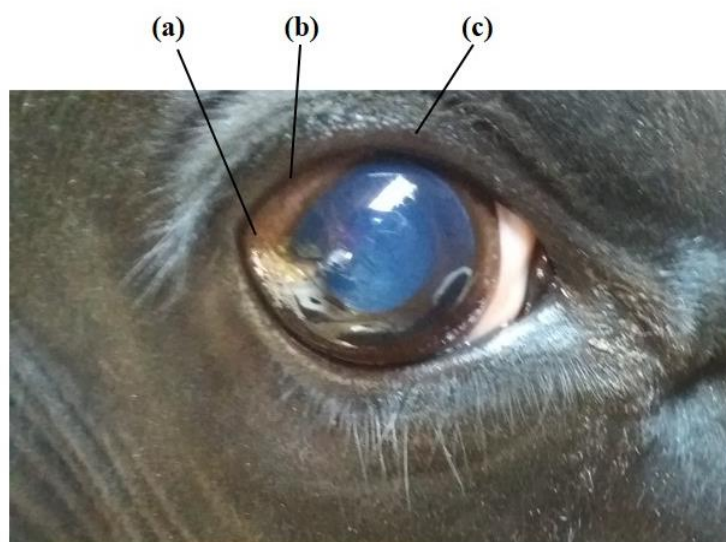
A extração do DNA genômico e a técnica da PCR utilizada para papilomavirus nas quatro das dezesseis amostras de CCEO foram de acordo com Ogawa et al. (2004), na qual as amostras de DNA foram amplificadas usando dois pares de *primers* FAP59/FAP64 e MY11/MY09.

Nas doze amostras de CCEO e nas 15 amostras de terceira pálpebra a extração do DNA genômico e a técnica da PCR para detecção de um fragmento de 446 pb do gene *env* do BLV e do fragmento de 480 pb do gene L1 do BPV foram de acordo com a metodologia utilizada por Rodakiewicz et al. (2018) e Forslund et al. (1999), utilizando os pares de *primers* OBLV1A/OBLV6A e FAP59 / FAP64, respectivamente.

### 7.6 Metagenômica viral (HTS)

Foi realizado um pool contendo 500µl de cada uma das 12 amostras. Esse pool foi passado por um filtro de 0.22µm e subsequentemente centrifugado com um gradiente de 25% de sacarose a 150,000 g por 3h a 4°C em um rotor Sorvall AH629. O pellet contendo as partículas virais foram incubados por 1.5 h com enzimas DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (THURBER et al., 2009). Posteriormente, o DNA e RNA total foram isolados utilizando protocolo fenol-clorofórmio e TRI reagente (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectivamente. O DNA viral foi enriquecido utilizando Genoplex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) kit (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi retrotranscrito em DNA utilizando TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification (WTA) (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA de fita dupla produzido desses enriquecimentos foram colocados em pool em quantidades equimolares e purificado utilizando PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR purification Combo (Thermo Fischer Scientific). A qualidade e a quantidade de DNA foi avaliada por espectrofotômetro e fluorometria através de NanoDrop™ (Thermo Fischer Scientific) e Qubit™ (Thermo Fischer Scientific), respectivamente. As bibliotecas de DNA foram preparadas com 50 ng de DNA purificado utilizando o kit Nextera XT DNA (Illumina V2 reagent kit) e sequenciado utilizando a plataforma Illumina MiSeq.

Figura 1- Características do olho bovino especificando as regiões anatômicas avaliadas no estudo.



(a) Conjuntiva ocular/esclera com menor proteção palpebral (exposta); (b) pigmentação da conjuntiva ocular; (c) pigmentação palpebral superior e inferior

## **8 CAPÍTULOS**

8. 1 CAPÍTULO 1: Pesquisa relacionada ao estudo epidemiológico, clinicopatológicos e estudo da proliferação celular através da Imunohistoquímica para o anticorpo Ki67 em Carcinomas de células escamosas ocular de vacas da raça Holandesa de estabelecimentos leiteiros nos estados de Santa Catarina e Paraná, Sul do Brasil.

O presente estudo já foi concluído e o manuscrito será apresentado a seguir.

Aspectos epidemiológicos, clinicopatológicos e estudo imunohistoquímico de proliferação celular epitelial de Carcinoma de células escamosas ocular em vacas da raça Holandesa

(Epidemiological aspects, clinicopathological and immunohistochemical study of epithelial cell proliferation of ocular squamous cell carcinoma in Holstein dairy cows)

Raissa Moreira de Moraes<sup>1</sup>

Aldo Gava<sup>2</sup>

## Abstract

Ocular squamous cell carcinoma is a malignant neoplasm of epithelial cells of the ocular tissue. During four years of study, eight Holstein dairy farms located in the states of Santa Catarina and Paraná, southern Brazil, were monitored in order to describe the occurrence of this neoplasm and its epidemiological and clinicopathological aspects. Characteristics of cows, farm, and climatic conditions were recorded. After the excisional biopsy, tumors were evaluated microscopically. In the present study, 16 eye tumors were evaluated. The affected cattle were female, aged between 4-9 years. The ocular lesions were located in the third eyelid (88%), the corneoscleral junction (6%), and between the third eyelid and corneoscleral junction (6%). Metastasis was observed in one case. Microscopically, 44% were well-differentiated squamous cell carcinoma, 31% moderately differentiated and 12.5% poorly differentiated. In two cases (12.5%) there were no neoplastic cells. Of the 16 eye tumors, nine were submitted to immunohistochemistry for Ki67, demonstrating positive staining. The occurrence of OSCC in Holstein cattle is related to solar radiation reinforced by genetic/phenotypic factors such as greater exposure of the sclera and ocular conjunctiva.

Keywords: ocular squamous cell carcinoma; cattle; epidemiology; pathology.

## Resumo

O carcinoma de células escamosas ocular é uma neoplasia maligna de células epiteliais do tecido ocular. Durante quatro anos de estudo, acompanhou-se oito propriedades leiteiras da raça Holandesa localizadas nos estados de Santa Catarina e Paraná, região Sul do Brasil com o objetivo de descrever a ocorrência dessa neoplasia e seus aspectos epidemiológicos e clinicopatológicos. Características das vacas, da propriedade e condições climáticas foram registradas. Após biópsia excisional, os tumores foram avaliados microscopicamente. No presente estudo foram avaliados 16 tumores oculares. Os bovinos acometidos eram fêmeas com idade entre 4 e 9 anos. Das 16 vacas, doze apresentaram conjuntiva ocular e esclera com menor proteção palpebral, duas com conjuntivas oculares e esclera protegidas e em duas não foi

---

<sup>1</sup>Artigo apresentado no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina no ano de 2022.

<sup>2</sup> Professor orientador



possível avaliar a esclera e conjuntiva ocular devido a invasão do neoplasma. As lesões oculares eram localizadas em terceira pálpebra (88%), junção corneoescleral (6%) e entre a terceira pálpebra e junção corneoescleral (6%). Metástase foi observado em um caso. Microscopicamente, em 44% era carcinoma de células escamosas bem diferenciados, 31% moderadamente diferenciados e 12,5% pobremente diferenciados. Em dois casos (12,5%) não foram observadas células neoplásicas. Das 16 amostras, nove foram submetidas à Imunohistoquímica para Ki67, demonstrando marcação positiva. A ocorrência do CCEO em bovinos da raça Holandesa está relacionada, principalmente, a maior incidência de radiação solar em linhagem de vacas que apresentam esclera e conjuntiva com menor proteção palpebral.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas ocular; bovino; epidemiologia; patologia.

## **Introdução**

O Carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) é uma neoplasia primária maligna de células epiteliais observada no tecido ocular (TSUJITA & PLUMMER, 2010; DUBIELZIG, 2017). Durante os últimos anos foi observado uma frequente ocorrência de neoplasma maligno em estruturas oculares de vacas Holandesas e que resultam em perdas econômicas para os produtores leiteiros da região Sul do Brasil.

O neoplasma inicia como lesões precursoras benignas como placas e papilomas na córnea, conjuntiva ocular e terceira pálpebra. O CCEO pode iniciar diretamente a partir da placa ou seguir a sequência placa para papiloma até se tornar maligno (RUSSELL et al., 1956; TSUJITA & PLUMMER, 2010). Em bovinos, esse neoplasma é um dos mais frequentes e responsável pela redução na vida reprodutiva, condenação de carcaças em abatedouros e a maior causa de enucleações entre as outras enfermidades oculares (BARROS et al., 2006; SCHULZ & ANDERSON, 2010; DUBIELZIG, 2017).

Um dos fatores relacionado ao aparecimento do Carcinoma de células escamosas (CCE) em humanos e animais é a exposição prolongada de raios ultravioletas (UV) em pele e estruturas despigmentadas e sem pelos, devido que a melanina atua como fotoprotetor nas regiões epidérmicas e mucosas (ANDERSON & SKINNER, 1961; NEWTON et al., 1996; HESSE et al., 2015; GARCÍA et al., 2018). Como carcinógeno, a radiação ultravioleta ocasiona mutação em genes, principalmente naqueles supressores de neoplasias como o gene supressor de tumor TP53 que é um gene regulador com função de controlar a integridade do genoma (HAINAUT & HOLLSTEIN et al., 1999; VAN DER POLS et al., 2006; LIU et al., 2010).

Características fenotípicas e genéticas são consideradas como prováveis fatores para o desenvolvimento do CCEO (ANDERSON, 1960). Bovinos com despigmentação em região periocular (coloração rósea) são mais suscetíveis a ocorrência do carcinoma ocular (TSUJITA & PLUMMER, 2010). Agentes virais precursores neoplásicos como herpesvírus bovino e papilomavirus bovino também foram associados ao aparecimento da neoplasia ocular (ANSON et al., 1982; FORD et al., 1982; TSUJITA & PLUMMER 2010).

A graduação histológica é uma das importantes ferramentas diagnósticas para prever o comportamento biológico e clínico da neoplasia (CHUNDAYIL MADATHIL et al., 2019; GHANGHORIA et al., 2019; WUNSCHER et al., 2021). O sistema de classificação Broders estabelece a graduação dos CCE de forma quantitativa baseado no percentual de diferenciação celular (BRODERS, 1925).

A proliferação celular é um dos mecanismos mais importantes no processo da oncogênese (VAN DIEST et al., 1998). A proteína Ki67 é vista no núcleo de células que estão em proliferação e sua expressão é um biomarcador confiável para identificação de células com intensa atividade proliferativa (CARVALHO et al., 2005; BONHIN et al., 2014; GADBAIL et al., 2021). Uma maior expressão de Ki67 é um indicador de células neoplásicas com maior proliferação e potencial invasivo local, tornando-se assim uma ferramenta na avaliação da agressividade biológica da neoplasia (AZARABAD et al., 2011; JING et al., 2019).

Baseado no que é descrito na literatura sobre Carcinoma de células escamosas ocular em bovinos, os objetivos deste estudo foram: relatar a epidemiologia, descrever as características clínicas e macroscópicas e avaliar a expressão do marcador Ki67 e correlacionar sua expressão e as características histológicas em vacas da raça Holandesa.

## **Material e métodos**

### **Comitê de ética**

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) protocolada sob o nº 8198130319.

### **Epidemiologia**

Durante um período de estudo de quatro anos (2017 à 2021) um total de 16 vacas da raça Holandesa preto e branco foram avaliadas. Os bovinos eram provenientes de oito propriedades leiteiras localizadas nos estados de Santa Catarina e Paraná, sul do Brasil. Foram registrados localização geográfica e altitude do município, idade, sexo, condição corporal dos bovinos e manejo.

#### Caracterização clinicopatológicas

Para avaliação macroscópica foram avaliadas as características anatômicas oculares como a exposição da conjuntiva ocular e esclera e a pigmentação da conjuntiva ocular e esclera e região palpebral. Características do tumor ocular como localização, tamanho, forma, coloração e metástase foram determinadas para a classificação macroscópica. As amostras foram coletadas através da biopsia excisional, fixadas em formalina tamponada (48 horas) e processadas rotineiramente para avaliação em microscopia óptica através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). A classificação histológica foi realizada de acordo com Carvalho et al. (2005) e Sistema de Classificação de Broders (1925) com modificações (Tab. 1).

