

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA**

**DAIANE OGLIARI**

**REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA ESCAMOSO EM  
TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE BOVINOS PELA INGESTÃO DE  
*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM  
PAPILOMAVÍRUS**

**LAGES**

**2022**

**DAIANE OGLIARI**

**REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA ESCAMOSO EM  
TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE BOVINOS PELA INGESTÃO DE  
*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM  
PAPILOMAVÍRUS**

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 Doutora 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/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Ogliari, Daiane  
REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA  
ESCAMOSO EM TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE  
BOVINOS PELA INGESTÃO DE *Pteridium esculentum* subsp.  
*arachnoideum* E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM  
PAPILOMAVÍRUS / Daiane Ogliari. -- 2022.  
58 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. Plantas tóxicas. 2. carcinoma de células escamosas. 3.  
samambaia. 4. neoplasia. 5. papilomavírus. I. Gava, Aldo. II.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
III. Título.

**DAIANE OGLIARI**

**REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA ESCAMOSO EM  
TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE BOVINOS PELA INGESTÃO DE  
*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM  
PAPILOMAVÍRUS**

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 Doutora em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professor Dr. Aldo Gava  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membros:

---

Professor Dr. Adriano Tony Ramos  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

---

Professor Dr. Cláudio Wageck Canal  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

---

Professor Dr. David Driemeier  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

---

Professor Dr. Paulo Fernando de Vargas Peixoto  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

Lages, 18 de Julho de 2022

Aos meus pais Deonísio e Ivete, ao Mushue Dayan  
Filho pelo apoio e compreensão... essa conquista é  
NOSSA. Amo muito vocês...

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS pelo dom da vida, pela saúde e proteção constante.

À minha família, sem ela com certeza não teria ido a lugar algum. Agradeço aos meus pais Deonísio e Ivete Ogliari meus maiores exemplos de vida, dignidade, trabalho e amor. Pelo carinho, cuidado, incentivo e apoio em todos os momentos e pelas incontáveis horas de trabalho a fim de permitir a minha educação. Eu não tenho palavras para expressar tamanho amor e gratidão a vocês. Aos meus irmãos Marcia e Juliano, meus cunhados Ademir e Julciane e sobrinhos Gabriel e Lucas, pelo apoio de sempre, carinho e incentivo em todas as horas, a estes tenho muito respeito e admiração.

Ao meu exímio orientador Professor Aldo Gava, pessoa que tenho eterna gratidão e admiração. Obrigada por acreditar em mim, pela confiança, paciência, apoio, ajuda, orientação, pelos “puxões de orelha”, pelas experiências compartilhadas, pelos valiosos ensinamentos de Patologia, Plantas Tóxicas e principalmente de vida. Seu caráter, humildade, ética, perseverança, discernimento e amor pela profissão são exemplos que edificam e fazem a diferença em nossos dias. Gratidão por nos mostrar que muitas vezes os problemas são mais simples de resolver do que se imagina e que sempre devemos perseverar em nossos objetivos. Espero um dia alcançar o seu entusiasmo e espírito de doação em ensinar e formar verdadeiros profissionais. Obrigada pelo privilégio de acompanhar seu trabalho.

Ao Mushue Dayan Filho, pelo companheirismo, paciência, compreensão, apoio, incentivo e por me ajudar nas inúmeras coletas de samambaia e com os cuidados com os bovinos. Sou grata por tudo isso e pelo amor a mim dedicado ao longo desse tempo, estou extremamente feliz por podermos compartilhar este momento. À sua família, Mushue, Márcia e Letícia pelo carinho, por me acolherem, compreenderem e me incentivarem.

Ao professor Cláudio Canal e equipe do Laboratório de Virologia da UFRGS e ao professor Matheus Weber e equipe da Virologia da Feevale de Novo Hamburgo/RS pela disponibilidade de terem realizado as avaliações e contribuírem de forma engrandecedora a este trabalho.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), especialmente ao Centro de Ciências Agroveterinárias CAV, Lages/SC, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-graduação (PROMOP) da UDESC e a CAPES pela concessão de bolsa.

Agradeço aos colegas e a todos que de alguma forma direta ou indireta tiveram participação nesta caminhada.

A todos estes agradeço imensamente e dedico os resultados deste trabalho.

## RESUMO

*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* é uma planta cosmopolita, conhecida popularmente como samambaia. Esta planta, frequentemente, é ingerida pelos bovinos e é responsabilizada por causar três doenças distintas: um quadro agudo, caracterizado por hemorragias e febre, e dois quadros crônicos caracterizados por formações de neoplasias na bexiga (hematúria enzoótica) e carcinoma de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS). Estas enfermidades ocorrem em todos os continentes onde há invasão dessa planta. Embora, haja fortes suspeitas de que o CCEs tenha relação com a ingestão espontânea de *Pteridium* spp., também existem suspeitas de que o CCEs esteja relacionado a ingestão de *Pteridium* spp. com a participação do papilomavírus bovino (BPV). Com o objetivo de esclarecer essa suspeita, um estudo experimental foi conduzido, no qual *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* foi fornecida a seis bovinos nas doses de 2,5 e 5,0 g/Kg/dia por um período entre 755-1239 dias. Três bovinos tiveram manifestações clínicas bem definidas caracterizadas por tosse, disfagia, regurgitação, sialorreia, halitose e, emagrecimento progressivo. Todos foram sacrificados, sendo que destes, dois encontravam-se em estágio avançado da doença. Na avaliação macroscópica, nos seis bovinos foram observados processos neoplásicos sob forma de massas amareladas, infiltrativas, na maioria das vezes com superfície ulcerada e através da avaliação histológica foram confirmadas como CCEs. Essas lesões estavam distribuídas desde a base da língua, esôfago e parte inicial do rúmen. Apenas em um bovino observou-se metástase em linfonodo retrofaríngeo. Amostras do TAS (base de língua, esôfago e rúmen) e de bexiga dos seis bovinos utilizados na experimentação e de nove bovinos com a doença espontânea foram coletadas, congeladas e submetidas a Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de alto desempenho, a fim de verificar a possível participação de BPV. Tanto na PCR como no sequenciamento de alto desempenho os resultados foram negativos para DNA de BPV.

**Palavras-chave:** Plantas tóxicas, carcinoma de células escamosas, samambaia, neoplasia, bovino, papilomavírus.



## ABSTRACT

*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* is a cosmopolitan plant, popularly known as bracken fern. This plant is frequently ingested by cattle and is responsible for causing three distinct diseases: an acute condition, characterized by hemorrhages and fever, and two chronic conditions characterized by the formation of neoplasms in the bladder (enzootic hematuria) and squamous cell carcinoma (SCCs) in the upper digestive tract (UDT). These diseases occur on all continents where there is invasion of that plant. Although there are strong suspicions that SCCs are related to the spontaneous ingestion of *Pteridium* spp, there are also suspicions that SCCs are related to the ingestion of *Pteridium* spp with the participation of bovine papillomavirus (BPV). With the objective to clarify this suspicion, an experimental study was conducted, in which *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* was fed to six cattle at doses of 2.5 and 5.0 g/Kg/day for a period between 755-1239 days. Three cattle had well-defined clinical manifestations characterized by cough, dysphagia, regurgitation, drooling, halitosis and progressive weight loss. All were sacrificed, and of these, two were in an advanced stage of the disease. In the macroscopic evaluation, in the six cattle neoplastic processes were observed in the form of yellowish, infiltrative masses, most of the times with ulcerated surface and through the histological evaluation they were confirmed as SCCs. These lesions were distributed from the base of the tongue, esophagus and initial part of the rumen. Only one cattle showed metastasis in retropharyngeal lymph nodes. Samples from the UDT (base of the tongue, esophagus and rumen) and bladder from the six cattle used in the experiment and from nine cattle with spontaneous disease were collected, frozen and subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) and high-performance sequencing, in order to verify the possible participation of BPV. Both in PCR and in high performance sequencing the results were negative for BPV DNA.

**Index terms:** Toxic plants, squamous cell carcinoma, bracken fern, neoplasm, bovine, papillomavirus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- A. Bovino 01, 16 dias pós-parto, emagrecimento progressivo, pescoço esticado após pastejo e aumento de volume no pescoço. B. Bovino 2, emagrecimento progressivo e com pelos longos e arrepiados ..... 33
- Figura 2 - Bovino 01, corrimento nasal esverdeado..... 34
- Figura 3 - Bovino 01 - Neoplasia em esôfago, com consistência firme, não ulcerado, ao corte coloração amarelada com necrose central ..... 35
- Figura 4 - Bovino 02, A. Neoplasias em base de língua e esôfago, B. linfonodo retrofaríngeo com metástase..... 36
- Figura 5 - Bovino 3. A. Nodulações com superfície irregular em base de língua. B. Rúmen, lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, com superfície vermelha e irregular. C. Esôfago, nódulo, e 2,3 x 1cm. D. Esôfago, múltiplas lesões circulares..... 38
- Figura 6 - Bovino 4. A. Papiloma em base da língua. B e C. Esôfago com múltiplas lesões circulares, bordos elevados com centro deprimido superfície branca e irregular. .... 39
- Figura 7 - Bovino 5. A. Glote, múltiplas lesões circulares e úlceras. B. Base da língua, elevações da superfície, de forma rugosa e ulceradas. C. Rúmen, lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, superfície vermelha e irregular..... 40
- Figura 8 - Bovino 6, A e B. Esôfago. Múltiplas lesões circulares em placa, com superfície irregular..... 41
- Figura 9 - Microscopia de neoplasia em esôfago, caracterizando um Carcinoma de Células Escamosas. Bovino 1. Reprodução experimental. Coloração de HE. A e B. Aumento de 40x. C. Aumento de 100x ..... 42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número, idade, peso, dose e resultados obtidos com a reprodução experimental por <i>P. esculentum</i> subsp. <i>arachnoideum</i> em bovinos.....	45
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1.ASPECTOS GERAIS DA PLANTA .....	12
2.2CARACTERÍSTICAS DA INTOXICAÇÃO POR <i>Pteridium</i> spp. EM BOVINOS.....	13
2.2.1 Diátese hemorrágica (DH).....	14
2.2.2 Hematúria Enzoótica Bovina (HEB).....	16
2.2.3 Carcinomas de Células Escamosas (CCEs) no Trato Alimentar Superior (TAS).....	18
2.2.4 Papilomavírus bovino x Carcinomas de Células Escamosas de trato alimentar superior.....	19
2.3 INTOXICAÇÃO POR <i>Pteridium</i> spp. EM HUMANOS .....	21
3 OBJETIVO GERAL:.....	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	22
4 REFERÊNCIAS .....	23
5 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA ESCAMOSO EM TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE BOVINOS PELA INGESTÃO DE <i>Pteridium esculentum</i> subsp. <i>arachnoideum</i> .....	30

5.1 RESUMO .....	30
5.2 INTRODUÇÃO .....	30
5.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	32
5.4 RESULTADOS.....	32
5.5 DISCUSSÃO .....	46
5.6 CONCLUSÃO .....	47
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
6 CARCINOGENICIDADE DE <i>Pteridium esculentum</i> subsp. <i>arachnoideum</i> X PAPILOMAVÍRUS.....	50
6.1 RESUMO .....	50
6.2 INTRODUÇÃO .....	50
6.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	52
6.3.1 Extração de DNA, PCR e Sequenciamento de Alto Desempenho.....	53
6.3.2 Declaração de ética.....	54
6.4 RESULTADOS.....	54
6.4.1 PCR e sequenciamento de alto desempenho .....	54
6.5 DISCUSSÃO .....	55
6.6 CONCLUSÃO .....	55
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## 1 INTRODUÇÃO

*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* está entre as plantas tóxicas mais estudadas e de maior importância no mundo, pelo seu potencial carcinogênico e sua ampla distribuição cosmopolita. Causa intoxicações em diversas espécies animais e é associada a enfermidades em humanos. No entanto, no Brasil, fora do meio acadêmico, poucos sabem ou aceitam que a samambaia, como é conhecida popularmente, seja uma planta tóxica com tamanha importância para bovinos (PAMUKCU *et al.*, 1977; EVANS, 1987; TOKARNIA *et al.*, 2012).

A ocorrência de carcinomas de células escamosas (CCEs) no Trato Alimentar Superior (TAS) de bovinos e a observação constante de *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* (samambaia) nas propriedades onde ocorrem essas neoplasias levanta a hipótese de que esta seria responsável pela etiologia deste tumor. Também, especula-se que CCEs no TAS de bovinos pode estar relacionado com a presença de papilomavírus e a ingestão de samambaia. No entanto, Souto *et al.* (2006), citam que é possível o surgimento de CCEs, diretamente em epitélio normal, possivelmente por ação direta dos carcinógenos químicos da samambaia.

Em Santa Catarina, *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* é a planta tóxica que causa enormes perdas econômicas na bovinocultura. Das três enfermidades por ela produzidas, o CCEs no TAS é que causa maior número de mortes (GAVA *et al.*, 2002).

Para melhor compreensão desta enfermidade foram conduzidos experimentos através da administração de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* a bovinos por longo período e avaliação metagenômica e PCR de neoplasias do TAS de bovinos em experimentação e casos naturais, a fim de tentar identificar a possível participação de papilomavírus nestas neoplasias.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. ASPECTOS GERAIS DA PLANTA

*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* conhecida popularmente como samambaia, samambaia-do-campo, pluma ou feto, é uma pteridófita pertencente à família Dennstaedtiaceae, é uma planta cosmopolita, de ocorrência em todos os continentes, exceto na Antártida. No Brasil, ocorre principalmente nas regiões montanhosas, desde o Rio Grande do Sul até o sul da Bahia. É uma planta daninha que ocorre em solos ácidos, arenosos e de baixa fertilidade, regiões frias, de boa pluviosidade e bem drenados. Em áreas de florestas tropicais fechadas a planta não ocorre por encontrar condições incompatíveis com seu desenvolvimento, entretanto seu crescimento é favorecido quando em plena exposição à luz, como ocorre em áreas recém desmatadas, após a utilização de queimadas, beiras de estradas e terrenos baldios (FENWICK, 1988; ALONSO-AMELOT, 1999; GAVA *et al.*, 2002; MARRS; WATT, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

*P. esculentum* subsp. *arachnoideum* possui vários princípios tóxicos os quais atuam como carcinógenos, mutágenos e imunossupressores (CAMPO, 1997). Estes princípios tóxicos podem causar diferentes quadros clínicos nas diferentes espécies animais. A ação radiomimética é atribuída a um glicosídeo norsesquiterpeno, denominado ptaquilosídeo. Este seria responsável por quadros patológicos observados em bovinos, como depressão da medula óssea, e ação carcinogênica e mutagênica, e uma tiaminase, associada a distúrbios neurológicos que ocorrem em monogástricos, principalmente equinos (EVANS, 1968; EVANS, 1976; HIRONO *et al.*, 1984; FENWICK, 1988; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Três doenças que acometem bovinos têm como característica epidemiológica comum, o fato de ocorrerem em áreas invadidas por *Pteridium* spp.. Uma forma clínica aguda caracterizada por hemorragias, chamada de diátese hemorrágica (DH), ou síndrome hemorrágica aguda, e duas formas de caráter crônico, caracterizadas por neoplasias no trato digestivo superior e na bexiga (TOKARNIA *et al.*, 1967; SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

*Pteridium* spp. tem efeito carcinogênico variável nas diferentes espécies animais. Há suspeita de que os bovinos desenvolvem neoplasias no TAS e na bexiga

(TOKARNIA *et al.*, 1967) e, em ovinos, as neoplasias são observadas no intestino (EVANS, 1968).

A intoxicação crônica por *Pteridium* spp. em bovinos leva ao desenvolvimento de neoplasias principalmente na base da língua, faringe, esôfago, rúmen e bexiga. Estes órgãos apresentam condições alcalinas, o que propicia a transformação do ptaquilosídeo em dienona. O pH alcalino da saliva (8,1 – 8,2) e da urina de bovinos (7,5 – 8,5) favorece o aparecimento de tumores nesses órgãos. Em monogástricos, parte do ptaquilosídeo é inativada no estômago pela formação de pterosinas B e O, no entanto, a maior parte do ptaquilosídeo passa sem se decompor, segue para o intestino e não é absorvido, devido ao seu alto peso molecular e hidrofília. Em monogástricos, as condições ácidas da bexiga não propiciariam a formação de neoplasias pelo ptaquilosídeo (VAN DE HOEVEN *et al.*, 1983; MATOBA *et al.*, 1987).

A concentração do ptaquilosídeo e outros glicosídeos de iludano varia consideravelmente com a idade e a parte da planta. Plantas jovem e em crescimento ativo, contém maiores quantidades de substância tóxica (EVANS, 1968), como também observado no ápice do broto, de onde irão desenvolver-se as folhas (HIRONO *et al.*, 1973; SMITH; SEAWRIGHT, 1995), e no rizoma (EVANS *et al.*, 1961; SAITO *et al.*, 1989). O tipo de solo, o clima, a geografia e a luminosidade também interferem na toxicidade da planta. O maior nível do ptaquilosídeo no broto ocorre na primavera e declina gradualmente próximo ao inverno e com a maturidade da planta a toxicidade diminui (SAITO *et al.*, 1989; SMITH; SEAWRIGHT, 1995; ALONSO-AMELOT, 1999; SMITH *et al.*, 1999; RASMUSSEN *et al.*, 2003; TOKARNIA *et al.*, 2012).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DA INTOXICAÇÃO POR *Pteridium* spp. EM BOVINOS

Alguns fatores vão interferir para o surgimento dos sinais clínicos. Estes incluem a quantidade de plantas disponíveis, a concentração de toxinas, o estágio de crescimento e a época do ano, a taxa e o tempo de consumo, a luminosidade, sexo e idade dos animais (SMITH, 2001; RASMUSSEN *et al.*, 2003).

Dependendo da dose diária ingerida e do período da ingestão, os bovinos apresentam três formas distintas da doença: uma manifestação aguda caracterizada por hemorragias, conhecida como diátese hemorrágica, decorrente da ingestão de



quantidades maiores que  $10 \text{ g. kg}^{-1}$  por dia durante algumas semanas a poucos meses e outras duas formas, de caráter crônico, que ocorrem por ingestão de pequenas quantidades de planta em doses menores que  $10 \text{ g. kg}^{-1}$  por dia durante meses a anos. Um quadro se caracteriza por formações neoplásicas na bexiga, a hematúria enzoótica. O outro quadro é representado pelos CCEs em TAS (TOKARNIA *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Diátese hemorrágica (DH)

Intoxicação aguda por *Pteridium* spp., também conhecida como síndrome hemorrágica aguda ou diátese hemorrágica, ocorre em bovinos jovens e adultos. Quando os animais ingerem quantidades diárias maiores que  $10 \text{ g. kg}^{-1}$  da planta, durante algumas semanas a poucos meses ou até o peso da planta ingerida se igualar ao peso do animal (EVANS *et al.*, 1954a; EVANS *et al.*, 1961; TOKARNIA *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 2012).

A intoxicação aguda ocorre em maior intensidade na primavera (outubro-dezembro), mas em regiões com temperatura elevada pode ocorrer o ano todo, em decorrência da escassez de pastagens, carência de matéria fibrosa, superlotação em pastos e rebrote após geadas, queimadas ou roçadas. Ocorrem em forma de surto ou casos isolados, geralmente com morbidade baixa e mortalidade alta. A síndrome hemorrágica aguda está associada ao consumo do broto, que é mais tóxica que as outras partes da planta e os animais podem desenvolver um gosto especial pela ingestão da planta (vício) (EVANS *et al.*, 1954a; TOKARNIA *et al.*, 1967; GAVA, 1993; MARÇAL *et al.*, 2002; GAVA *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2002; ANJOS *et al.*, 2008).

Em geral, os sinais clínicos iniciam de três a oito semanas após o início da ingestão da planta. Os bovinos apresentam hiperemia, perda de apetite e peso, dispneia, pelos arrepiados, hipertermia ( $41\text{-}42^\circ\text{C}$ ), desidratação grave, mucosas pálidas com petéquias na conjuntiva, gengiva e mucosa vulvovaginal, ulcerações nas narinas, epistaxe e hemorragia na pele, respiração ofegante e fezes enegrecidas, fétidas ou diarreicas com sangue nas fezes. Os animais permanecem longos períodos em decúbito, e sangram por qualquer lesão cutânea como picadas de insetos, agulhas ou traumas e apresentam sangue com viscosidade diminuída (SIPPEL, 1952; EVANS *et al.*, 1954 a, c; EVANS *et al.*, 1961; DOBEREINER *et al.*, 1967; ANJOS *et al.*, 2008; TOKARNIA

*et al.*, 2012; FURLAN *et al.*, 2014; JÖNCK, 2015). Anjos *et al.* (2008) relatam a presença de sangue na urina e no leite.

Os exames hematológicos revelam trombocitopenia, aumento no tempo de coagulação e neutropenia e, na fase final, pode haver anemia e aumento da fragilidade capilar (EVANS *et al.*, 1954c; TOKARNIA *et al.*, 1967; HIRONO *et al.*, 1984; BARROS *et al.*, 1987; ANJOS *et al.*, 2008; ANJOS *et al.*, 2009; SONNE *et al.*, 2011; JÖNCK, 2015).

A morte ocorre em dois dias a uma semana após o início dos sinais. Na necropsia, observa-se palidez de mucosas com petéquias, hemorragias de diversas formas e distribuições nas serosas e mucosas em todos os órgãos e tecidos, úlceras nas mucosas e coágulos de sangue no intestino. Em alguns casos, no fígado, observa-se áreas de contornos irregulares, mais firmes que o restante do parênquima, pálidas na parte central e rodeadas por halo de hemorragia, atingindo cápsula e parênquima (ANJOS *et al.*, 2008, 2009; TOKARNIA *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 2012; FURLAN *et al.*, 2014; JÖNCK, 2015). Bovinos que apresentavam infartos, principalmente em fígado, pulmão e intestino, morrem rapidamente e as hemorragias são menos graves. A morte rápida pode estar associada à septicemia e à embolia bacteriana após o consumo de altas doses de *Pteridium* spp. (JÖNCK, 2015). A origem das hemorragias deve-se ao aumento da fragilidade capilar, como provável consequência da trombocitopenia persistente e febre. Já os infartos no fígado são causados por embolias bacterianas ou trombose séptica em pequenos ramos da veia porta, sinusoides e veia central (VALLI, 1992; RADOSTITS *et al.*, 2002).

No exame histopatológico as principais lesões são hemorragias e áreas de necrose em diferentes órgãos. No entanto, o achado de maior importância para diagnóstico microscópico ocorre na medula óssea, que consiste em rarefação e/ou desaparecimento do tecido hematopoético (SIPPEL, 1952; EVANS *et al.*, 1954c; TOKARNIA *et al.*, 1967; VALLI, 1992; ANJOS *et al.*, 2008, 2009; TOKARNIA *et al.*, 2012; FURLAN *et al.*, 2014; JÖNCK, 2015). As áreas de necrose observadas em diferentes órgãos podem estar acompanhadas de agregados bacterianos, algumas vezes, associados com bolhas de gás. O cultivo bacteriano de amostras coletadas de áreas de infarto revelaram a presença de *Clostridium septicum* (JÖNCK, 2015).