A diferenciação nos CCEO foi avaliada de acordo com a diferenciação escamosa de células, presença e intensidade de queratinização e formação de ilhas de células neoplásicas. O escore mínimo (+) (Grau I) foi atribuída a neoplasias bem diferenciadas com diferenciação escamosa óbvia contendo numerosas pérolas de queratina e formação de grandes ilhas de tumor. O escore intermediário (++) (Grau II e III) atribui-se as neoplasias moderadamente diferenciadas com número aumentado de células pouco diferenciadas ainda com diferenciação escamosa, pequenas à médias pérolas de queratina e formação de ilhas menores de células neoplásicas. Para o escore máximo (+++) (Grau IV) foi atribuída a neoplasias pouco diferenciadas com o mínimo de diferenciação escamosa e queratinização celular individual; poucas e pequenas ilhas de tumor. Em relação a invasão do tecido, o escore mínimo (+) foi atribuído a invasão mínima dos tecidos circundantes; o escore moderado (++) quando a invasão era mais proeminente com as pequenas ilhas neoplásicas independentes ao redor do tumor principal e o escore máximo (+++) correspondeu a invasão profunda, longe do tumor principal. O índice mitótico foi avaliado com a contagem das figuras mitóticas em 10 campos de alta potência, variando de 0 a 2 (+), 3 a 6 (++) e >6 (+++).

## Imunohistoquímica (IHQ)

Nove amostras embebidas em parafina foram submetidos ao Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para avaliação Imunohistoquímica (IHQ) para Ki67. Os blocos de tecido foram cortados em seções de 3 µm e montados em lâminas de microscópio revestidas com silano. A recuperação do antígeno foi realizada com Tampão Tris-EDTA (pH 9,0) a 96°C por 30 minutos. As seções foram então incubadas em solução de metanol:H2O2 (97%:3%) por 20 min para bloquear a ligação não específica. Os cortes foram fixados a 37°C por 2 horas com anticorpo monoclonal primário anti-Ki67 pronto para uso (Clone MIB-1, Dako®, Carpinteria, CA, EUA) ou solução salina tampão fosfato (PBS) como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se um linfonodo bovino normal. Em seguida, os cortes foram submetidos ao polímero secundário EnVision™ (Dako®, Carpinteria, CA, EUA) em estufa a 37°C por 30 minutos. O desenvolvimento foi feito com cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation®, Carpinteria, Califórnia) por 2 minutos. Os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris e cobertos com lamínula.

## Avaliação da IHQ

Foi realizada de acordo com Carvalho et al. (2005) com modificações. Em cada amostra, a contagem de núcleos positivos e negativos para um mínimo de 500 células neoplásicas foram contados em 10 campos representativos de alta potência para determinar a proporção de núcleos rotulados. Para pontuação, foi dada preferência às áreas com coloração mais intensa e homogênea. O índice de proliferação ou proporção de positivo células neoplásicas foi calculado em cada neoplasma e expresso em porcentagem. Correlação estatística dos índices de proliferação entre os três diferentes grupos de diferenciação - bem, moderado e pobremente diferenciado - e expressão do marcador Ki67 foi realizado usando teste de coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

## Resultados

O estudo teve início no ano de 2017 com o acompanhamento de estabelecimentos de bovinos leiteiros nos estados de Santa Catarina e Paraná, Sul do Brasil. Ao total foram seis

municípios e oito estabelecimentos com o histórico de neoplasma ocular em vacas da raça Holandesa. No estado de Santa Catarina os estabelecimentos do estudo pertencem aos municípios de Urubici e Rio Rufino localizadas na Serra Catarinense, Joaçaba e Macieira situadas na Região Meio-Oeste e Abelardo Luz, Oeste do Estado. No estado do Paraná participaram duas propriedades localizadas no município de Renascença, Região Sudoeste do Estado (Fig. 1).

Todos os bovinos do estudo eram vacas da raça Holandesa preto e branco e mantidas em propriedades leiteiras de criação semi-intensivo. As condições ambientais nas áreas onde as fazendas leiteiras estão localizadas são amenas à quentes e secas no verão e outono e relativamente frio no inverno. A variação da temperatura está na faixa de 0-40C° e o período médio de luz solar diário ao longo do ano é de 8 a 10 horas. De acordo com as informações obtidas em todos os estabelecimentos do estudo, o neoplasma acometia principalmente vacas acima dos 4 anos sem predileção para a época do ano. Muitas das vacas acometidas apresentaram diminuição na produção de leite, principalmente quando o neoplasma afetava quase totalmente o globo ocular ou quando infiltrava.

No estado de Santa Catarina em 2017 foi realizado o acompanhamento nos municípios de Urubici (28° 00' 54" S 49° 35' 30" W) – propriedade 1 – e Rio Rufino (27° 51' 38" S 49° 46' 45" W) – propriedade 2 – com histórico de ocorrência do neoplasma há aproximadamente sete anos. Em 2018 iniciou o acompanhamento do terceiro estabelecimento do estudo, localizado no município de Abelardo Luz (26° 33' 53" S 52° 19' 42" W) e com histórico de ocorrência da enfermidade há no mínimo cinco anos. O quarto estabelecimento do estudo localizado em Urubici também apresentou casos no ano de 2019. Uma vaca com neoplasma ocular também apresentou aumento de volume exacerbado na vulva e úbere, diagnosticados posteriormente como carcinoma de células escamosas.

Em 2019 no estado do Paraná iniciou o acompanhamento de duas propriedades – 5 e 6 – localizadas no município de Renascença (26° 09' 29" S 52° 58' 08" W). Em ambos os estabelecimentos a neoplasia já ocorria há alguns anos e muitas vezes os bovinos eram encaminhados para o abate devido a evolução da enfermidade. Em 2020 no estado de Santa Catarina foram acompanhados dois estabelecimentos, um localizado no município de Joaçaba (27°10'41"S 51°30'17"W) – propriedade 7 – com o relato do primeiro caso da enfermidade na propriedade, e o segundo localizado em Macieira (26°51'20"S 51°22'41"W) – propriedade 8 –

na qual houve relato que o neoplasma regrediu durante a gestação, porém 90 dias após o parto retornou mais agressivo e com metástase em linfonodo regional.

#### Achados clinicopatológicos

De acordo com as informações obtidas a evolução dos neoplasmas foi de meses a anos. A idade das vacas variou de 4 e 9 anos. Das 16 vacas, doze apresentaram conjuntiva e esclera com menor proteção palpebral (expostas), duas com conjuntivas e esclera protegidas e em duas não foi possível visualizar por estarem cobertas pela massa tumoral. Três vacas apresentaram conjuntivas ocular pigmentadas, seis parcialmente pigmentadas, cinco despigmentadas e duas a massa tumoral cobriu e não foi possível visualizar. Dos 16 tumores, quatorze estavam presentes na terceira pálpebra, um na junção córneo e esclera e um entre a terceira pálpebra e junção corneoescleral e sete afetaram o olho esquerdo e nove o olho direito. Quatorze vacas apresentaram pigmentação em ambas as pálpebras (enegrecidas) e duas vacas com pálpebras parcialmente pigmentadas (branca com manchas escuras).

A macroscopia tumoral era caracterizada por crescimento em placas a verrucosos de tamanhos que variaram de alguns milímetros a vários centímetros (mínimo 0,8 cm e máximo 5 cm). Frequentemente era observado lacrimejamento no olho afetados, às vezes, com secreção purulenta. Em um dos casos foi observado metástase em linfonodo mandibular com fístula. As principais características clínicas e macroscópicas dos CCEO estão descritos na Tabela 2.

Das 16 amostras de tumores oculares estudadas, 14 foram classificadas como CCEO com distribuição nas categorias: sete bem diferenciadas, cinco moderadamente diferenciadas e duas pobremente diferenciadas. Duas amostras (7, 9) eram formadas microscopicamente por um intenso colágeno associado a hemorragia, cartilagem hialina e glândula superficial da terceira pálpebra (membrana nictitante). Dois CCEO (3, 4) apresentaram-se anaplásicos (pobremente diferenciados) com anisocariose acentuada, moderado à acentuado grau de invasão e moderada contagem mitótica. Outras três amostras (14, 15, 16) apresentaram uma alta contagem mitótica com baixo à moderado grau de diferenciação celular e invasão tecidual (Tab.3). Infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos foram observadas em quase todas as amostras (13/16). Duas amostras apresentaram necrose associado debris celulares e infiltrado inflamatório de neutrófilos e eosinófilos (13,16) (Fig. 2).

As nove amostras demonstraram expressão para Ki67. A imunocoloração para Ki67 foi heterogênea tanto na distribuição quanto na intensidade. O índice Ki67 variou de 27,42% à 59,23 nos CCEO bem diferenciado (valor médio 45,29%), 16,31 à 66% (valor médio 40,35%) nos CCEO moderadamente diferenciado e de 87% à 94,39% (valor médio 90,54%) nos CCEO pobremente diferenciado (Fig.3). Na análise de correlação do grau de diferenciação celular versus índice de proliferação celular, a significância estatística foi demonstrado ( $r=0,64$ ), ou seja, grau de diferenciação celular com o índice de proliferação celular (ki67) estão moderadamente relacionadas.

## Discussão

Durante os quatro anos de estudo foi possível constatar que o Carcinoma de células escamosas ocular é um importante neoplasma em bovinos da raça Holandesa e resulta em prejuízos econômicos diretos e indiretos para os produtores de leite.

Apesar do número baixo de amostras no presente estudo, produtores têm informado que a ocorrência desses tumores vem ocorrendo com maior frequência nos últimos anos. A alta prevalência de casos de CCEO descritos em outros países (TSUJITA & PLUMMER, 2010), também reflete a realidade observada no presente estudo, através do qual foi possível verificar que a neoplasia ocular em vacas Holandesas é mais prevalente do que é relatado. Geralmente os profissionais responsáveis pela sanidade dos animais da propriedade realizam a cirurgia para a remoção da massa tumoral ocular quando identificam o aumento de volume inicial, muitas vezes, ainda na fase de placa ou papiloma.

Como descrito em outros estudos, fatores ambientais como regiões com altitudes elevadas, maior incidência de raios ultravioletas, dias com horas luz solar mais prolongados e os aspectos fenotípicos da raça estão associados no desenvolvimento do CCEO (GHARAGOZLOU et al., 2007; PUGLIESE et al., 2014; FORNAZARI et al., 2017). Em relação as características ambientais das propriedades estudadas, é possível observar que apesar de estarem afastadas da Linha do Equador, ou seja, que a incidência de luz solar é menor, elas apresentam altitudes relativamente maiores – entre 525m e 915m – em comparação as outras regiões do país. Regiões que apresentam uma elevada altitude, isto é, quanto mais alta é a localidade, maior será a quantidade de energia ultravioleta incidente na superfície (INPE, 2021).

No presente estudo não foi observado esses tumores em regiões com altitudes menores que 500m.

O sistema de produção e o manejo realizado nos bovinos são outros fatores que devem ser considerados em relação aos estabelecimentos leiteiros e altitude do local estudados. O sistema semi-intensivo de produção empregada nas propriedades do estudo favorece um maior período com exposição direta da luz solar e de acordo com dados do Inpe (2021), a quantidade de energia de UV que chega na Terra é maior entre as horas 9 e 15 horas (cerca de 70% a 80%) e menor entre as 11 e 13 horas (cerca 20 a 30%). Em vacas mantidas em sistema intensivo não foi relatado a ocorrência do neoplasma.

Outra característica observada na incidência de CCEO em fêmeas da raça Holandesa também deve-se ao fato por serem de aptidão leiteira, os rebanhos são mantidos na propriedade até o final da vida produtiva, ao contrário dos machos, que são abatidos ou comercializados antes mesmo de atingirem a idade adulta (TSUJITA & PLUMMER, 2010). No presente estudo foi observado que a faixa etária das vacas acometidas com CCEO eram entre 4 e 9 anos, com idade média de 5 anos de idade. Essa maior incidência de CCEO em fêmeas acima dos 5 anos provavelmente é decorrente da permanência nos estabelecimentos até o fim da produtiva que contribui para a exposição a diversos fatores que possa resultar no processo neoplásico. Diversos estudos demonstram que a idade com maior incidência varia entre 7 e 9, com idade média também de 5 anos e relatos raros de ocorrência do neoplasma em animais com menos de 3 anos de idade (GHARAGOZLOU et al., 2007; TSUJITA & PLUMMER, 2010; FORNAZARI et al., 2017).