### 2.2.2 Hematúria Enzoótica Bovina (HEB)

O desenvolvimento de processos hiperplásicos e neoplásicos da bexiga em bovinos há muitos anos estão relacionados a ingestão de *Pteridium* spp. Bovinos que ingerem *Pteridium* spp. em quantidade inferior a 10 g. kg<sup>-1</sup> por dia, durante um ou mais anos, mostram quadros crônicos de intoxicação, conhecido como hematúria enzoótica (HE) (DÖBEREINER et al., 1967; PAMUCKU et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969). Alguns autores descrevem que *Pteridium* spp. induz tumores de bexiga sem a participação de papilomavírus bovino (BPV), mas é provável que o BPV aumente os efeitos carcinogênicos dos glicosídeos iludano da planta. O *Pteridium* spp. possui propriedades imunossupressoras que contribuem para a persistência viral e por outro lado, o BPV sustenta a proliferação celular via PDGFβ na presença de dano genético induzido pelos iludanos de *Pteridium* spp., permitindo o acúmulo de mutações genéticas e contribuindo para a carcinogênese (CAMPO, 1997; MEDEIROS-FONSECA et al., 2021).

A hematúria enzoótica em bovinos caracteriza-se por processos neoplásicos ou hiperplásicos da mucosa da bexiga, que variam desde alguns milímetros até vários centímetros de diâmetro, com conseqüente hematúria crônica intermitente, anemia, emagrecimento progressivo e morte. Essa doença afeta bovinos de ambos os sexos com idades superiores a dois anos (DÖBEREINER et al., 1967; PAMACKU et al., 1976; CAMPO et al., 1992; SOUTO et al., 2006; TOKARNIA et al., 2012).

Diferentemente da intoxicação aguda e dos CCEs do TAS, a HEB não é observada em todas as regiões de ocorrência da samambaia (SMITH et al., 1989; TOKARNIA et al., 2012). Em regiões com alta incidência da planta os prejuízos econômicos são muito significativos, em especial, na pecuária de leite. Além das perdas na produção e morte dos bovinos na propriedade, alguns proprietários vendem os animais com HEB, para outros menos avisados (FRANÇA et al., 2002; GALVÃO et al., 2012). Jarrett et al. (1978a) observaram que 30% dos bovinos estudados apresentavam simultaneamente neoplasmas na bexiga e CCEs no TAS.

Os sinais clínicos de HEB caracterizam-se por urina com sangue, presença de coágulos, palidez de mucosas e emagrecimento progressivo. Incontinência urinária, micção frequente, urinar torna-se difícil e doloroso fazendo que o animal arqueie as costas durante a micção, pelagem sem brilho, obstrução e infecções secundárias do trato

urinário também pode ser observadas (FORERO, 1960; DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969; PAMUCKU *et al.*, 1976; FRANÇA *et al.*, 2002). A grande maioria dos animais afetados pela HEB morre em menos de dois anos, mesmo após retirados dos pastos com a planta (GALVÃO *et al.*, 2012).

Na necropsia, as lesões encontradas na bexiga são caracterizadas por espessamento da parede, nódulos de tamanhos variados, de milímetros a alguns centímetros, únicos ou múltiplos, formações com superfície irregular (aspecto de couve-flor) por vezes ulceradas, amareladas, esbranquiçadas ou avermelhadas, urina vermelha (hematúria) e coágulos de sangue. A mucosa pode apresentar-se congesta, com focos de hemorragia e com crescimentos vasculares. Em casos mais graves observa-se dilatação e espessamento da parede da bexiga (PAMUCKU, 1955; FORERO, 1960; DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 2012). Alguns bovinos também podem apresentar mucosas pálidas e sangue com viscosidade diminuída (SOUTO *et al.*, 2006).

O exame histológico destes tumores revela diversos tipos neoplásicos de origem tanto epitelial como mesenquimal e um mesmo animal pode apresentar mais que um tipo de neoplasia. No Brasil foram descritas inúmeras neoplasias em bexiga: papiloma e carcinoma de células de transição, adenoma tubular ou acinar, carcinoma *in situ*, carcinoma de células escamosas, carcinoma anaplásico, carcinoma de pequenas células, adenocarcinoma tubular ou papilar, adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma de células claras, hemangioma cavernoso, hemangioma capilar, hemangiossarcoma, carcinoma trabecular com diferenciação em células de Paneth, adenoma e adenocarcinoma mesonefroides, carcinoma *signet ring* (anel de sinete), carcinoma plasmocitoide, carcinoma de células cromóforas e carcinoma transicional tipo ninhado. Também se observam diversas neoplasias com aplasia e caráter infiltrativo acentuado, sem, no entanto, terem produzido metástases. Sugere-se que a origem de diferentes neoplasias no mesmo animal esteja relacionada com o período que a planta foi ingerida e a quantidade de substância cancerígena contida na planta em cada surto (PEIXOTO *et al.*, 2003; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Lesões inflamatórias e alterações não neoplásicas também foram descritas, como displasia, hiperplasia, metaplasia, cistite, infiltrado inflamatório (plasmócitos, linfócitos e histiócitos), proliferação vascular não neoplásica, edema, fibrose e hemorragias (PEIXOTO *et al.*, 2003; GONZÁLES *et al.*, 2004; GABRIEL *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2022). Em casos de HEB associado a ingestão crônica por *Pteridium* spp.,

metástases são raras (PAMUCKU *et al.*, 1976; GONZÁLES *et al.*, 2004; GABRIEL *et al.*, 2009).

### **2.2.3 Carcinomas de Células Escamosas (CCEs) no Trato Alimentar Superior (TAS)**

A ocorrência de carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) (base da língua, faringe, esôfago e rúmen) de bovinos é rara em regiões onde não há a ocorrência de *Pteridium* spp. A partir disso e sabendo da ação radiomimética da planta, correlaciona-se, a etiologia destes processos neoplásicos ao consumo desta planta (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969; TOKARNIA *et al.*, 2012). Nas diferentes regiões do Brasil, os CCEs, são popularmente conhecidos por diferentes denominações: “figueira na goela”, “cravo”, “favo”, “garrotinho” ou “caraguatá” (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Esta neoplasia é observada geralmente em animais com idade mais avançada (cinco anos ou mais). Acredita-se que para causar esta neoplasia os bovinos devem ingerir quantidades diárias de planta menores do que aquela que causa HEB, porém a ingestão se daria por um período mais prolongado. A evolução é crônica, varia de meses a anos e as neoplasias causam perturbações de ordem mecânica na ingestão e regurgitação dos alimentos (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Os sinais clínicos podem variar de acordo com a localização da neoplasia. Quando localizadas na base de língua ou na faringe, são observados sinais de ronco ao respirar (ronqueira), dificuldade de mastigação e deglutição, tosse, halitose e corrimento nas narinas e, quando localizadas no cárdia e/ou esôfago, ocorre regurgitação de alimento e timpanismo (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969, SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Outros sinais observados com frequência são: disfagia, diarreia, emagrecimento progressivo, pele seca, pelos ressecados, mucosas pálidas, dificuldade respiratória, apetite seletivo, salivação excessiva e halitose. A letalidade atinge 100% dos animais acometidos (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969; GAVA *et al.*, 2002; SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Na necropsia, observam-se formações neoplásicas, sob forma de massas amareladas a acinzentadas e infiltrativas, muitas vezes ulceradas, com superfícies irregulares (forma de couve-flor), no palato mole, base da língua, na faringe, esôfago e no rúmen. As lesões geralmente não alcançam grandes tamanhos, porém com frequência são múltiplas e associadas a papilomas na mucosa (TOKARNIA *et al.*, 1969; DÖBEREINER *et al.*, 1967; JARRETT, 1978b; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Os achados histológicos observados consistem em típicos CCEs, com formação de queratina e acompanhados de acentuada infiltração linfocitária e papilomas. Metástases podem ocorrer em linfonodos regionais, fígado, pulmão, intestino, omento, baço e bexiga (DÖBEREINER *et al.*, 1967; JARRETT, 1978b; SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

#### **2.2.4 Papilomavírus bovino x Carcinomas de células escamosas de trato alimentar superior**

Os papilomavírus (PVs) são vírus epiteliotrópicos, não envelopados, que contêm DNA circular de fita dupla com cerca de 7.000 pares de bases, pertencentes a família *Papillomaviridae*. Os PVs infectam epitélios cutâneos e/ou mucosos em várias espécies animais, desde aves à mamíferos, inclusive humanos e induzem a formação de papilomas ou verrugas que geralmente regridem sem provocar nenhum problema clínico sério no hospedeiro. O ciclo de vida do vírus está intimamente ligado ao processo de diferenciação da célula epitelial, pois os vírus infectam os queratinócitos na camada basal do epitélio escamoso estratificado e se replicam no núcleo dos queratinócitos. Até o momento, mais de duzentos tipos de PVs humanos e animais foram completamente sequenciados, o que demonstra uma grande variabilidade genética. Os PVs geralmente causam tumores benignos e regridem, mas ocasionalmente persistem e transformam-se em malignos, principalmente em casos de animais imunodeficientes e na presença de cofatores ambientais (CAMPO, 1995; CAMPO, 1997; SUNDBERG *et al.*, 2000; VILLIERS *et al.*, 2004; ZHENG; BAKER, 2006; MEDEIROS-FONSECA *et al.*, 2021).

Alguns autores sugerem que a progressão para malignidade se deve à interação entre o papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) ou tipo 4 (BPV-4) e as substâncias cancerígenas de *Pteridium* spp. Esse potencial carcinogênico tem sido atribuído a compostos glicosídeos de iludano, com propriedades imunossupressoras e mutagênicas,

como o ptaquilosídeo, que limitam a eficiência da resposta imunológica dos animais que ingerem a planta frente aos vírus que produzem as neoplasias (JARRET *et al.*, 1978a; JARRETT *et al.*, 1980; FENWICK, 1988; CAMPO *et al.*, 1985; CAMPO *et al.*, 1992; BORZACCHIELLO *et al.*, 2003; SOUTO *et al.*, 2006; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008).

No Sul da Itália, um estudo avaliou 1133 amostras de esôfago, colhidas em abatedouro, de bovinos com idade entre 4 e 12 anos. As amostras foram submetidas a exame histológico e PCR. Na histologia, 147 animais, manifestaram lesões características de papiloma, destas 75 foram submetidas a análise da PCR, e 15 amostras foram positivas para o DNA de BPV-4. Amostras de mucosa normais foram negativas para DNA viral (BORZACCHIELLO *et al.*, 2003). Campo *et al.* (1985) avaliaram através de hibridização *in situ*, 70 casos de neoplasias em bovinos, incluindo lesões pré-malignas, neoplasias primárias e metástases de TAS e em apenas um carcinoma de língua e um papiloma em transformação identificaram DNA do BPV-4. Assim, reforçaram a teoria de que a progressão maligna nos hospedeiros naturais requer cofatores, como no caso do princípio ativo de *Pteridium* spp. (EVANS *et al.*, 1982; CAMPO *et al.*, 1985).

Faccin *et al.* (2018), não detectaram DNA de BPV em papilomas do TAS de bovinos, por PCR. Estes dados corroboram com as observações de Souto *et al.* (2006), que observaram o desenvolvimento do CCE independente da presença de papiloma no local, sugerindo assim que em epitélio normal que sofre ação dos carcinógenos químicos da samambaia pode desenvolver a neoplasia. Também Jarrett *et al.* (1978a) não encontraram nenhum vírus ou antígeno viral nos CCEs no TAS de bovinos.

Campo *et al.* (1992), detectaram BPV-2 em lesões neoplásicas de bexiga de bovinos com HEB de ocorrência natural, sendo que os bovinos com esta doença eram provenientes de áreas infestadas por *Pteridium* spp, sugerindo assim um sinergismo do BPV-2 com o princípio tóxico de *Pteridium* spp. no processo de carcinogênese. No entanto, esses autores acreditam que a imunossupressão ativa o papilomavírus latente dando origem a lesões pré-malignas e que o sinergismo entre o vírus e os co-carcinógenos ambientais resulta na progressão da neoplasia.

Por outro lado, Campo *et al.* (1980, 1985, 1994) afirmam que o BPV-4 é o agente etiológico dos papilomas epiteliais do TAS de bovino. Esses tumores benignos

podem se transformar em carcinomas de células escamosas em animais que se alimentam de samambaias.

### 2.3 INTOXICAÇÃO POR *Pteridium* spp. EM HUMANOS

Em humanos associa-se o consumo de brotos de *Pteridium* spp. a neoplasias de estômago e esôfago. Alonso-Amelot e Avendaño (2001) estimam que o risco de neoplasias de trato digestivo em pessoas que tem hábito de ingerir este alimento é de 5 a 8% maior do que em pessoas que não consomem esse tipo de alimento. Os meios de exposição humana ao princípio tóxico da samambaia são através da ingestão direta da planta (PAMUCKU; PRICE, 1969; HIRAYAMA, 1979; SANTOS *et al.*, 1986; FENWICK, 1988), contato físico com os esporos (SIMÁN *et al.*, 1990), ingestão de produtos originários de animais mantidos em áreas infestadas por *Pteridium* spp. entre eles laticínios (SALAZAR, 1985; ALONSO-AMELOT *et al.*, 1996), ou até mesmo por ingestão de água de reservatórios de locais altamente infestados (EVANS 1987; FENWICK, 1988).

*Pteridium* spp. é consumido em quantidades significativas em algumas partes do mundo, como no Japão, nordeste dos Estados Unidos, no Canadá, na China, na Sibéria, na Costa Rica (HIRAYAMA, 1979; SALAZAR, 1985; FENWICK, 1988) e no Brasil (SANTOS *et al.*, 1986). No Brasil, na região de Ouro Preto, Minas Gerais, o broto é amplamente consumido. A planta é preparada após um período de fervura em água com bicarbonato de sódio para diminuir o sabor amargo (SANTOS *et al.*, 1986). Este hábito também é observado em populações orientais nas cidades de São Paulo e na região norte do Paraná (CRUZ; BRACARENSE, 2004).

Alguns autores descrevem que o leite de vacas que se alimentavam regularmente com brotos de samambaia, continha ptaquilosídeo a partir de 38 horas após a ingestão dessa planta e continuou a ser excretado em níveis constantes por 62 – 70 horas após a planta ser retirada da dieta (ALONSO-AMELOT *et al.*, 1996, 1998; SALAZAR, 1985).



### 3 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial carcinogênico de *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* em bovinos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a quantidade ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) e tempo de ingestão de *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* necessários para produzir neoplasias no trato alimentar superior de bovinos.
- Analisar a presença de papilomavírus e sua possível participação na produção de neoplasias do trato alimentar superior de bovinos nos casos espontâneos e nos casos experimentais, através de PCR e sequenciamento de alto desempenho.

#### 4 REFERÊNCIAS

ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; SMITH, B. L.; LAUREN, D. R. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**, Inglaterra, v. 382, p. 587, 1996. DOI: 10.1038/382587a0.  
ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)**, Buenos Aires, v. 16, n. 6, p. 528-541, 1999.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDAÑO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in venezuela: an epidemiologic study. **International Journal of Cancer**, Heidelberg, v. 9, n. 2, p. 252-259, 2001. DOI: 10.1002/1097-0215(20010115)91:2<252::aid-ijc1028>3.0.co;2-o.

ANJOS, B. L.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R.; GOMES, A. D.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, n. 10, p. 501-507, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001000010>.

ANJOS, B. L.; IRIGOYEN, L. F.; PÍAZER, J. V. M.; BRUM, J. S.; FIGHERA, R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 29, n. 9, p. 753-766, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000900013>.

BARROS, C. S. L.; GRAÇA, D. L.; SANTOS, M. N.; BARROS, S. S. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 7, n. 37, p. 33-38, 1987.

BORZACCHIELLO, G.; AMBROSIO, V.; ROPERTO, S.; POGGIALI, F.; TSIRIMONAKIS, E.; VENUTI, A. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. **Journal of Comparative Pathology**, Reino Unido, v. 128, p. 203-206, 2003. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0626.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, Califórnia, v. 39, n. 5, p. 39-45, 2008. DOI: 10.1051/vetres:2008022.

CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; JARRETT, W. F. H.; LAIRD, H. M. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, Inglaterra, v. 286, p. 180-182, 1980. DOI: 10.1038/286180a0.

CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; SARTIRANA, M. L.; KENNEDY, I. M.; JARRETT, W. F. H. The presence of bovine papillomavirus type 4 DNA is not required for the progression to, or the maintenance of, the malignant state in cancers of the alimentary canal in cattle. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 4, n. 7, p. 1819-1825, 1985. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb03856.x.

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

CAMPO, M. S.; O'NEIL, W. B.; BARRON, J. R.; JARRETT, W. F. H. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 15, n. 8, p. 1597-1601, 1994. DOI: 10.1093/carcin/15.8.1597.

CAMPO, M. S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in Microbiology**, Reino Unido, v.3, n. 3, p. 92-97, 1995. DOI: 10.1016/s0966-842x(00)88889-7

CAMPO, M. S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, Califórnia, v. 154, p. 175-188, 1997. DOI: 10.1016/s1090-0233(97)80019-6.

CRUZ, G. D.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Role of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) in animal and human health. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 249-258, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2004v25n3p249>.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 2, p. 489-504, 1967.

EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R.; HUGHES, L. E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part I. **British Veterinary Journal**, Califórnia, v. 110, n. 8, p. 295-306, 1954a. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)44954-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)44954-2).

EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R.; HUGHES, L. E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part III. Field Outbreaks of Bovine Bracken Poisoning. **British Veterinary Journal**, Califórnia, v. 110, n. 10, p. 4426-4442, 1954c. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)50123-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)50123-2).

EVANS, W. C.; PATEL, M. C.; KOOHY, Y. Acute bracken poisoning in homogastric and ruminant animals. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, Cambridge, v. 81, p. 29-64, 1982.

EVANS, W. C.; EVANS, I. A., AXFORD, R. F. E., THRELFALL, G.; HUMPHREYS, D. A.; THOMAS, A. J. Studies on bracken poisoning in cattle – part VII. The toxicity of bracken carcinogenicity. In: JAMES, G.V. Reviews on Environmental Health. **Reviews on Environmental Health**, Arizona, v. 7, n. 3, p. 161-199, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1515/REVEH.1987.7.3-4.161>.

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

EVANS, W. C. Bracken thiaminase – mediated neurotoxic syndromes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 73, p. 113-131, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1976.tb02017.x>

EVANS, I. A. Bracken carcinogenicity. In: JAMES, G.V. Reviews on Environmental Health. **Reviews on Environmental Health**, Arizona, v. 7, n. 3, p. 161-199, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1515/REVEH.1987.7.3-4.161>.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) – Toxic effects and to constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Nova Jersey, v. 46, p. 147-173, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740460204>.

FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polipodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 22, n. 3, p. 85-93. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2002000300001>.

FORERO, G. L. La cistitis crônica hemorrágica o hematuria esencial de los bovinos en Colombia. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, Colômbia, v. 23, n. 120, p. 629-646, 1960. DOI: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/15552>.

FURLAN, F. H.; MENDES, E. R. S.; DUCATTI, K. R.; MARCON G. C.; DOMBROSKY, T.; AMORIM, T. M.; RIET-CORREA, F. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2014. DOI:10.1590/S0100-736X2014000400008.

GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, F. A.; PIAZER, J. V. M.; BARROS, C. S. L.; MARTINS, T. B.; ROSA, F. B. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 29, n. 7, p. 515-525, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700005>.

GALVÃO A.; BRITO M. F.; ARAGÃO A. P.; YAMASAKI E. M.; PEIXOTO P. V.; TOKARNIA C. H. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 9, p. 887-902, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000900013>.

GAVA, A. Intoxicações por plantas de ação anti-hematopoética e mutagênica. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicações por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos**. 3. ed. Montevideo: Agropecuária Hemisfério Sul, 1993. p. 247-258.

GAVA, A.; DA SILVA NEVES, D.; GAVA, D.; DE MOURA, S. T.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*) Poisoning in Cattle in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Dublin, Ohio, v. 44, n. 6, p. 362-365, 2002.

GONZÁLES C. E.; CHAVERA, A. C.; PERALES, R. C.; FALCÓN, N. P.; EVARISTO, R. R. Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de Oxapampa, Pasco. **Revista de Investigaciones**

**Veterinarias Del Peru**, Lima, v. 15, n. 1, p. 25-36, 2004. DOI: 10.15381/rivep.v15i1.1559.

HIRAYAMA, T. Diet and cancer. **Nutrition and Cancer**, Califórnia, v. 1. N. 3, p. 67-81, 1979. DOI: 10.1080/01635587909513632.

HIRONO, I.; FUSHIMI, K.; MORI, H.; MIWA, T.; HAGA, M. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1367-1371, 1973. DOI: 10.1093/jnci/50.5.1367.

HIRONO, I.; AISO, S.; YAMAJI, T.; MORI, H.; YAMADA, K.; NIMA, H.; OJIKI, M.; WAKAMATSU, K.; KIGOSHI, H.; NIYAMA, K.; UOSAKI, Y. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. **GANN Japanese Journal of Cancer Research**, Tokyo, v. 75, n. 10, p. 833-836, 1984. DOI: [https://doi.org/10.20772/cancersci1959.75.10\\_833](https://doi.org/10.20772/cancersci1959.75.10_833).

JARRET, W. F. H.; McNEIL, P. E.; GRIMSHAW, W. R. T.; SELMAN, I. E.; McLINTYRE, I. M. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. **Nature**, Inglaterra, v. 274, p. 215-217, 1978a. DOI: 10.1038/274215a0.

JARRETT, W. F. H. Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma in cattle. **Bull Cancer**, Califórnia, v. 65, n. 2, p.191-194, 1978b.

JARRETT, W. F. Bracken fern and papilloma virus in bovine alimentary cancer. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 36, p. 79-81, 1980. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071618.

JÖNCK, F. **A intoxicação de bovinos por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em Santa Catarina e a identificação das bactérias envolvidas nos infartos do quadro agudo**. 2015. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

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

MARRS, R. H.; WATT, A. S. Biological flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. **Journal of Ecology**, Reino Unido, v. 94, p. 1272-1321, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01177.x.

MATOBA, M.; SAITO, E.; SAITO, K.; KOYAMA, K.; NATORI, S.; MATSSHIMA, T.; TAKIMOTO, M. Assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. **Mutagenesis**, Reino Unido, v. 2, n. 6, p. 419-425, 1987. DOI: 10.1093/mutage/2.6.419.

MEDEIROS-FONSECA, B.; ABREU-SILVA, A. L.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P.A.; GIL DA COSTA, R. M. *Pteridium* spp. and Bovine Papillomavirus: Partners in

Cancer. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 8, p. 1-9, 2021.  
Doi:10.3389/fvets.2021.758720

PAMUKCU A. M. Investigations on pathology of enzootic bovine haematuria in Turkey. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v. 2, p. 409-429, 1955.

PAMUKCU, A. M.; GOKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary Bladder Neoplasms Induced by Feeding Bracken Fern (*Pteris aquilina*) to Cows. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 27, p. 917-924, 1967.

PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M. Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 43, p. 275-281, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/43.1.275>.

PAMUCKU, A. M.; PRICE, J. M.; BRYAN, G. T. Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumors. **Veterinary Pathology**, Califórnia, v. 13, p. 110-122, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098587601300205>.