Como observado no estudo, o principal local do tumor ocular foi em terceira pálpebra (88%), seguido da junção corneoescleral (6%) e entre a terceira pálpebra e esclera (6%). Nossos resultados são semelhantes a Gharagozlou et al., (2007) e Fornazari et al., (2017) que identificaram 70% e 60% de CCEO na terceira pálpebra e conjuntiva adjacente, respectivamente, porém, não corroboram com estudos que indicam a terceira pálpebra como o local menos afetado (ANDERSON, 1960). Outros autores descrevem que em bovinos o desenvolvimento do carcinoma ocular é observado principalmente na conjuntiva lateral e junção corneoescleral (RUSSEL et al., 1956; ANDERSON, 1960; PUGLIESE et al., 2014).

De acordo com Russel e colaboradores (1956) a menor ocorrência de CCEO na conjuntiva medial é devido a proteção contra raios UV e corpos estranhos realizado pela terceira pálpebra. Na tabela 2 é possível observar que em 75% dos casos as vacas apresentavam a



conjuntiva ocular e esclera com menor proteção pálpebral em 12,5% a conjuntiva ocular e esclera estavam protegidas pela pálpebra. No estudo a maior incidência do neoplasma foi em terceira pálpebra. Acredita-se que linhagens de vacas que apresentam característica fenotípica de conjuntiva ocular e esclera com menor proteção palpebral, torna o local e a terceira pálpebra mais suscetíveis a ação de agentes carcinogênicos. Ressalta-se também para suscetibilidade da junção corneoescleral e terceira pálpebra para o desenvolvimento do CCEO a possível associação entre a conjuntiva ocular exposta sem a proteção palpebral e a despigmentação do local.

Na tabela 2 a maioria das vacas do estudo possuíam a conjuntiva ocular e esclera despigmentadas ou parcialmente pigmentada. A falta de melanina em regiões epidérmicas e mucosas torna o local suscetível a ação carcinogênica (NEWTON et al., 1996; GARCÍA et al., 2018). Apesar dessa característica de despigmentação conjuntival e escleral, no estudo apenas dois casos apresentaram o desenvolvimento neoplásico na junção corneoescleral. De acordo Anderson (1991) a pigmentação corneoescleral realiza um efeito protetor direto no desenvolvimento de lesões na junção corneoescleral.

Em 44% dos casos acometeram o olho esquerdo e 56% ocorreram no olho direito, o que está de acordo com Tsujita & Plummer (2010) onde ambos os olhos são frequentemente afetados em graus variáveis. Dos 16 tumores estudados, 44% apresentavam crescimento em placa com superfície verrucosa à papiloma exofítico e 37% das amostras eram caracterizados por nódulos hiperêmicos com superfície verrucosa e áreas queratinizadas. Apesar dessas características macroscópicas serem descritas na maioria das vezes como lesões precursoras benignas de CCEO (RUSSEL et al., 1956; TSUJITA & PLUMMER, 2010), 11 das amostras em estudo já apresentavam características de proliferação neoplásica epitelial maligna, ou seja, de carcinoma de células escamosas. É importante ressaltar que de acordo com o histórico clínico fornecido pelos produtores, três amostras de CCEO iniciaram como placas evoluindo para grandes massas verrucosas com áreas hemorrágicas e necróticas que cobriam praticamente todo o globo ocular.

Outros achados clinicopatológicos observados nas vacas do estudo foram metástase em linfonodo regional com fistulação e miíase (1/16). Apesar da característica invasiva dos CCEO, alguns autores descrevem que a probabilidade de fazer metástase dependerá da localização primária do neoplasma (TSUJITA & PLUMMER, 2010). Devido ao tecido ulcerado e necrótico que servem como alimento para larvas de moscas necrobiontófagos, não é incomum observar

miíase em neoplasias epidérmicas como os CCE, agravando o quadro clínico (YEUNG et al., 2010).

Por ser um neoplasma agressivo, o comportamento biológico do CCEO é variável e imprevisível. O uso da graduação histológica como o sistema de classificação Broders torna-se uma das principais ferramentas diagnósticas para predizer esse comportamento (CHUNDAYIL MADATHIL et al., 2019; GHANGHORIA et al., 2019). Em sete amostras de CCEO observou-se a formação de grandes ilhas de células neoplásicas associada a numerosas estruturas pérolas de queratina caracterizando assim os CCE bem diferenciados. Anisocitose e anisocariose acentuada das células neoplásicas com nucléolos grandes e proeminentes, deficiente diferenciação escamosa com células individualmente queratinizadas foram observadas em dois CCEO e classificados como pobremente diferenciado.

Em treze amostras de CCEO houve infiltrado inflamatório formados por linfócitos e plasmócitos distribuídos de forma multifocal entre as células neoplásicas. Supõe-se que essa resposta linfoplasmocitário entre as células seja uma resposta ao antígeno neoplásico (WILCOCK & NJAA, 2016). Áreas de necrose associado a neutrófilos, eosinófilos e debris celulares observadas em dois casos de CCEO foram compatíveis com a macroscopia de serem uma massa verrucosa firme, com crostas necróticas e secreção purulenta.

Em duas amostras do estudo que macroscopicamente eram em placa e nódulo, não foram observadas células neoplásicas. Em todas as coletas de terceira pálpebra foram realizadas biopsias excisionais, ou seja, foi retirado todo o tecido. A primeira etapa benigna do CCEO é a placa que se caracteriza microscopicamente por hiperplasia epitelial que pode envolver um ou todos estratos (RUSSEL et al., 1956; TSUJITA & PLUMMER, 2010), porém, nessas duas amostras observamos somente colágeno acentuado e estruturas histológicas da terceira pálpebra.

O índice Ki67 das nove amostras de CCEO foi significativamente correlacionado com o grau de diferenciação celular, na qual corrobora com os resultados de outros estudos que descrevem que os valores de índice de Ki67 mais altos em carcinomas oculares pobremente diferenciados em comparação com os carcinomas bem diferenciados. Como um biomarcador na identificação de células com intensa atividade proliferativa, a expressão da proteína Ki67 é uma ferramenta importante na avaliação da agressividade biológica do CCEO (CARVALHO et al., 2005; AZARABAD et al., 2011).

Além dos fatores ambientais, fenotípicos e genotípicos já discutidos, agentes virais como papilomavírus bovino e herpesvírus bovino são citados como precursores no

desenvolvimento do neoplasma em bovinos (DMOCHOWSKI, 1961; ANSON, et al., 1982; FORD et al., 1982). Em contrapartida, resultados negativos na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para papilomavírus e herpesvírus genérico em amostras de CCEO de bovinos sugerem que a etiologia do neoplasma pode não ter associação viral (FORNAZARI et al., 2017). Diante dessa possibilidade, neste estudo além dos aspectos epidemiológicos e clinicopatológicos dos CCEO foi realizado também a técnica de PCR para papilomavirus bovino com resultados negativos, o que reforça que a radiação é responsável pelo o desenvolvimento do carcinoma ocular de bovinos.

Em conclusão ao nosso estudo, destacamos 1) a ocorrência dos CCEO em bovinos da raça Holandesa está intimamente relacionado a radiação solar reforçadas por fatores genéticos/fenotípicos (principalmente em linhagens de vacas que anatomicamente apresentam esclera e conjuntiva ocular com menor proteção palpebral); 2) como em outros estudos com CCE, a graduação histológica em carcinoma ocular bovino é uma ferramenta válida para o entendimento do comportamento biológico e clínico do neoplasma; 3) o índice da expressão de Ki67 pode ser um marcador significativo para a classificação do CCEO; e 4) devido ao grande número do rebanho leiteiro da raça Holandesa, o carcinoma ocular é uma importante neoplasia para a raça e é responsável por grandes prejuízos para os produtores.

Tabela 1 – Características da classificação histológica das amostras de Carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) de acordo com Carvalho et al., (2005) e sistema de classificação de Broders com modificações

Diferenciação				Invasão		Mitoses	
Característica				Característica		Característica	
Sistema Broder							
Bem diferenciado +	Células neoplásicas com citoplasma eosinofílico abundante e diferenciação escamosa óbvia; desmossomos visíveis; grandes massas laminadas concêntricas de queratina (pérolas de queratina); anisocariose mínimo; formação de grandes ilhas de tumor	Grau I	<25% de células indiferenciadas	+	Invasão de derme e subcutânea com proliferação de tecido conjuntivo fibroso; mínimo de invasão dos tecidos circundantes	+	0-2
Moderadamente diferenciado ++	Células neoplásicas com citoplasma eosinofílico e diferenciação escamosa moderada; desmossomos pouco visíveis; pequenas á médias massa laminadas de queratina (pérolas de queratina); anisocariose moderada com hiper cromatismo; formação de ilhas menores de tumor	Grau II	<50% de células indiferenciadas	++	Invasão é mais proeminente com as pequenas ilhas de células neoplásicas independentes ao redor do tumor principal	++	3-6
		Grau III	<75% de células indiferenciadas				
Pobrementemente diferenciado +++	Células neoplásicas com citoplasma anfofílico, com deficiente diferenciação escamosa e queratinização celular individual; anisocariose acentuada com hiper cromatismo; poucas e pequenas ilhas de tumor	Grau IV	>75% de células indiferenciadas	+++	Células neoplásicas profundamente invasivas, aparecendo como células únicas ou pequenos grupos de células em uma matriz desmoplásica; longe do tumor principal	+++	>6

Fonte: Adaptado a Carvalho et al. (2005) e Sistema Broder.

Tabela 2 – Localização das propriedades e características clinicopatológicas de Carcinomas de células escamosas ocular (CCEO)

do estudo

Bovino		Achados clinicopatológicos					Propriedades do estudo	
	Idade (Anos)	Evolução clínica	Olho afetado	Cor e exposição da conjuntiva ocular e esclera/cor da pálpebra superior e inferior	Localização da lesão	Aparência da superfície do tumor	Cidade/Estado	Altitude
1	-	-	OE	Conjuntiva pigmentada /conjuntiva e esclera expostas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Junção corneoescleral	Nodular com superfície verrucosa, hiperêmico	Rio Rufino /SC	860m
2	-	6 meses	OD	Conjuntiva parcialmente pigmentada/conjuntiva e esclera expostas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Nodular com superfície verrucosa, hiperêmico	Rio Rufino /SC	
3	-	7 meses	OE	Conjuntiva parcialmente pigmentada/conjuntiva e esclera protegidas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Placa, hiperêmico	Urubici /SC	915m
4	-	NI	OD	Conjuntiva parcialmente pigmentada /conjuntiva e esclera expostas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra e junção corneoescleral	Placa verrucosa com área focal crostosa e queratinizada, hiperêmico	Urubici /SC	
5	9	NI	OE	Conjuntiva parcialmente pigmentada/ conjuntiva esclera exposta/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Placa verrucosa, hiperêmico <sup>c</sup>	Urubici /SC	

<sup>a</sup>Iniciou como placa <sup>b</sup>Metástase em linfonodo mandibular <sup>c</sup>Carcinoma de células escamosas em vulva e úbere <sup>d</sup>mífase NI = não informado  
 Fonte: Moraes (2022)

Tabela 2 – Localização das propriedades e características clinicopatológicas de Carcinomas de células escamosas ocular (CCEO)  
do estudo