PAMUKU, A. M.; YALCINER, S.; BRYAN, G. T. Inhibition of carcinogenic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) by various chemical. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 40, p. 2450-2454, 1977. DOI: 10.1002/1097-0142(197711)40:5+<2450::aid-cncr2820400910>3.0.co;2-w.

PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H. Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 23, n. 2, p. 65-81, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000200004>.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. 9. ed. **Clínica veterinária - um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, 1737p.

RASMUSSEN, L. H.; JENSEN, L. S.; HANSEN, H. C. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. **Journal Chemical Ecology**, Nova York, v. 29, n. 3, p. 771-778, 2003. DOI: 10.1023/a:1022885006742.

ROCHA, J. F.; SANTOS, B. B. N.; GALVÃO, A.; MARQUES, T. O.; SILVA, L. R. L.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V. Occurrence enzootic hematuria in buffaloes in Brazil: epidemiological, clinical, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 42, p.1-13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6875>.

SAITO, K.; NAGAO, T.; MATOBA, M.; KOYAMA, K.; NATORI, S.; MURAKAMI, T.; SAIKI, Y. Chemical assay of ptaquiloside, the carcinogen of *Pteridium aquilinum*, and the distribution of related compounds in the pteridaceae. **Phytochemistry**, Nova York, n. 6, v. 28, p. 1605-1611, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97808-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97808-7).

SALAZAR, J. V. Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del câncer gástrico em Costa Rica. **Revista Costa Rica de Ciências Medicas**, San José, v.6, n. 3, p. 131-139, 1985.

SANTOS, R. C.; BRASILEIRO-FILHO, G.; HOJO, E. S. Studies on the possible carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) from Ouro Preto, MG, Brazil. **Ciência e Tecnologias de Alimentos**, Campinas, v. 6, p. 93-98, 1986.

SIMÁN, S. E.; POVEY, A. C.; WARD, T. H.; MARGISON, G. P.; SHEFFIELD, E. Fern spore extracts can damage DNA. **British Journal of Cancer**, Inglaterra, v. 83, p. 69-73, 2000. DOI: 10.1054/ bjoc.2000.1204.

SIPPEL, L. Bracken fern poisoning. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 121, p. 9-13, 1952.

SMITH, B. L.; EMBLING, P. P.; LAUREN, D. R.; AGNEW, M. P.; ROSS, A. D.; GREENTREE, P. L. Carcinogen in rock fern (*Cheilanthes sieberi*) from New Zealand and Australia. **Australian Veterinary Journal**, Camberra, v. 66, n. 5, p. 154-155, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1989.tb09785.x>.

SMITH, B. L.; SEAWRIGHT, A. Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health – a brief review. **Natural Toxins**, Nova Jersey, v. 3, p. 1-5, 1995. DOI: 10.1002/nt.2620030102

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

SMITH, B. L. Bracken Fern (genus *Pteridium*) Toxicity - a Global Problem. In: **Poisonous Plants and Related Toxins**. 6. ed. CABI Publishing: Cambridge, 2001. p. 227-240.

SONNE, L.; BANDARRA, P. M.; RAYMUNDO, D. L.; PEDROSO, P. M. O.; DALTO, A. G. C.; LEAL, J. S.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Outbreak of acute poisonig by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in cattle. In: RIET-CORREA, F.; et al. **Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins**. 1. ed. CABI International, 2011, p. 402-405.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; PIAZER, J. V. M.; RECH, R. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 26, n. 2, p. 112-122, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200009>.

SUNDBERG, J. P.; VAN RANST, M.; MONTALL, R.; HOMER, B. L.; MILLER, W. H.; ROWLAND, P. H.; SCOTT, D. W.; ENGLAND, J. J.; DUNSTAN, R. W.; MIKAEIAN, I.; JENSON, A. B. Feline papillomas and papillomaviruses. **Veterinary Pathology**, Califórnia, v. 37, p. 1-10, 2000. DOI: 10,1354/vp.37-1-1.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da intoxicação aguda pela “samambaia” (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 2, p. 329-336, 1967. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab1967.v2.17929>.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. II Estudos Complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 4, p. 209-224, 1969. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab1969.v4.17847>.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. B.; PEIXOTO, P. V.; DOBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012, p. 349-364.

VALLI, V. E. O. The hematopoietic system. In: JUBB K. V. F.; KENNEDY P. C.; PALMER N. **Pathology of Domestic Animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1992. p. 101-265.

VAN DE HOEVEN, J. C. M.; LAGERWIGI, W. J.; POSTHMUS, M. A.; VELHUIZEN, A. V.; HOLTERMAN, H. J. Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). **Carcinogenesis**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 1587-1590, 1983. DOI: 10.1093/carcin/4.12.1587.

VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN; H. H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, Califórnia, v. 324, p. 17-27, 2004. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, Lausanne, v. 11, p. 2286-2302, 2006. Doi: 10.2741/1971.



## 5 REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM TRATO ALIMENTAR SUPERIOR DE BOVINOS PELA INGESTÃO DE *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*

### 5.1 RESUMO

Carcinoma de células escamosas do trato alimentar superior em bovinos ocorrem em todos os continentes e é atribuído a ingestão de *Pteridium* spp., embora a doença não tenha sido reproduzida experimentalmente. Este trabalho descreve a reprodução experimental de carcinoma de células escamosas em trato alimentar superior de bovinos alimentados com brotos verdes e folhas jovens de *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*. A doença foi reproduzida a partir do fornecimento dessa planta à seis bovinos nas doses de 2,5 e 5,0 g.kg<sup>-1</sup>, por um período entre 755-1239 dias. Três bovinos tiveram manifestações clínicas bem definidas caracterizadas por tosse, disfagia, regurgitação, sialorreia, halitose e emagrecimento progressivo. Todos foram sacrificados, sendo que destes, dois encontravam-se em estágio avançado da doença. Na avaliação macroscópica, nos seis bovinos foram observados processos neoplásicos sob forma de massas amareladas, infiltrativas, na maioria das vezes com superfície ulcerada e através da avaliação histológica foram confirmadas como CCEs. Essas lesões estavam distribuídas desde a base da língua, esôfago e parte inicial do rúmen. Apenas em um bovino observou-se metástase em linfonodos retrofaríngeo. O quadro clínico-patológico experimental foi similar ao observado na doença espontânea.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas, samambaia, neoplasia, bovino.

### 5.2 INTRODUÇÃO

*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* está entre as plantas tóxicas mais estudadas e de maior importância do mundo, por seu potencial carcinogênico e sua distribuição cosmopolita. Causando intoxicações em diversas espécies animais e sendo associada a enfermidades em humanos. No entanto, no Brasil, fora do meio acadêmico, poucos sabem ou aceitam que a samambaia, como é conhecida popularmente, seja uma planta tóxica com tamanha importância para bovinos (PAMUKCU *et al.*, 1977; EVANS, 1987; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Em bovinos, três doenças distintas são associadas a ingestão de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*. Uma enfermidade que cursa com quadro agudo, caracterizado por hemorragias, anemia e febre, conhecida como síndrome hemorrágica aguda ou diátese hemorrágica, associada à aplasia de medula óssea. Nesta os animais ingerem quantidades diárias maiores que 10g/kg da planta (10-30g/kg), durante algumas semanas a poucos meses ou até o peso da planta ingerida se igualar ao peso do animal (EVANS *et al.*, 1954 a, c; EVANS *et al.*, 1961; DÖBEREINER *et al.*, 1967; ANJOS *et al.*, 2008; TOKARNIA *et al.*, 2012; JÖNCK, 2015). E dois quadros crônicos, um caracterizado por formações neoplásicas ou hiperplásicas na bexiga, com consequente hematúria intermitente, anemia, emagrecimento progressivo e morte. Na Hematúria Enzoótica Bovina (HEB), os animais ingerem a planta, em quantidade inferior a 10g.kg<sup>-1</sup> por dia, durante um ou mais anos (DÖBEREINER *et al.*, 1967; PAMUCKU *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969; CAMPO *et al.*, 1992; SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012). Já os carcinomas de células escamosas (CCEs) associado a ingestão crônica de *Pteridium* spp. são encontrados em diferentes localizações no trato alimentar superior (TAS) (base da língua, faringe, esôfago e rúmen). O quadro clínico é observado em bovinos mais velhos (acima de 5-6 anos) e caracteriza-se por emagrecimento progressivo, dificuldade de deglutição, regurgitação de alimento, tosse, e as vezes corrimento esverdeado nas narinas e timpanismo (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969, SOUTO *et al.*, 2006; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Os bovinos podem ingerir os brotos de samambaia quando houver escassez de pastagens devido condições climáticas adversas (geadas e secas), queimadas, superlotação ou por pastejarem em pastagens tenras e necessitarem alimentos fibrosos. Uma vez adquirido o hábito da ingestão suspeita-se que os animais viciam e permanecem com o consumo da planta mesmo saneado o problema (SIPPEL, 1952; EVANS *et al.*, 1954a; PARKER; McCREA, 1965; TOKARNIA *et al.*, 2012).

Entre os princípios tóxicos da planta destaca-se um norsesquiterpeno denominado ptaquilosídeo, que apresenta efeito carcinogênico por sua ação radiomimética (HIRONO *et al.*, 1984).

Os objetivos deste trabalho foram a reprodução experimental, determinação da quantidade (g.kg<sup>-1</sup>) e tempo de ingestão de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*, necessários para o desenvolvimento de CCEs no TAS em bovinos.

### 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nas dependências do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina. Para a experimentação foram colhidos brotos verdes e folhas jovens de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*, duas ou três vezes por semana, em propriedades localizadas na região serrana de Santa Catarina, com alta infestação da planta e com histórico da ocorrência da doença.

A planta foi armazenada em sala arejada, em temperatura ambiente e posteriormente fornecida em doses diárias de 2,5 e 5,0 g/Kg, para seis bovinos machos e fêmeas, de raças puras e mestiços. Os bovinos eram provenientes de propriedade livre de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*. O experimento foi conduzido durante o período vegetativo da planta (setembro a maio).

*P. esculentum* subsp. *arachnoideum* era fornecida no final do dia, em cochos individuais e os bovinos eram pesados a cada 60 dias, a fim de ajustar a quantidade de planta fornecida. Com o intuito de estimular o consumo, nos primeiros dias de experimento era fornecido ração misturada com a planta.

Os animais em experimentação eram avaliados diariamente, em relação às características das fezes, urina, apetite e comportamento. As duas fêmeas (bovino 01 e 02) submetidas a experimentação foram eutanasiadas em estágio avançado da doença e os bovinos 03, 04, 05 e 06 foram sacrificados em abatedouro. De todos os bovinos foram coletadas amostras de pulmão, coração, esôfago, bexiga, rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino, fígado, rim, baço, linfonodos, glândula salivar, tireoide e sistema nervoso central, e fixadas em formalina a 10%, para exame histológico.

A reprodução experimental da doença foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/CAV-UDESC), e registrada sob o número 6544210716.

### 5.4 RESULTADOS

Os sinais clínicos dos bovinos 01 e 02 foram semelhantes e iniciaram 21 e 29 meses, respectivamente, após início da ingestão da planta. Estes sinais caracterizam-se por disfagia, tosse, principalmente ao ingerir alimentos, regurgitação, pelos longos, opacos e arrepiados, salivação, progressiva perda de peso (Figura 1) e halitose. No

bovino 01, além dos sinais descritos observou-se corrimento nasal esverdeado (Figura 2) e diarreia. Em ambos, o apetite se manteve e por serem vacas gestantes os sinais clínicos se exacerbaram próximo e após o parto, e foram eutanasiadas na fase terminal da doença.