							(continua)	
Bovino		Achados clinicopatológicos					Propriedades do estudo	
	Idade (Anos)	Evolução clínica	Olho afetado	Cor e exposição da conjuntiva ocular e esclera/cor da pálpebra superior e inferior	Localização da lesão	Aparência da superfície do tumor	Cidade/Estado	Altitude
6	4	NI	OE	Conjuntiva parcialmente pigmentada/conjuntiva e esclera expostas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Placa, hiperêmico		
7	4,5	NI	OE	Conjuntiva parcialmente pigmentada/conjuntiva e esclera protegidas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Placa com superfície lisa, hiperêmico		
8	4	NI	OD	Conjuntiva despigmentada/ conjuntiva e esclera exposta/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Placa e papilomatosa, hiperêmico	Abelardo Luz /SC	760m
9	4	NI	OD	Conjuntiva despigmentada/conjuntiva esclera exposta/ pálpebras superior parcialmente pigmentada e inferior pigmentada	Terceira pálpebra	Nodular com superfície verrucosa, hiperêmico		
10	4,5	NI	OD	Conjuntiva despigmentada/ conjuntiva e esclera exposta/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Nodular com superfície verrucosa, hiperêmico		
11	4	NI	OD	Conjuntiva despigmentada/conjuntiva e esclera exposta/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Nodular com superfície verrucosa, hiperêmico		

<sup>a</sup>Iniciou como placa <sup>b</sup>Metástase em linfonodo mandibular <sup>c</sup>Carcinoma de células escamosas em vulva e úbere <sup>d</sup>miíase NI = não informado

Tabela 2 – Localização das propriedades e características clinicopatológicas de Carcinomas de células escamosas ocular (CCEO)

do estudo

Bovino	Achados clinicopatológicos						(continuação) Propriedades do estudo	
	Idade (Anos)	Evolução clínica	Olho afetado	Cor e exposição da conjuntiva ocular e esclera/cor da pálpebra superior e inferior	Localização da lesão	Aparência da superfície do tumor	Cidade/Estado	Altitude
12	7	3 anos	OD	Conjuntiva pigmentada/ conjuntiva e esclera expostas/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Placa e papilomatoso com área focal queratinizada, hiperêmico	Renascença /PR	688m
13	8	4 meses	OE	Conjuntiva e esclera coberta pela massa tumoral/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Massa verrucosa com áreas queratinizadas multifocais, secreção purulenta e odor fétido <sup>a</sup>	Renascença /PR	
14	4,5	3 meses	OD	Conjuntiva despigmentada / conjuntiva e esclera exposta/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Massa verrucosa com áreas queratinizadas multifocais, hiperêmico	Joaçaba /SC	525m
15	7	1 mês	OD	Conjuntiva pigmentada / conjuntiva e esclera exposta/ pálpebras superior e inferior pigmentadas	Terceira pálpebra	Nodular com superfície verrucosa e áreas queratinizadas <sup>a</sup>	Macieira /SC	880 m

<sup>a</sup>Iniciou como placa <sup>b</sup>Metástase em linfonodo mandibular <sup>c</sup>Carcinoma de células escamosas em vulva e úbere <sup>d</sup>miíase NI = não informado  
Fonte: Moraes (2022)

Tabela 2 – Localização das propriedades e características clinicopatológicas de Carcinomas de células escamosas ocular (CCEO)

do estudo

Bovino	Achados clinicopatológicos						(conclusão)	
							Propriedades do estudo	
	Idade (Anos)	Evolução clínica	Olho afetado	Cor e exposição da conjuntiva e esclera/cor da pálpebra superior e inferior	Localização da lesão	Aparência da superfície do tumor	Cidade/Estado	Altitude
16	7	2 anos	OE	Conjuntiva e esclera coberta pela massa tumoral/ pálpebra superior e inferior parcialmente pigmentadas	Terceira pálpebra	Massa verrucosa com áreas queratinizadas multifocais, secreção purulenta e odor fétido <sup>abd</sup>	Macieira /SC	880 m

<sup>a</sup>Iniciou como placa <sup>b</sup>Metástase em linfonodo mandibular <sup>c</sup>Carcinoma de células escamosas em vulva e úbere <sup>d</sup>mífase NI = não informado

Fonte: Morais (2022)



Tabela 3 – Classificação histológica e Imunohistoquímica (IHQ) de Ki67 em Carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) de vacas

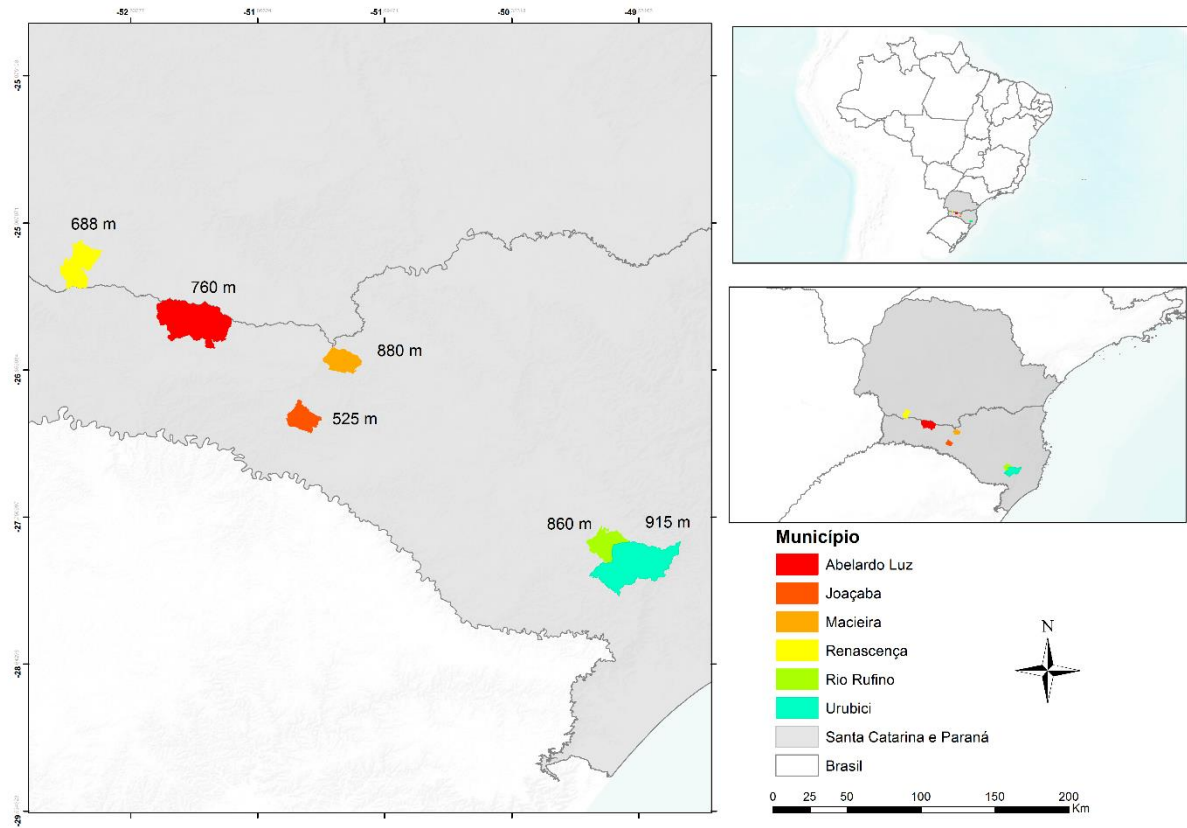
Holandesas

Amostras	Macroscopia		Achados histológicos <sup>a</sup>			Índice Ki67 (%)	Metástase/neoplasmas em outros locais
	Olho afetado	Localização da lesão	Diferenciação	Invasão	Mitoses		
1	OE	Junção corneoescleral	+	+	+	ND <sup>b</sup>	Não
2	OD	Terceira pálpebra	++	++	+	66	Não
3	OE	Terceira pálpebra	+++	+++	++	87	Não
4	OD	Terceira pálpebra e junção corneoescleral	+++	++	++	94	Não
5	OE	Terceira pálpebra	++	+	+	22	Sim
6	OE	Terceira pálpebra	++	+	+	ND	Não
7	OE	Terceira pálpebra	-	-	-	ND	Não
8	OD	Terceira pálpebra	+	+	+	ND	Não
9	OD	Terceira pálpebra	-	-	-	ND	Não
10	OD	Terceira pálpebra	+	+	+	ND	Não
11	OD	Terceira pálpebra	+	+	+	27	Não
12	OD	Terceira pálpebra	+	+	+	49	Não
13	OE	Terceira pálpebra	+	++	++	ND	Não
14	OD	Terceira pálpebra	++	++	+++	16	Não
15	OD	Terceira pálpebra	+	+	+++	59	Não
16	OE	Terceira pálpebra	++	++	+++	56	Sim

<sup>a</sup> + = mínimo; ++ = intermediário; +++ = máximo    <sup>b</sup> não determinado

Fonte: Moraes (2022)

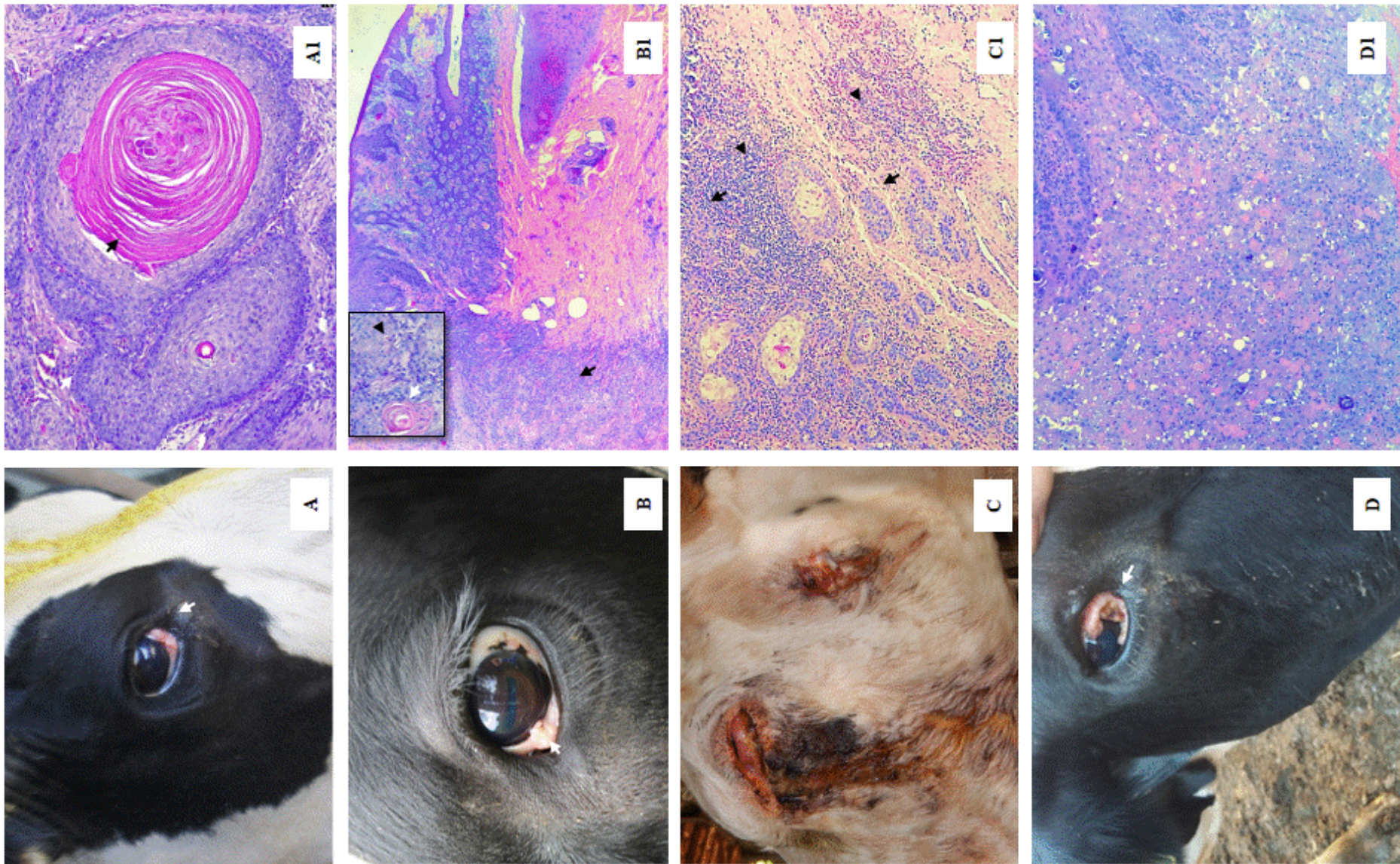
Fig. 1. Municípios e altitudes das propriedades do estudo



Fonte: Fonte: IBGE, 2022. Disponível em:  
[<http://geoftp.ibge.gov.br/organizacao\\_do\\_territorio/malhas\\_territoriais/malhas\\_municipais/municipio\\_2015/Brasil/BR/](http://geoftp.ibge.gov.br/organizacao_do_territorio/malhas_territoriais/malhas_municipais/municipio_2015/Brasil/BR/)>

Fig. 2. **Bovino.** **A.** Olho direito. Pigmentação palpebral superior e inferior, conjuntiva ocular/esclera desprotegidas e despigmentadas. Terceira pálpebra com lesão em placa oblonga com nódulos exofítico na superfície, hiperêmico (seta branca). A1. Carcinoma de células escamosas ocular bem diferenciado (Grau I). Há, células neoplásicas com citoplasma eosinofílico abundante com desmosomos visíveis e diferenciação escamosa; formação de grandes ilhas de células neoplásicas (seta branca) com estruturas laminadas concêntricas de queratina – pérolas de queratina - (seta preta) são evidentes. HE, 20x. **B.** Olho esquerdo. Pigmentação palpebral superior e inferior, conjuntiva ocular/esclera parcialmente pigmentadas e desprotegidas. Terceira pálpebra com lesão em placa com superfície verrucosa, hiperêmico (seta branca). B1. Carcinoma de células escamosas ocular moderadamente diferenciado (Grau II). Há, hiperplasia de epiderme com proliferação neoplásica de cordões e médias à pequenas ilhas de células epiteliais que invadem a derme (seta preta) HE, 10x. Detalhe. Carcinoma de células escamosas com células epidérmicas neoplásicas pleomórficas com atipia nuclear, pequenas formações de pérolas de queratina (seta branca) e diferenciação escamosas de algumas células (cabeça da seta) HE, 40x. **C.** Olho esquerdo. Despigmentação palpebral superior e inferior. Massa com superfície lisa e algumas áreas verrucosas na superfície, hiperêmica, secreção purulenta e com origem em terceira pálpebra. Na face lateral esquerda observa-se aumento de volume com secreção purulenta (fístula). C1. Carcinoma de células escamosas ocular moderadamente diferenciado (Grau II). Há, células com diferenciação escamosa moderada, formação de ilhas menores à medias de células neoplásicas (setas pretas) e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e de neutrófilos e eosinófilos em meio as células neoplásicas (cabeça das setas); a invasão é mais proeminente. HE, 20x. **D.** Olho direito. Pigmentação palpebral superior e inferior, conjuntiva ocular/esclera parcialmente pigmentadas e desprotegidas. Terceira pálpebra e junção corneoescleral com placa oblonga de superfície verrucosa com áreas de queratinização, hiperêmico (seta branca). D1. Carcinoma de células escamosas ocular pobremente diferenciado (Grau III). Há, pleomorfismo acentuado e hiperchromatismo das células epiteliais neoplásicas, com discreta (pobre) diferenciação escamosa, figuras de mitoses e células individualmente queratinizadas. HE, 20x.

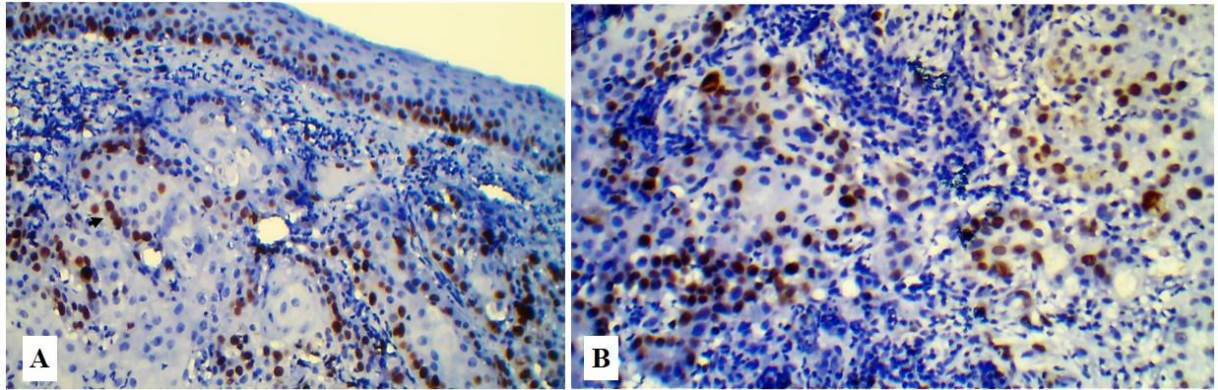




Fonte: Morais (2022)



Fig. 3. Bovino. Imunohistoquímica. **A.** CCEO bem diferenciado. A reação positiva para Ki67 é indicada pela presença de coloração nuclear (ponta de seta). **B.** CCEO pobremente diferenciado. Observe o aumento do número de células neoplásicas coradas em comparação a figura A.



Fonte: Morais (2022)

## Referências

- ANDERSON, D.E. Studies on bovine ocular squamous carcinoma ("cancer eye"): V. Genetic Aspects. **Journal of Heredity**. v. 51, n. 2, Mar-abr 1960, p. 51-58.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106951>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jhered/article-abstract/51/2/51/840091?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 11 dezembro 2021.
- ANDERSON, D.E.; SKINNER, P.E. Studies on Bovine Ocular Squamous Carcinoma ("Cancer Eye") XI. Effects of Sunlight. **Journal of Animal Science**. v. 20, n. 3, ago.1961, p. 474-477. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1961.203474x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas>. Acesso em: 11 dezembro 2021
- ANSON, M.A.; BENFIELD, D.A.; MCADRAGH, J.P. Bovine herpesvirus-5 (DN-599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**. v. 46, n. 3, p.334-337, jul. 1982. PMC1320334. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1320334/>. Acesso em: 27 novembro 2021.
- AZARABAD, H., GHARAGOZLOU, M., NOWROUZIAN, I., SEYEDJAVAD, M. P53 and Ki67 protein expression in ocular squamous cell carcinomas of dairy cattle. **Iranian Journal of Veterinary Medicine (International Journal of Veterinary Research)**. v. 5, n. 4, dez. 2011, p. 226-231. Disponível em: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=220683>. Acesso em: 11 dezembro 2011.
- BARROS, R.R.; RECH, R.R.; VIOTT, A.M.; BARROS, C.S.L. Carcinoma de células escamosas no olho de bovino com invasão cerebral através dos nervos cranianos. **Ciência Rural**. v.36, n. 5, out. 2006, p.1651-1654. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000500051>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/cDgG7hvz5px5JpvTBNzsTJy/?lang=pt#>. Acesso em: 11 dezembro 2021.
- BONHIN, R.G.; CARVALHO, G.M.; GUIMARÃES, A.C.; CHONE, C.T.; CRESPO, A.N.; ALTEMANI, A.M.; AMSTALDEN, E.M. Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. v. 80, n. 4, jul-ago. 2014, p. 290-295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.05.016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjorl/a/Yhc7LgRBPpmcsxzQLQ5q4bh/abstract/?lang=en>. Acesso em: 11 dezembro 2021.
- BRODERS, A.C. Cancer's Self-Control, M. J. & Rec., 1925. p. 133-135.
- CARVALHO, T.; VALA, H.; PINTO, C.; PINHO, M.; PELETEIRO, M.C. Immunohistochemical Studies of Epithelial Cell Proliferation and p53 Mutation in Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma. **Veterinary Pathology**. v. 42, n. 1, jan. 2005, p. 66-73. DOI:10.1354/vp.42-1-66. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.42-1-66>. Acesso em: 11 dezembro 2021.
- CHUNDAYIL MADATHIL, G.; IYER, S.; THANKAPPAN, K.; GOWD, G.S.; NAIR, S.; KOYAKUTTY, M. A Novel Surface Enhanced Raman Catheter for Rapid Detection, Classification, and Grading of Oral Cancer. **Advanced healthcare materials**. v. 8, n. 13, jul. 2019. DOI: 10.1002/adhm.201801557. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.201801557>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

DUBIELZIG, R.R. Tumors of the eye. *In*: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5th. Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017. p. 892-922.

FORD, J.N.; JENNINGS, P.A.; SPRADBROW, P.B.; FRANCIS, J. Evidence for papillomaviruses in ocular lesions in cattle. **Research in Veterinary Science**. v. 32, n.2, p. 257-259, mar. 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32425-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32425-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0034528818324251?via%3Dihub>. Acesso em: 30 novembro 2021.

FORNAZARI, G.A.; KRAVETZ, J.; KIUPEL, M.; SLEDGE, D.; FILHO, I.R.B.; MONTIANI-FERREIRA, F. Ocular squamous cell carcinoma in Holstein cows from the South of Brazil. **Veterinary world**. v. 10, n. 12, dez. 2017, p. 1413-1420. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1413-1420>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5771165/>. Acesso em: 30 novembro 2021.

GADBAIL, A.R.; SARODE S. C.; CHAUDHARY, M. S.; GONDIVKAR, S. M.; TEKADE S. A.; YUWANATI M.; PATIL, S. Ki67 Labelling Index predicts clinical outcome and survival in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Applied Oral Science**. v. 29, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0751>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jaos/a/jGJfPxjNZ4mNRRGFQgXPj6g/>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

GARCÍA, J.A.; QUINTEROS, C.; ROMERO, A.; DUTRA, F. Occurrence of squamous cell carcinoma in Milchschaaf sheep in Uruguay. **Ciência Rural**. v. 48, n. 01, 2018. DOI: [doi.org/10.1590/0103-8478cr20170406](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170406). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170406>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

GHANGHORIA, S.; JAISWAL, S.; KIYAWAT, P.; GHANGHORIA, A. Comparison of Anneroth's and Broder's grading systems in oral squamous cell carcinoma- A 5 year study. **Journal of Medical Science and Clinical Research**. v. 79, n. 54, fev. 2019, p. 2455-0450. DOI: <https://dx.doi.org/10.18535/jmscr/v7i2.124>. Disponível em: <http://www.jmscr.igmpublication.org/v7-i2/124%20jmscr.pdf>. Acesso em: 30 novembro 2021.

GHARAGOZLOU, M.J.; HEKMATI, P.; ASHRAFIHELAN, J. A clinical and histopathological study of ocular neoplasms in dairy cattle. **Veterinarski arhiv**. v. 77, n. 5, 2007, p. 409-426. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/24762>. Acesso em: 12 dezembro 2021.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and cancer: the first ten thousand mutations. **Advances in Cancer Research**. v. 77, 1999, p. 81-137. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60785-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60785-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065230X0860785X?via%3Dihub>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

HESSE, K.L.; FREDO, G.; GUIMARÃES, L.L.B.; REIS, M.O.; PIGATTO, J.A.T.; PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L. Neoplasmas oculares e de anexos em cães e gatos no Rio Grande do Sul: 265 casos (2009-2014). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 1, jan. 2015, p. 49-54. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/swhYVByNnTyNZMLQgrVLmKB/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

HOLLHUMER, R.; MICHELOW, P.; WILLIAMS, S. Ocular surface squamous neoplasia: Population demographics, pathogenesis and risk factors. **African Vision and Eye Health**. v.

79, n. 1, a553, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.4102/aveh.v79i1.553>. Disponível em: <https://avehjournal.org/index.php/aveh/article/view/553/1230>. Acesso em: 24 nov. 2021.

INPE, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS,  
<http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>

JING, Y.; ZHOU, Q.; ZHU, H.; ZHANG, Y.; SONG, Y.; ZHANG, X.; HUANG, X.; YANG, Y.; NI, Y.; HU, Q. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**. v.17, n. 1, jan. 2019, p. 974-980. DOI: 10.3892/ol.2018.9647. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6312995/>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

LIU, D.P.; SONG, H.; XU, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. **Oncogene**. v. 29, n. 7, fev. 2010, p. 949. DOI: [http://dx-doi.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1038/onc.2009.376](http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.376). Disponível em: Gale Academic OneFile, [link.gale.com/apps/doc/A219655818/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=c998fa9e](http://link.gale.com/apps/doc/A219655818/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=c998fa9e). Acesso em: 11 dezembro 2021.