Figura 1- A. Bovino 01, 16 dias pós-parto, emagrecimento progressivo, pescoço esticado após pastejo e aumento de volume no pescoço. B. Bovino 2, emagrecimento progressivo e com pelos longos e arrepiados



Fonte: Elaborada pela autora (2019, 2020).

Figura 2 - Bovino 01, corrimento nasal esverdeado.



Fonte: Elaborada pela autora (2019,

Dos quatro bovinos restantes apenas o Bovino 04 manifestou sinais clínicos aos 1131 dias (37 meses ou 3 anos e 1 mês) de experimento, caracterizados por disfagia, mantinha o pescoço esticado durante a mastigação e teve episódios de regurgitação, tosse frequente e todos foram encaminhados para abate.

À necropsia, no Bovino 01 observou-se um único processo neoplásico, caracterizado por espessamento anelar estenosante na parede esofágica (Figura 3), na porção proximal (17 cm da glote), a massa apresentava-se com consistência firme, medindo 11 x 8 x 7 cm, não ulcerada, ao corte amarela com necrose central.

Figura 3 - Bovino 01 - Neoplasia em esôfago, com consistência firme, não ulcerado, ao corte coloração amarelada com necrose central



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

No Bovino 02, observou-se múltiplos processos neoplásicos. Na base da língua a massa era ulcerada, medindo 8 cm de comprimento por 5 cm de largura, infiltrativa (9 cm de profundidade), de coloração amarela, associada a extensa necrose, acúmulo de alimento e odor fétido. No esôfago na porção média observou-se múltiplas áreas espessas na mucosa, com formato arredondado, tamanhos variando de 1 a 5,5 cm de diâmetro. Múltiplos papilomas foram observados ao longo de todo esôfago, glote e cárdia. Os linfonodos retrofaríngeos foram os únicos que apresentaram aumento de volume e ao corte eram firmes e de coloração amarela (Figura 4).

Figura 4 - Bovino 02, A. Neoplasias em base de língua e esôfago, B. linfonodo retrofaríngeo com metástase



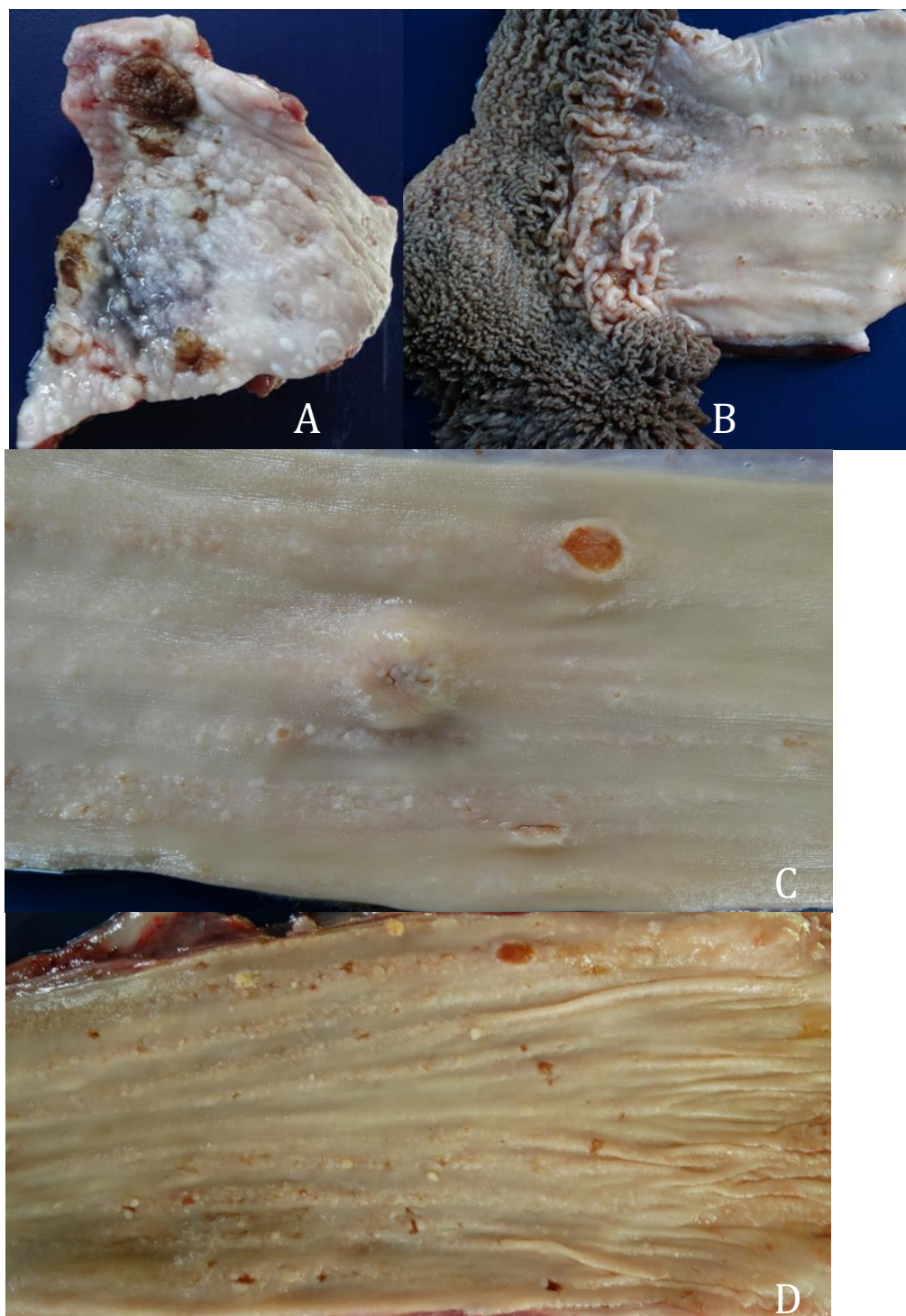
Fonte: Elaborada pela autora (2019).

No Bovino 03, observou-se na base da língua três nodulações com superfície irregular e vermelha, com tamanhos variando entre 0,3 cm a 1 cm de diâmetro e pequenas ulcerações associadas a alguns papilomas. No esôfago, a 12 cm da base da língua, área de 11,5 cm com múltiplas lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, de tamanho não maior que 0,9 cm de diâmetro com superfície branca e irregular, múltiplos papilomas de tamanhos variando de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro. A 30 cm da base da língua um nódulo de 2,3 x 1 cm de diâmetro, brancocento, de superfície lisa e firme ao corte, com a mesma característica a 11 cm do rúmen havia um

nódulo de 2 x 1,5 cm de diâmetro, que ao corte apresentava área de necrose central e próximo a este observou-se múltiplas lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, de tamanhos variados, sendo a maior medindo 7 mm, com superfície branca e rugosa e pequenos papilomas. No rúmen, estas lesões circulares em placa tinham centro deprimido e bordos elevados, apresentavam tamanhos de até 0,5 cm, com superfície vermelha e irregular (Figura 5).



Figura 5 - Bovino 3. A. Nodulações com superfície irregular em base de língua. B. Rúmen, lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, com superfície vermelha e irregular. C. Esôfago, nódulo, e 2,3 x 1cm. D. Esôfago, múltiplas lesões circulares

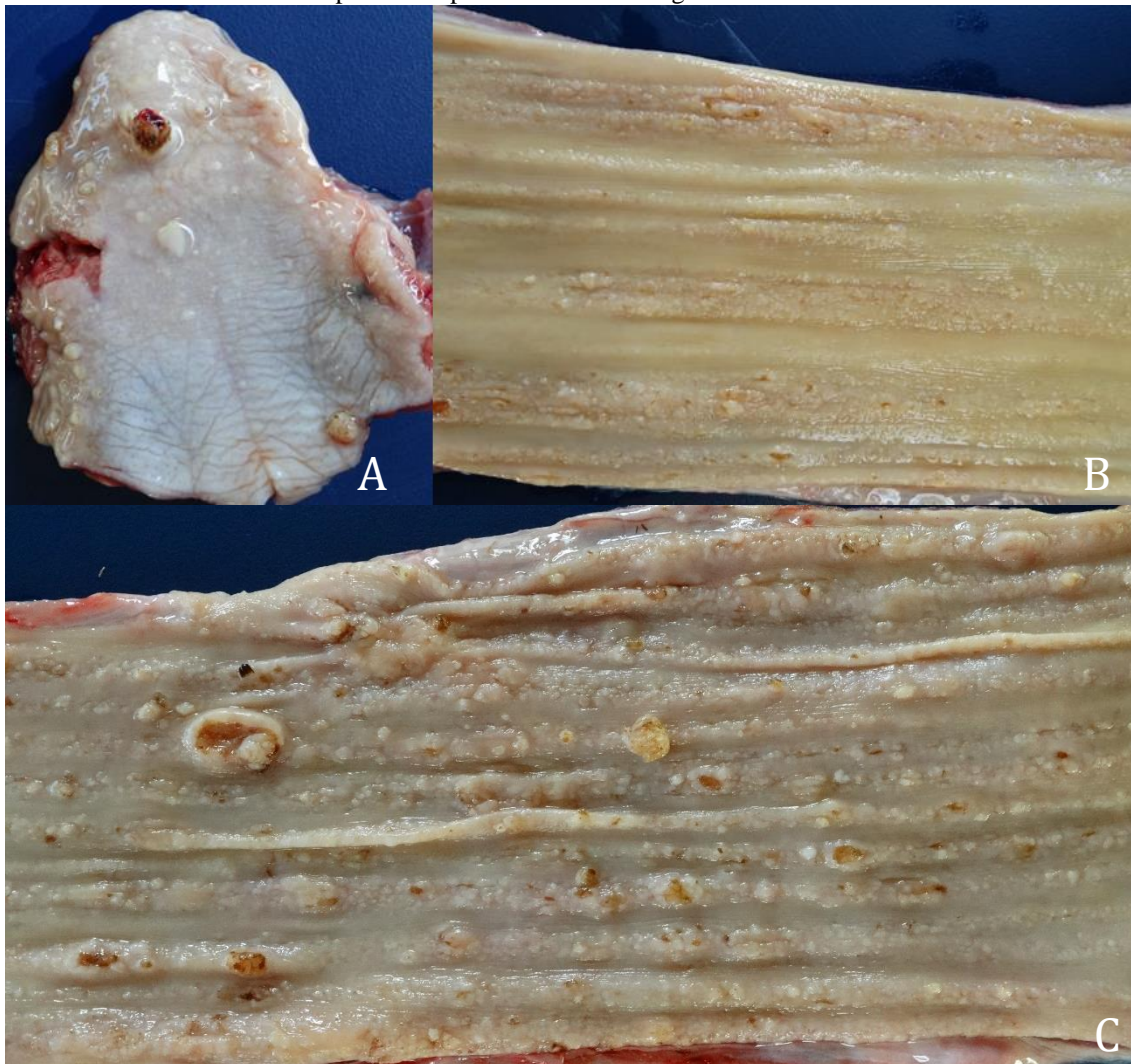


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

No Bovino 04, observou-se vários papilomas na base da língua e no esôfago, a 9 cm da faringe, área de 29 cm com múltiplas lesões circulares em placa com centro

deprimido e bordos elevados, de tamanhos variando de 2 mm a 1 cm, com superfície branca e rugosa e múltiplos papilomas. Na porção média a distal do esôfago, área de 33 cm com lesões iguais as descritas na porção superior (Figura 6).

Figura 6 - Bovino 4. A. Papiloma em base da língua. B e C. Esôfago com múltiplas lesões circulares, bordos elevados com centro deprimido superfície branca e irregular.