NEWTON, R.; FERLAY, J.; REEVES, G.; BERAL, V.; PARKIN, D.M. Effect of ambient solar ultraviolet radiation on incidence of squamous-cell carcinoma of the eye. **American Journal of Ophthalmology**. v. 122, n. 4, out. 1996, p. 606. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)72142-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)72142-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939414721427>. Acesso em: 11 dezembro 2021.

MARÀ, M.; DI GUARDO, G.; VENUTI, A.; MARRUCHELLA, G.; PALMIERI, C.; DE RUGERIIS, M.; PETRIZZI, L.; SIMEONE, P.; RIZZO, C.; SALDA, L.D. Spontaneous Ocular Squamous Cell Carcinoma in twin goats: pathological and biomolecular studies. **Journal of Comparative Pathology**. v. 132, n. 1, p. 96-100, jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.06.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997504000817?via%3Dihub>. Acesso em: 24 novembro 2021.

PUGLIESE, M.; MAZZULLO, G.; NIUTTA, P.P.; PASSANTINO, A. Bovine ocular squamous cellular carcinoma: a report of cases from the Caltagirone area, Italy/Skvamocelularni karcinom oka u goveda: prikaz slucajeva u okolici grada Caltagirone u Italiji. **Veterinarski Arhiv**. v. 84, n. 5, set-out. 2014, p. 449. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A387230935/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=0fb4e050>. Acesso em: 12 dezembro 2021.

RUSSELL, W.O.; WYNNE, E.S.; LOQUVAM, G.S.; MEHL, D.A. Studies on bovine ocular squamous carcinoma (cancer Eye). I. Pathological anatomy and historical review. **Cancer**. v. 9, n.1, jan/fev. 1956, p. 1-52. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195601/02\)9:1<1::AID-CNCR2820090102>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195601/02)9:1<1::AID-CNCR2820090102>3.0.CO;2-Z). Acesso em: 20 novembro 2021.

SCHULZ, K.L.; ANDERSON, D.E. Bovine enucleation: A retrospective study of 53 cases (1998–2006). **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**. v. 51, n. 6, jun. 2010, p. 611-614. PMID: 20808572. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871356/>. Acesso em: 20 nov. 2021.



SILVA R.G.; LA SCALA JR. N.; POCAI, P.L.B. Transmissão de Radiação Ultravioleta Através do Pelame e da Epiderme de Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 6, dez. 2001, p. 1939-1947. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000700034>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/dBTbRF4BMRcsK3xxrqySyRB/?lang=pt#>. Acesso em: 10 dezembro 2021.

TEIFKE, J.P.; LÖHR, C.V. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. **Journal Comparative Pathology**. v. 114, n. 2, fev. 1996, p. 205-210. DOI: 10.1016/s0021-9975(96)80010-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997596800107?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dezembro 2021.

TSUJITA, H.; PLUMMER, C.E. 2010. Bovine ocular squamous cell carcinoma. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 26, n. 3, p. 511-529, nov. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749072010000368?via%3Dihub>. Acesso em: 20 novembro 2021.

VAN DER POLS, J.; XU, C.; BOYLE, G.; PARSONS, P.; WHITEMAN, D.; GREEN, A. Expression of p53 Tumor Suppressor Protein in Sun-exposed Skin and Associations with Sunscreen Use and Time Spent Outdoors: A Community-based Study. **American Journal of Epidemiology**. v. 163, n. 11, jun. 2006, p. 982-988. DOI: 10.1093/aje/kwj137. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article/163/11/982/168455>. Acesso em: 20 novembro 2021.

VAN DIEST, P.J.; BRUGAL, G.; BAAK, J.P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **Journal of clinical pathology**. v. 51, n. 10, out. 1998, p. 716-724. DOI: 10.1136/jcp.51.10.716. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC500923/>. Acesso em: 20 novembro 2021.

WILCOCK, B.; NJAA, B.L. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: vol. 1, (Sixth Edition), W.B. Saunders. 5: 407 -508, 2016.

WUNSCH, M.; NEUMEIER, M.; UTPATEL, K.; REICHERT, T.E.; ETTL, T.; SPANIER, G. Staging more important than grading? Evaluation of malignancy grading, depth of invasion, and resection margins in oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**. v. 25, n. 3, mar. 2021, p. 1169-1182. DOI: 10.1007/s00784-020-03421-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-020-03421-2#citeas>. Acesso em: 09 dezembro. 2021.

YEUNG, J.C.; CHUNG, C.F.; LAI, J.S. Orbital myiasis complicating squamous cell carcinoma of eyelid. **Hong Kong Medical Journal**. v. 16, n. 1, fev. 2010, p. 63-5. PMID: 20124577. Disponível em: <https://www.hkmj.org/system/files/hkm1002p63.pdf>. Acesso em: 13 dezembro 2021.

8.2 CAPÍTULO 2: Pesquisa relacionada à detecção do DNA do Papilomavirus bovino (BPV) e Vírus da leucose bovina (BLV) através da técnica da Reação em Cadeira da Polimerase em Carcinomas de células escamosas ocular e de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas de vacas da raça Holandesa.

O presente estudo já foi concluído e o manuscrito será apresentado a seguir.

Papilomavírus bovino e vírus da leucose bovina como possíveis agentes precursores no desenvolvimento de Carcinoma ocular em vacas da raça Holandesa

(Bovine Papillomavirus and Bovine Leukosis Virus as possible precursor agents in the development of Ocular Carcinoma in Holstein cows)

Raissa Moreira de Moraes<sup>3</sup>

Aldo Gava<sup>4</sup>

### Abstract

Bovine papillomavirus (BPV) and bovine leukosis virus (BLV) the main precursor agents in neoplastic development in cattle. To evaluate its possible relationship in the pathogenesis of ocular squamous cell carcinomas (OSCC), we evaluated the results of the Polymerase Reaction (PCR) for BLV and BPV in OSCC (n=16) and third eyelid samples without macroscopic alterations (n=15) of Holstein cows. The 31 samples submitted to PCR for BPV were negative. A fragment of the BLV env gene was amplified and sequenced in four samples of CCEO (n=4/12). Although BLV viral DNA was found in 4 of the twelve samples evaluated, its participation in the pathogenesis of bovine ocular carcinoma is uncertain. The negative result for all BPV samples suggests that this virus has no role as a precursor of ocular carcinoma.

Keywords: Ocular squamous cell carcinoma; bovine leukosis virus DNA; bovine papillomavirus; pathogenesis.

### Resumo

Papilomavírus bovino (BPV) e vírus da leucose bovina (BLV) são uns dos principais agentes precursores no desenvolvimento neoplásico em bovinos. Com o intuito de avaliar sua possível relação na patogênese de carcinomas de células escamosas ocular (CCEO), foram avaliados os resultados da técnica de Reação da Polimerase (PCR) para BLV e BPV em amostras de CCEO (n=16) e de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas (n=15) de bovinos fêmeas da raça Holandesa. As 31 amostras submetidas a PCR para BPV foram negativas na PCR. Um

---

<sup>3</sup> Artigo apresentado no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina no ano de 2022.

<sup>4</sup> Professor Orientador

fragmento do gene *env* do BLV foi amplificado e sequenciado em quatro amostras de CCEO (n=4/12). Apesar do DNA viral do BLV ser encontrado em 4 das doze amostras avaliadas é incerto sua participação na patogênese do carcinoma ocular de bovinos. O resultado negativo para todas as amostras de BPV sugerem que este vírus não tem participação como precursor do carcinoma ocular bovino.

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas ocular; DNA do vírus da leucose bovina; papilomavirus bovino; patogênese.

## Introdução

Em animais e humanos diversos agentes virais são responsáveis por induzirem lesões pré-neoplásicas, bem como transformação neoplásica celular (ALBERTI et al., 2010; MUNDAY et al., 2014; BIEZUS et al., 2019; CANOVA et al., 2021). Em bovinos, papilomavirus bovino (BPV) e vírus da leucose bovina (BLV) são uns dos principais agentes precursores envolvidos no desenvolvimento neoplásico nessa espécie (CLAUS et al., 2009; JULIARENA et al., 2017; BIANCHI et al., 2020; MARAWAN et al., 2021).

Os papilomavírus (PVs) são os agentes etiológicos da papilomatose bovina, conhecido popularmente como “verrugas” e caracterizada pela proliferação hiperplásica benigna das células basais dos epitélios cutâneo e mucosa (MUNDAY et al., 2014). A enfermidade é causada por pequenos vírus oncogênicos, não-envelopados de DNA de fita dupla circular pertencente à família Papillomaviridae (ALFIERI et al. 2007). Tipos diferentes de papilomavírus bovino (BPV) já foram caracterizados, relacionados principalmente com o aparecimento neoplásico em diferentes locais (GIL DA COSTA et al., 2014; BIANCHI et al., 2020; PaVE, 2021).

O vírus da leucose bovina (BLV) é o agente etiológico da leucose enzoótica bovina (LEB) pertencente ao gênero Deltaretrovirus (ordem Ortervirales, família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae) (RAVAZZOLO & DA COSTA, 2007; ICTV, 2011). LEB é uma enfermidade amplamente distribuída nos rebanhos leiteiros e caracterizada clinicamente por linfocitose persistente (LP) e desenvolvimento de linfomas em órgãos incluindo olhos, linfonodos, baço, fígado, rim, coração, medula espinhal, útero e úbere (LEONEL, 2018). A replicação é característica da família Retroviridae, onde a enzima transcriptase reversa utiliza o RNA viral para a formação do DNA (provírus) e este se integra ao material genético do

hospedeiro; a capacidade oncogênica do BLV está relacionada ao oncogene *tax*, o qual tem a capacidade de regular as proteínas virais e também genes do hospedeiro (GRASSMANN et al., 2005; GILLET et al., 2016).

Em carcinomas de células escamosas ocular (CCEO) agentes virais têm sido citados como precursores pelo desenvolvimento neoplásico em diversas espécies (MARÀ et al., 2005; TSUJITA & PLUMMER, 2010; HOLLHUMER et al., 2020). A associação entre capacidade antigênica viral e a exposição à radiação ultravioleta (UV), juntamente com outros fatores ambientais, fenotípicos e genotípicos podem estar envolvidos na maturação anormal do epitélio conjuntival e corneal, sugerindo o envolvimento na etiologia do CCEO em bovinos (TSUJITA & PLUMMER, 2010).

A patogênese do carcinoma de células escamosas ocular não é totalmente compreendida, portanto, o objetivo deste trabalho é detectar a presença de papilomavirus bovino e do vírus da leucose bovina em amostras com carcinoma ocular e de amostras de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas em bovinos fêmeas da raça Holandesa e avaliar sua possível relação no aparecimento da neoplasma.

## **Material e métodos**

### **Comitê de ética**

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) protocolada sob o nº 8198130319.

### **Amostras**

Durante um período de estudo de quatro anos (2017 à 2021), foram acompanhadas oito propriedades de bovinocultura leiteira com criação semi-intensivo, localizadas nos estados de Santa Catarina e Paraná, Sul do Brasil. Em um primeiro momento, amostras macroscopicamente compatíveis e de carcinomas de células escamosas oculares confirmadas posteriormente pela avaliação histopatológica foram obtidas de dezesseis bovinos (n=16) da raça Holandesa através da biopsia excisional e armazenados a temperatura de -10°C.

Quatro das dezesseis (4/16) amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso para realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de BPV (papilomavírus bovino) e doze (12/16) amostras ao Laboratório de Virologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a PCR para detecção de BLV (vírus da leucose bovina) e detecção de BPV (papilomavírus bovino).

Posteriormente, amostras de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas e de foram obtidas de quinze (n=15) fêmeas híbridas da raça Holandesa de um estabelecimento de abate localizado na cidade de Pouso Redondo, Planalto Catarinense (27°15'29"49°56'02") e encaminhadas para realização da técnica de PCR para BLV (vírus da leucose bovina) e BPV (papilomavirus bovino) no Laboratório de Virologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Extração do DNA e PCR

A extração do DNA genômico e a técnica da PCR utilizada para papilomavirus nas quatro das dezesseis amostras de CCEO foram de acordo com Ogawa et al. (2004), na qual as amostras de DNA foram amplificadas usando dois pares de *primers* FAP59/FAP64 e MY11/MY09.

Nas doze amostras de CCEO e nas 15 amostras de terceira pálpebra a extração do DNA genômico e a técnica da PCR para detecção de um fragmento de 446 pb do gene *env* do BLV e do fragmento de 480 pb do gene L1 do BPV foram de acordo com a metodologia utilizada por Rodakiewicz et al. (2018) e Forslund et al. (1999), utilizando os pares de *primers* OBLV1A/OBLV6A e FAP59 / FAP64, respectivamente.

#### Metagenômica viral (HTS)

Foi realizado um pool contendo 500µl de cada uma das 12 amostras. Esse pool foi passado por um filtro de 0.22µm e subsequentemente centrifugado com um gradiente de 25% de sacarose a 150,000 g por 3h a 4°C em um rotor Sorvall AH629. O pellet contendo as partículas virais foram incubados por 1.5 h com enzimas DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (THURBER et al., 2009). Posteriormente, o DNA e RNA total foram isolados utilizando protocolo fenol-clorofórmio e TRI reagente (Sigma Aldrich, St.

Louis, MO, USA), respectivamente. O DNA viral foi enriquecido utilizando Genoplex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) kit (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi retrotranscrito em DNA utilizando TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification (WTA) (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA de fita dupla produzido desses enriquecimentos foram colocados em pool em quantidades equimolares e purificado utilizando PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR purification Combo (Thermo Fischer Scientific). A qualidade e a quantidade de DNA foi avaliada por espectrofotômetro e fluorometria através de NanoDrop™ (Thermo Fischer Scientific) e Qubit™ (Thermo Fischer Scientific), respectivamente. As bibliotecas de DNA foram preparadas com 50 ng de DNA purificado utilizando o kit Nextera XT DNA (Illumina V2 reagent kit) e sequenciado utilizando a plataforma Illumina MiSeq.

## Resultados

### Sequenciamento HTS

Não foram encontrados contigs de papilomavírus no pool de amostras; para BLV foram encontrados 29 contigs que possuem identidade de 91 a 97% com uma query cover de 100% com a proteína gp51 de BLV. Subsequentemente, as amostras foram testadas por PCR individualmente para o gene *env*, o qual codifica a proteína gp51 e 4/12 amostras foram positivas na PCR. Ambos os resultados estão detalhados na tabela 1.

### PCR de amostras de terceira pálpebra

As quinze amostras de terceira pálpebra enviadas para a técnica da PCR para detecção do fragmento de 480 pb do gene L1 do BPV e detecção de um fragmento de 446 pb do gene *env* do BLV foram negativas como demonstrada na tabela 2.

## Discussão

Quatro amostras de CCEO submetidas ao PCR para o gene *env* do BLV foram positivas. No presente trabalho a investigação do agente viral na patogênese do CCEO se deu ao fato que o BLV possui um comportamento oncogênico e exógeno, ou seja, de aspecto infeccioso que disseminasse principalmente de forma horizontal entre bovinos (RAVAZZOLO & DA COSTA, 2007).

O BLV é de grande importância principalmente na bovinocultura leiteira, com distribuição mundial, exceto na Europa, Nova Zelândia e Austrália onde foi erradicado (POLAT et al.; 2017). Apesar de não termos a confirmação clínica ou sorológica da enfermidade nos bovinos das quais obtivemos as amostras positivas no PCR para BLV, devemos considerar que essa enfermidade é mais prevalente em bovino de leite do que em bovino de corte, devido principalmente ao confinamento ou proximidade na ordenha realizado no manejo desses animais. Outro ponto que deve-se considerar nessa enfermidade é que a maioria dos bovinos infectados não desenvolvem a doença clínica de linfocitose persistente ou de linfomas/linfossarcomas, permanecendo assintomáticos no rebanho e transmitindo o vírus para outros hospedeiros suscetíveis (JULIARENA et al., 2017).

De acordo com a sua estruturação genômica, o BLV possui quatro genes estruturais principais - *gag*, *pro*, *pol* e *env*- que codificam as enzimas virais e proteínas estruturais (ICTV, 2011). O gene *env* identificado no estudo codifica proteínas do envelope viral (gp51 e gp30), responsáveis pela ligação e entrada do provírus na célula hospedeira (GRASSMANN et al., 2005; ICTV, 2011; GILLET et al., 2016). O fato de ter aparecido sequência de nucleotídeos do gene *env* do BLV no DNA extraído do CCEO, demonstra que BLV infectou o animal e se integrou ao genoma do hospedeiro.

Dos genes estruturais - *gag*, *pro*, *pol* e *env* - e dos genes regulatórios responsáveis pela expressão gênica e replicação viral - *LTR* e *Tax* - que compõem o BLV, o gene *env* foi o único encontrado nas amostras de CCEO analisadas. Uma das características do BLV é que durante o desenvolvimento da enfermidade, o gene *env* é um dos genes frequentemente deletados, sendo uma forma de escapar da resposta imunológica do hospedeiro (POLAT et al.; 2017). Dada essa característica viral de “sobrevivência”, é pressuposto que nas amostras do CCEO negativas na PCR para BLV possa ter ocorrido a deleção do gene *env* ou os bovinos não estavam infectados pelo vírus.

Apesar da capacidade oncogênica do BLV está relacionada ao oncogene *tax* (GRASSMANN et al., 2005; ICTV, 2011), no material avaliado, tanto amostras com CCEO e as de terceira pálpebra, não foi realizado o PCR para detecção desse gene, somente para o gene *env* por ser a região utilizada para a genotipagem do BLV. Em humanos, o *tax* está envolvido nos principais eventos que antecedem a malignidade celular, como a desregulação do ciclo celular e inibição dos mecanismos de reparo genômico (KITSOU et al., 2021).



Embora o BLV possa infectar diferentes populações de células imunes, principalmente subpopulações celulares CD5 + IgM + linfócitos B (POLAT et al.; 2017), em bovinos esse retrovírus foi encontrado em grande quantidade em células epiteliais mamário, demonstrando expressão de alguns oncogenes, genes supressores de tumor e um possível tropismo por esse tipo celular (BUEHRING et al., 1994, CUESTA et al., 2020). De acordo com a suspeita que o BLV possa ser um precursor no CCEO em bovinos, podemos considerar que os tecidos epiteliais escamoso e estratificado da córnea e terceira pálpebra são suscetíveis a infecção e consequências oncogênicas do BLV. Em humanos, sequência de nucleotídeos do gene *env* do BLV foi encontrada no DNA extraído do tecido mamário neoplásico e se agrupou em G1, que é o genótipo mais prevalente em amostras de gado (CANOVA et al., 2021).

De acordo com os resultados observados na técnica da PCR para papilomavirus bovino, todas as amostras foram negativas. Em bovinos, o papilomavirus bovino é descrito como um agente causal do papiloma na pele e mucosas (BIANCHI et al., 2020) e devido essa característica epiteliotrópico e oncogênico a investigação desse agente na patogênese de CCEO ainda se faz necessário.

Também levamos em consideração para a investigação desse agente viral o fato de que o BPV tem sido citado durante anos como precursor no desenvolvimento do carcinoma ocular em bovinos (DMOCHOWSKI, 1961; FORD et al., 1982). Além disso, em carcinoma de células escamosas (CCE) em humanos e outras espécies de animais o DNA do papilomavirus já foi identificado e associado na possível patogênese e transformação neoplásica maligna (ALBERTI et al., 2010; PETERS-KENNEDY et al., 2018; ALVES et al., 2020; CARRAI et al., 2020).

Apesar das amostras de CCEO serem negativos para a detecção do gene L1 do BPV, é importante salientar que uma das características neoplásicas dos CCEO é iniciar com lesões precursoras benignas, sendo o papiloma o estágio intermediário (TSUJITA & PLUMMER, 2010). Além disso, a expressão de produtos gênicos dos PVs é estreitamente regulada conforme a célula basal infectada migra em direção à superfície epitelial (DOORBAR, 2005). Em humanos, a infecção por papilomavirus humano (HPV) parece desempenhar um papel inicial na neoplasia cutânea, mas não é essencial para a viabilidade das células neoplásicas, uma vez que adquirem características de malignidade (HOWLEY et al., 2015).

Tal como acontece com outros processos neoplásicos induzidos por agentes virais, sugerimos que a infecção viral inicial juntamente com outro cofator aumentam a possibilidade do desenvolvimento neoplásico. Tanto em CCE cutâneos como oculares, a exposição à radiação

ultravioleta (UV) é uma das principais causas envolvidas na patogênese do neoplasma. A interação entre esses dois fatores foram demonstradas por ANSON, et al., (1982) que ao submeter amostras de células neoplásicas de carcinomas oculares a situações de estresse como radiação UV e aumento de pH (8,4), detectaram através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) antígenos de Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) no citoplasma celular.

Corroborando ainda com a hipótese que na patogênese do CCEO em bovinos possa haver uma associação viral e outro agente com papel de cofator, em humanos a neoplasia escamosa da superfície ocular (NESO) tem a sua patogênese em torno da exposição ultravioleta que é o principal fator de risco e HPV (papilomavirus humano) e HIV (vírus da imunodeficiência humana) que desempenham papéis contributivos (HOLLHUMER et al., 2020).

As amostras de terceira pálpebra negativas no PCR para BLV e BPV foram coletadas com intuito de comparar se haveria ou não detecção de DNA viral com amostras positivas da PCR para BLV e BPV de CCEO. Apesar do resultado negativo, devemos considerar que em casos de animais infectados por BLV possa ocorrer deleções de gene *env* para não ocorrer detecção imunológica do hospedeiro (POLAT et al.; 2017) ou não houve expressão de produtos gênicos dos BPV em animais infectados (DOORBAR, 2005).

Em conclusão nosso estudo relata 1) apesar do envolvimento do BPV em outros neoplasmas, este vírus não tem participação como precursor do CCEO em bovinos; 2) a primeira descrição do BLV associado CCEO de bovinos, tornando esse retrovírus como um possível agente precursor desse neoplasma 3) ; se o BLV é ou não precursor do CCEO nessa espécie, serão necessários mais estudos para demonstrar a presença do genoma de BLV em CCEO por hibridização in situ, por exemplo; e 4) nas amostras sem alterações macroscópicas negativas na PCR sugerem que: os bovinos não estavam infectados; houve deleções de genes em bovinos infectados do BLV; ou não houve expressão de produtos gênicos em bovinos infectados por BPV.

Tabela 1 – Resultados da técnica da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para detecção de um fragmento de 446 pb do gene env do BLV (vírus da leucose bovina) e do fragmento de 480 pb do gene L1 do BPV (papilomavírus bovino) em amostras de carcinoma de células escamosas ocular de vacas holandesas

Amostras	Idade (anos)	Localização da lesão/Diagnóstico morfológico	BLV <sup>a</sup>	BPV <sup>b</sup>
1	-	Junção corneoescleral/CCE	-	Negativo
2	-	Terceira pálpebra e esclera/CCE	-	Negativo
3	-	Terceira pálpebra/CCE	-	Negativo
4	-	Terceira pálpebra e esclera/CCE	-	Negativo
5	4	Terceira pálpebra/CCE	Positivo	Negativo
6	4,5	Terceira pálpebra/CCE	Positivo	Negativo
7	4	Terceira pálpebra/CCE	Positivo	Negativo
8	4	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo
9	4,5	Terceira pálpebra/CCE	Positivo	Negativo
10	4	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo
11	4,5	Córnea <sup>c</sup>	Negativo	Negativo
12	7	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo
13	8	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo
14	4,5	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo
15	7	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo
16	7	Terceira pálpebra/CCE	Negativo	Negativo

<sup>a</sup> Vírus da leucose bovina <sup>b</sup> Vírus do papilomavirus bovino <sup>c</sup> amostra sem avaliação histológica

Fonte: Morais (2022).

Tabela 2 – Resultados da técnica da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para detecção de um fragmento de 446 pb do gene env do BLV (vírus da leucose bovina) e do fragmento de 480 pb do gene L1 do BPV (papilomavírus bovino) em amostras de terceira pálpebra sem alterações macroscópicas de vacas holandesas

Total de amostras	Raça/ Sexo	Idade (anos)	BLV <sup>a</sup>	BPV <sup>b</sup>
15	Holandesa/ Fêmea	(4 – 8)	Negativo	Negativo

<sup>a</sup> Vírus da leucose bovina <sup>b</sup> Vírus do papilomavirus bovino

Fonte: Moraes (2022).