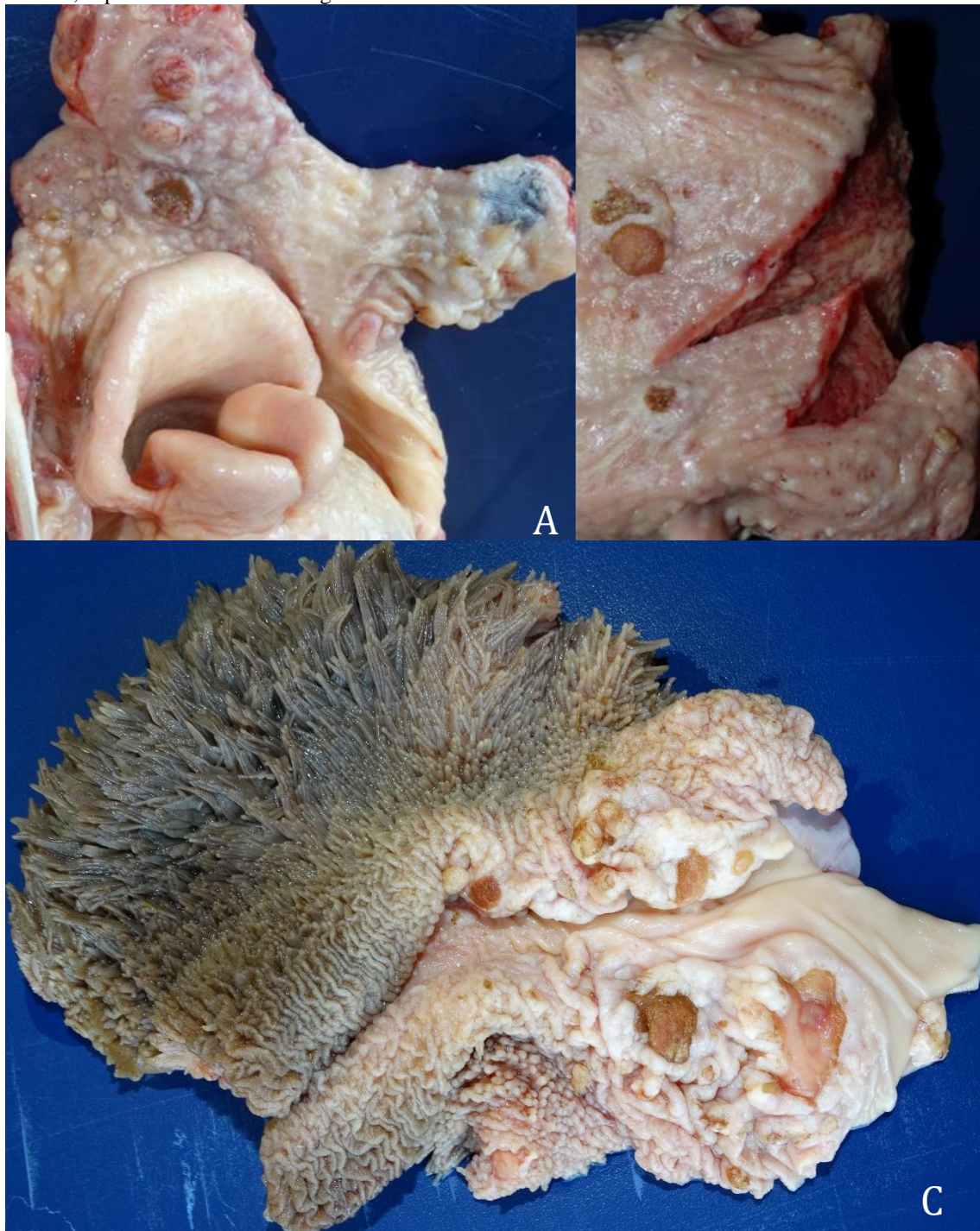


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O Bovino 05, na base da língua observou-se múltiplas lesões circulares em placa com superfície rugosa e ulceradas, de tamanho variando de 0,5 a 1 cm de diâmetro. Na glote, múltiplas lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, de superfície vermelha e irregular. No rúmen, múltiplas elevações de tamanhos variando de 0,3 a 1 cm de diâmetro e múltiplas lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, superfície vermelha e irregular, de tamanho variando de 0,5 a 2 cm de

diâmetro. Já no esôfago um único papiloma de 1 cm de diâmetro foi encontrado a 14 cm da glote (Figura 7).

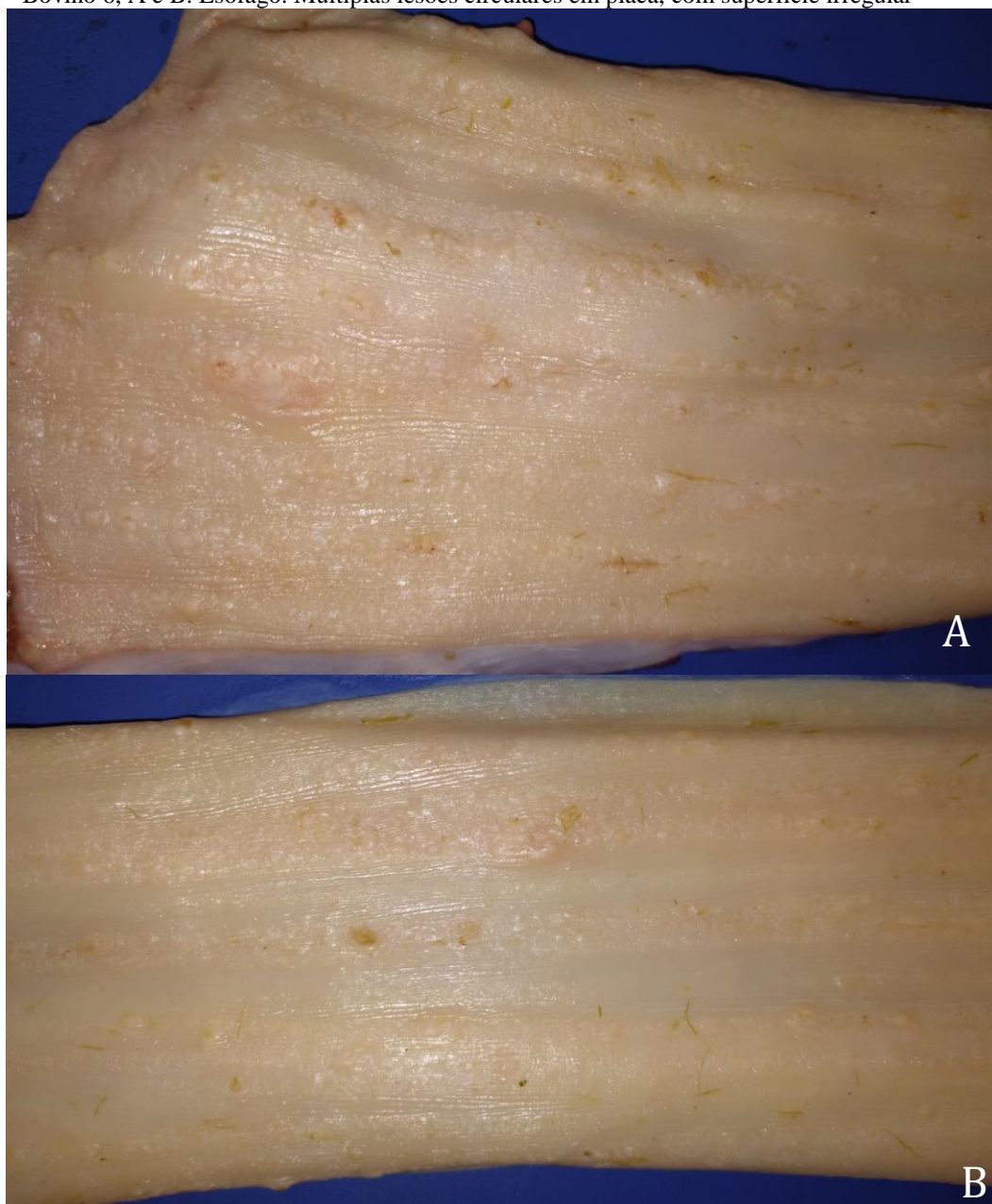
Figura 7 - Bovino 5. A. Glote, múltiplas lesões circulares e úlceras. B. Base da língua, elevações da superfície, de forma rugosa e ulceradas. C. Rúmen, lesões circulares em placa com centro deprimido e bordos elevados, superfície vermelha e irregular.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O Bovino 06, resultante da gestação de uma das vacas (Bovino 02), durante o experimento, por permanecer junto a mãe, ao terceiro dia de vida iniciou voluntariamente a ingestão fragmentada de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* e a partir do 10º mês de vida foi incluído no experimento recebendo diariamente 5,0 g/kg de samambaia. Com 2 anos e 11 meses foi abatido e observou-se na porção distal do esôfago, múltiplas lesões circulares em placa, com superfície irregular e tamanhos variados, de até 5 mm de diâmetro (Figura 8). Os resultados da reprodução experimental constam na Tabela 01.

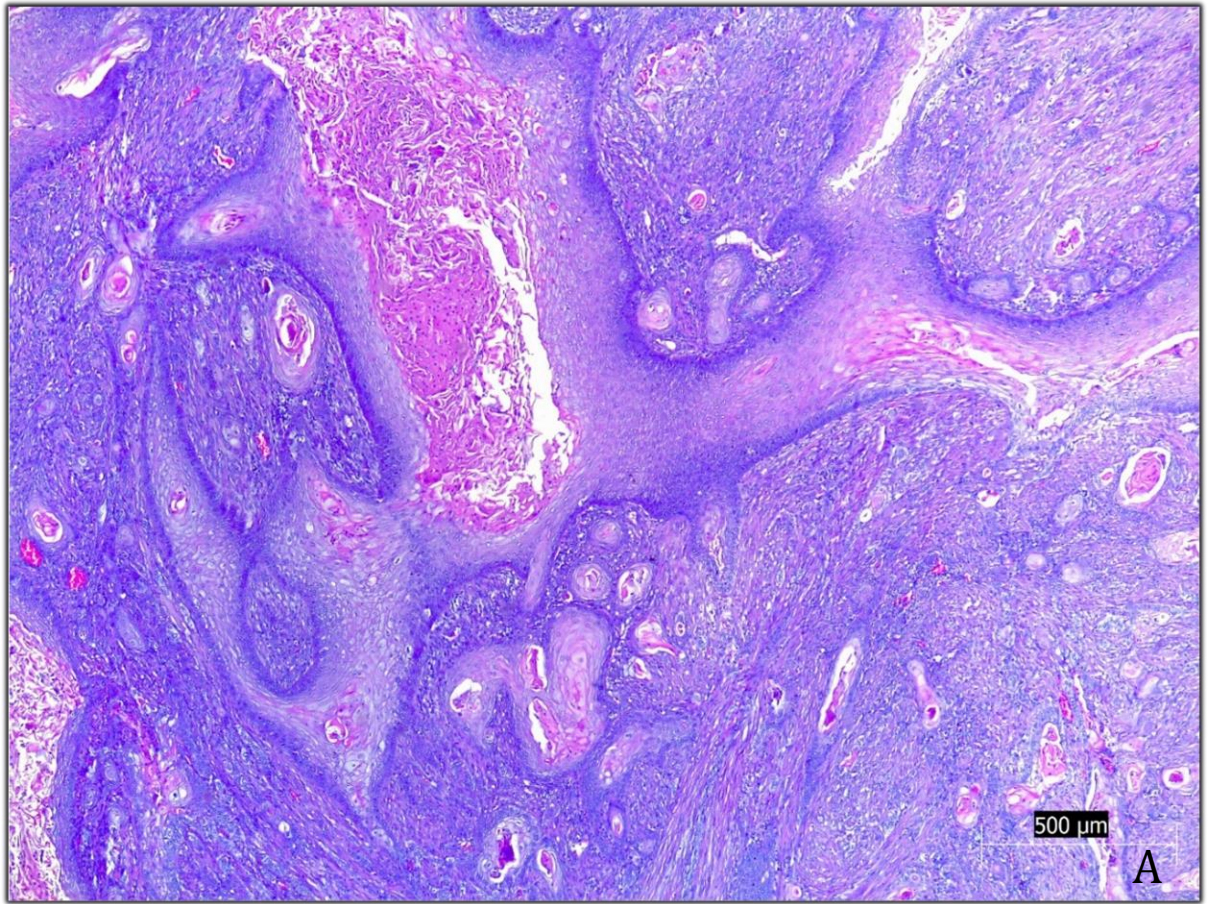
Figura 8 - Bovino 6, A e B. Esôfago. Múltiplas lesões circulares em placa, com superfície irregular