## Referências

- ALBERTI, A.; PIRINO, S.; PINTORE, F.; ADDIS, M.F.; CHESSA, B.; CACCIOTTO, C.; CUBEDDU, T.; ANFOSSI, A.; BENENATI, G.; CORADDUZZA, E.; LECIS, R.; ANTUOFERMO, E.; CARCANGIU, L.; PITTAU, M. *Ovis aries* Papillomavirus 3: a prototype of a novel genus in the family *Papillomaviridae* associated with ovine squamous cell carcinoma. **Virology**. v. 407, n. 2, p. 352-359, nov. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.034>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210005738>. Acesso em: 20 nov. 2021.
- ALVES, C.D.B.T.; WEBER, M.N.; GUIMARÃES, L.L.B. CIBULSKI, S. P., DA SILVA, F. R. C., DAUDT, C., BUDASZEWSKI, R.F.; SILVA, M.S.; MAYER, F.Q.; BIANCHI, R.M.; SCHWERTZ, C.I.; STEFANELLO, C.R.; GERARDI, D.G.; LAISSE, C.J.M.; DRIEMEIER, D.; TEIFKE, J.P.; CANAL, C. W. Canine papillomavirus type 16 associated to squamous cell carcinoma in a dog: virological and pathological findings. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 51, p. 2087–2094, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00310-4>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7688879/>. Acesso em: 30 nov. 2021.
- AMAURI, A.; ALFIERI, S.; WOSIACKI, R.; ALFIERI, A.F. Papillomaviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. p. 399-411.
- ANSON, M.A.; BENFIELD, D.A.; MCADRAGH, J.P. Bovine herpesvirus-5 (DN-599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary Science**. v. 46, n. 3, p.334-337, jul. 1982. PMC1320334. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1320334/>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- BIANCHI, R.M.; ALVES, C.D.B.T.; SCHWERTZ, C.I.; PANZIERA, W.; DE LORENZO, C.; DA SILVA, F.S.; DE CECCO, B.S.; DAUDT, C.; CHAVES, F.R.; CANAL, C.W.; PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER, D. Molecular and pathological characterization of teat papillomatosis in dairy cows in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 51, n. 1, p. 369-375, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00175-2>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7058819/#>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- BIEZUS, G.; MACHADO, G.; FERIAN, P.E.; DA COSTA, U.M.; PEREIRA, L.H.H.D.S.; WITHOEFT, J.A.; NUNES, I.A.C.; MULLER, T.R.; DE CRISTO, T.G.; CASAGRANDE, R.A. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases**. v. 63, p. 17-21, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014795711830122X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- BUEHRING, G.C, KRAMME, P.M., SCHULTZ, R.D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**. v. 71, n. 3, p. 359-365, set.1994. PMID: 7933986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7933986/>. Acesso em: 02 dez. 2021.
- CANOVA, R.; WEBER, M.N., BUDASZEWSKI, R.F., DA SILVA, M.S., SCHWINGEL, D., CANAL, C.W., KREUTZ, L.C. Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue

- is genetically related to the cattle vírus. **One Health**. v. 13, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100252>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771421000422?via%3Dihub>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- CARRAI, M.; VAN BRUSSEL, K.; SHI, M.; LI, C.-X.; CHANG, W.-S.; MUNDAY, J.S.; VOSS, K.; MCLUCKIE, A.; TAYLOR, D.; LAWS, A.; HOLMES, E.C.; BARRS, V.R.; BEATTY, J.A. Identification of a novel papillomavirus associated with squamous cell carcinoma in a domestic cat. **Viruses**. v. 12, n.124, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12010124>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/1/124>. Acesso em: 29 nov. 2021.
- CLAUS, M.P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A.; OTONEL, R. A.A.; SARTORI, D.; FUNGARO, M.H.P.; ALFIERI, A. F. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in brazilian cattle herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52, spe. p. 93-98, nov. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000700013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/MMdvsg3gcRRWKdwvmDrd8yy/?lang=en>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- CUESTA, L.M.; LIRON, J.P.; NIETO FARIAS, M.V.; DOLCINI, G.L.; CERIANI, M.C. Effect of bovine leukemia virus (BLV) infection on bovine mammary epithelial cells RNA-seq transcriptome profile. **PLoS ONE**. v. 15, n. 6, e0234939, jun. 2020. DOI: <http://dx-doi.ez74.periodicos.capes.gov.br/10.1371/journal.pone.0234939>. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A627563328/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=36fbbb66>. Acesso em: 02 dez. 2021.
- DMOCHOWSKI, L. Viruses and Tumors: The electron microscope is proving to be a powerful tool for study of viruses and virus-induced tumors. **Science (American Association for the Advancement of Science)**. v. 133, n. 3452, p. 551-561, fev. 1961. DOI: [10.1126/science.133.3452.551](https://doi.org/10.1126/science.133.3452.551). Disponível em: <https://www.scienceorg.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/epdf/10.1126/science.133.3452.551>. Acesso em: 30 nov. 2021.
- DOORBAR, JOHN. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**. v. 32, sup, p. 7-15, mar. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653204003671>. Acesso em: 02 dez. 2021.
- FORD, J.N.; JENNINGS, P.A.; SPRADBROW, P.B.; FRANCIS, J. Evidence for papillomaviruses in ocular lesions in cattle. **Research in Veterinary Science**. v. 32, n.2, p. 257-259, mar. 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32425-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32425-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528818324251?via%3Dihub>. Acesso em: 30 nov. 2021.
- FORSLUND, O.; ANTONSSON, A.; NORDIN, P.; STENQUIST, B.; GÖRAN, H.B. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal of General Virology**. v. 80, p. 2437-2443, set. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2437>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-80-9-2437?crawler=true>. Acesso em: 24 nov. 2021.

GRASSMANN, R.; ABOUD, M.; JEANG, K.T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. **Oncogene**. v. 24, n. 39, p. 5976-5985, set. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208978>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1208978.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2021

GIL DA COSTA, R.M.; MEDEIROS, R. Bovine papillomavirus: opening new trends for comparative pathology. **Archives of Virology**. v. 159, p. 191–198, fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1801-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-013-1801-9>. Acesso em: 24 nov. 2021.

GILLET, N.A.; HAMAIDIA, M.; DE BROGNIEZ, A.; GUTIERREZ, G.; RENOTTE, N.; REICHERT, M.; TRONO, K.; WILLEMS, L. Bovine leukemia virus small noncoding RNAs are functional elements that regulate replication and contribute to oncogenesis in vivo. **PLoS Pathogens**. v.12, n. 4, e1005588, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005588>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article/comments?id=10.1371/journal.ppat.100>. Acesso em: 24 nov. 2021.

HOLLHUMER, R.; MICHELOW, P.; WILLIAMS, S. Ocular surface squamous neoplasia: Population demographics, pathogenesis and risk factors. **African Vision and Eye Health**. v. 79, n. 1, a553, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.4102/aveh.v79i1.553>. Disponível em: <https://avehjournal.org/index.php/aveh/article/view/553/1230>. Acesso em: 24 nov. 2021.

HOWLEY, P.M., PFISTER, H.J. 2015. Beta genus papillomaviruses and skin cancer. **Virology**. v. 479-480, p. 290–296, mai. 2015. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682215000471>. Acesso em: 02/12/2021.

JULIARENA, M.A.; BARRIOS, C.N.; LÜTZELSCHWAB, C.M.; ESTEBAN, E.N.; GUTIÉRREZ, S.E. Bovine leukemia virus: current perspectives. **Virus Adaptation and Treatment**. v. 9, p. 13-26, ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.2147/VAAT.S113947>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/bovine-leukemia-virus-current-perspectives-peer-reviewed-fulltext-article-VAAT>. Acesso em: 24 nov. 2021.

KITSOU, K.; ILIOPOULOU, M., SPOULOU, V.; LAGIOU, P.; MAGIORKINIS, G. Viral causality of human cancer and potential roles of human endogenous Retroviruses in the Multi-Omics Era: An evolutionary epidemiology review. **Frontiers in Oncology**. v.11, pg. 4511, out. 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.687631. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.687631>. Acesso em: 02 dez. 2021.

MARÀ, M.; DI GUARDO, G.; VENUTI, A.; MARRUCHELLA, G.; PALMIERI, C.; DE RUGIERIIS, M.; PETRIZZI, L.; SIMEONE, P.; RIZZO, C.; SALDA, L.D. Spontaneous Ocular Squamous Cell Carcinoma in twin goats: pathological and biomolecular studies. **Journal of Comparative Pathology**. v. 132, n. 1, p. 96-100, jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.06.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997504000817?via%3Dihub>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MARAWAN, M.A.; ALOUFFI, A.; EL TOKHY, S.; BADAWY, S.; SHIRANI, I.; DAWOOD, A.; GUO, A.; ALMUTAIRI, M.M.; ALSHAMMARI, F.A.; SELIM, A. Bovine leukaemia virus: current epidemiological circumstance and future prospective. **Viruses**. v. 13, n. 111, p. 2167, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13112167>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/11/2167/htm>. Acesso em: 23 nov. 2021.

LEONEL, M.S. Enzootic bovine leukosis. **OIE Terrestrial Manual**, v. 3, n. 1, p. 56, 2018.

MUNDAY, J.S. Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. **Veterinary Pathology**. v. 51, n. 6, p. 1063-1075, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985814537837>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985814537837>. Acesso em: 24 nov. 2021.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **Journal of General Virology**. v. 85, n. 8, p. 2191-2197, ago. 2004. DOI: 10.1099/vir.0.80086-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.80086-0>. Acesso em: 24 nov. 2021.

PaVE (2021) **Base de dados genômicos de papilomavírus**. Disponível em: <http://pave.niaid.nih.gov>. Acesso: 21 de novembro 2021.

PETERS-KENNEDY, J., LANGE, C. E., RINE, S. L., & HACKETT, R. P. *Equus caballus papillomavirus* 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse. **Equine Veterinary Journal**. v. 51, n. 4, pg. 470-474, nov. 2018. DOI: 10.1111/evj.13046. Disponível em: <https://beva-onlinelibrary-wiley.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/evj.13046>. Acesso: 30 de novembro 2021.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**. v. 14, n. 1, p. 1-16, nov. 2017. DOI: 10.1186/s12985-017-0876-4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669023/>. Acesso em: 02 dez. 2021.

RODAKIEWICZ, S.M.; FERNANDEZ, M.L.; MUNHOZ, M.L.; SCHEFFER, F.H.; URIO, M.; FORELL, F.; FERRAZ, S.; PORTES, V.M.; COSTA, U.M. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 85, p. 1-7, ago. 2018. DOI:<https://doi.org/10.1590/1808>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/xhpSWQnMtYQdNBxfN79hXWj/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 24 nov. 2021.

ROLLISON, D.E., VIARISIO, D., AMORRORTU, R. P., GHEIT, T., & TOMMASINO, M. (2019). An emerging issue in oncogenic virology: the role of beta HPV types in development of cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of Virology**. v. 93, n. 7, abr 2019. DOI:10.1128/jvi.0100318 Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01003-18>. Acesso em: 30 nov. 2021.

TSUJITA, H.; PLUMMER, C.E. 2010. Bovine ocular squamous cell carcinoma. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 26, n. 3, p. 511-529, nov. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749072010000368?via%3Dihub>. Acesso em: 24 nov. 2021.



## **9 CONCLUSÃO**

O capítulo 1 demonstra que a ocorrência dos CCEO em bovinos da raça Holandesa está intimamente relacionado a radiação solar reforçada por fatores genéticos/ fenotípicos como a região ocular com uma menor proteção palpebral da esclera e conjuntiva ocular e devido a importância econômica do rebanho leiteiro da raça Holandesa, o carcinoma ocular é uma importante neoplasia para a raça e é responsável por grandes prejuízos para os produtores. No capítulo 2 que apesar do envolvimento do BPV em outros neoplasmas, este vírus não tem participação como precursor do CCEO em bovinos e há a primeira descrição do BLV associado a CCEO de bovinos.