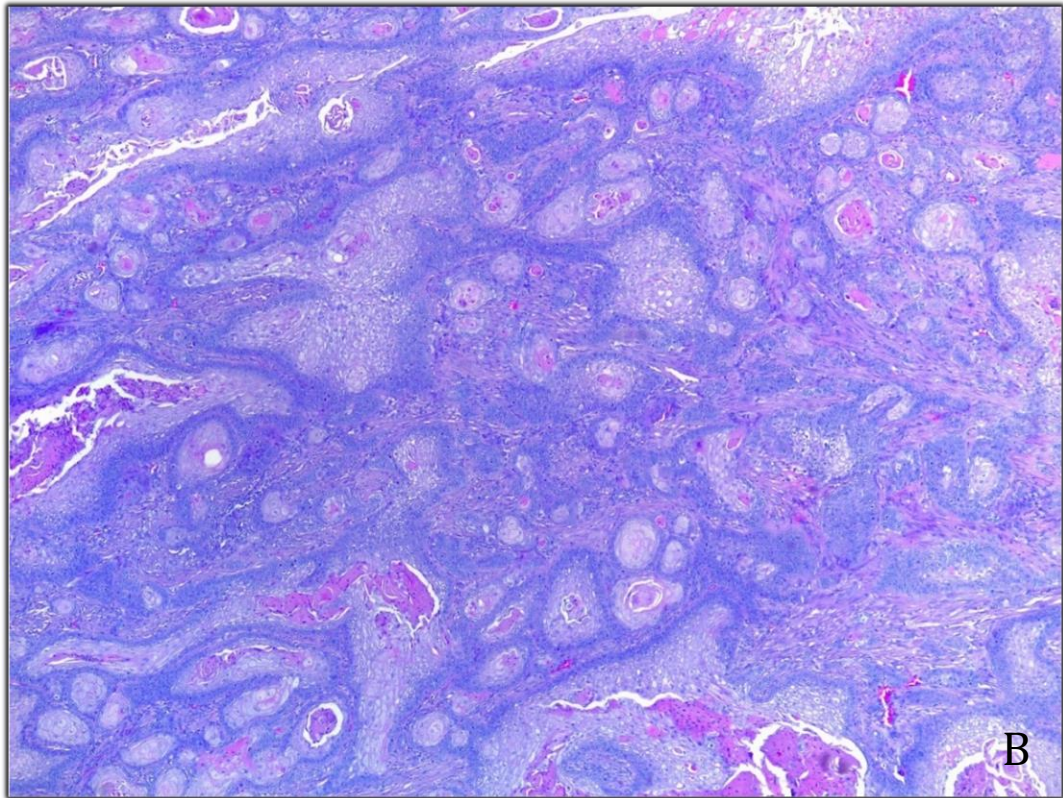
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O exame histológico das amostras de língua, esôfago e rúmen, dos seis bovinos revelaram carcinoma de células escamosas, caracterizado pela proliferação de células epiteliais, formando ninhos, as vezes com “pérolas” de queratina central e circundados por linfócitos e em menor número plasmócitos. As células neoplásicas estendem-se desde a mucosa até a submucosa, da base da língua, do esôfago e do rúmen. Estas células geralmente são grandes e poligonais com citoplasma amplo e eosinofílico. Na superfície das áreas ulceradas, observa-se necrose, infiltrado predominante de neutrófilos e colônias bacterianas. Frequentemente, as células neoplásicas são vistas infiltrando-se no epitélio adjacente (Figura 9). No bovino nº 02, as células tumorais também são observadas invadindo os linfonodos retrofaríngeos. Na bexiga foi observado hiperplasia de epitélio de transição e infiltrado mononuclear, de intensidade leve na submucosa, nos bovinos nº 1, 3 e 4. No bovino nº 1, além dessas lesões, também foi observado proliferação de capilares sanguíneos e projeções papilares na mucosa.

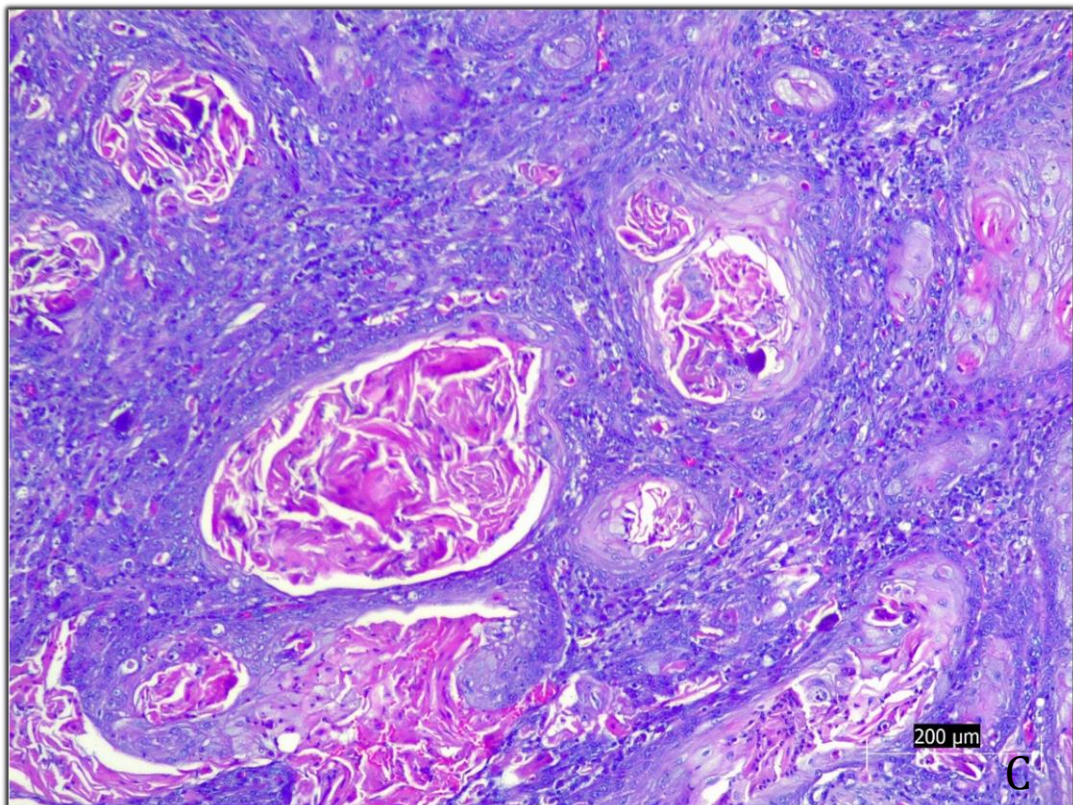
Figura 9 - Microscopia de neoplasia em esôfago, caracterizando um Carcinoma de células escamosas. Bovino 1. Reprodução experimental. Coloração de HE. A e B. Aumento de 40x. C. Aumento de 100x



Fonte: Elaborada pela autora (2020).



Fonte: Elaborada pela autora (2020).



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Tabela 1. Número, idade, peso, dose e resultados obtidos com a reprodução experimental por *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* em bovinos.

Nº Bovino/ sexo	Idade (meses)	Peso inicial (Kg)	Peso final experimento (Kg)	Dose g/Kg	Total dias experimento	Dias de ingestão	Quantidade consumida (Kg)	Início dos sinais (Dias)	Curso Clínico (Dias) / Desfecho	Sinais Clínicos	Localiz. Lesões macro/microscópicas
<b>01</b> <b>Feminino</b>	14	140	380	5,0	770	331	424,660	639	131 Eutanásia	Tosse, Regurgitação, Disfagia, Emagrecimento Progressivo	Esôfago/bexiga
<b>02</b> <b>Feminino</b>	14	175	350	5,0	1050	425	515,550	881	169 Eutanásia	Tosse, Disfagia, Sialorreia, Emagrecimento Progressivo, halitose	Base da Língua, Esôfago e linfonodos
<b>03</b> <b>Masculino</b>	12	163	750	2,5	1239	618	606,340	SSC	Abate	-	Base da Língua, Esôfago, Rúmem e bexiga.
<b>04</b> <b>Masculino</b>	15	210	650	5,0	1140	509	1091,900	1131	Abate	Disfagia	Esôfago e bexiga
<b>05</b> <b>Masculino</b>	15	160	540	2,5	868	401	393,600	SSC	Abate	-	Base da língua, Glote, Rúmen
<b>06</b> <b>Masculino</b>	10	266	550	5,0	755	217	302,150	SSC	Abate	-	Esôfago
*SSC: sem sinais clínicos											



## 5.5 DISCUSSÃO

Experimentalmente, *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* produziu CCEs no TAS de bovinos. Este fato comprova as afirmações de Döbereiner *et al.* (1967) e Tokarnia *et al.* (1969). Estes autores, embora não tivessem comprovação sobre a real etiologia destes tumores em bovinos, sempre relacionaram esses tumores à ingestão de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*. No presente estudo foi possível verificar que quantidades totais, a partir de 424,6 e 393,6 kg de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum*, divididas em doses diárias de 2,5 e 5,0 g/kg de peso vivo, respectivamente, produziram CCEs no TAS a partir de 770 e 868 dias após início da ingestão da planta. Esses resultados comprovam a suspeita de Tokarnia *et al.* (2012), que para a indução da hematúria enzoótica seria necessário a ingestão de quantidades menores que 10 g/kg de peso vivo por um ano ou mais, e doses ainda menores, por longo período produzem CCEs no TAS.

No presente estudo, também ficou comprovado que a ingestão de doses de 5 g/kg de peso vivo, induzem, de forma mais rápida, a formação de CCEs no TAS, enquanto doses diárias de 2,5 g/kg de peso vivo, embora, também tenham produzido o tumor, foi necessário um período mais longo para início de manifestações clínicas. Esses resultados devem ser considerados quando comparados a doença natural. Em nossos registros de necropsias de bovinos com CCEs no TAS, a idade dos bovinos acometidos variou, com raras exceções, entre 5 e 7 anos, idade essa semelhante as citadas por Tokarnia *et al.* (1969 e 2012), Jarrett *et al.* (1978a) e Gava *et al.* (2002).

Esponaneamente, o CCEs no TAS é observado tanto em fêmeas como em machos, porém, o número de fêmeas com este tumor é muito maior do que em machos. Isto está relacionado ao fato de que em geral, os machos, permanecem na propriedade por um tempo menor do que as fêmeas. Neste estudo foi possível verificar que tanto os machos como as fêmeas podem serem acometidos pelo CCEs no TAS. A diferença entre os sexos foi verificada quanto a gravidade do quadro clínico. Experimentalmente, nas duas fêmeas utilizadas, ao final da gestação e nos primeiros dias após o parto houve agravamento do quadro clínico. Este fato sugere que em situações de estresse a neoplasia prolifera mais rapidamente, o que pode contribuir para o entendimento do quadro clínico variável observado na doença natural.

Na literatura, embora raramente, o CCEs do TAS de bovinos pode estar associado a lesões de hematúria enzoótica (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969; JARRETT *et al.*, 1978a). No presente estudo, três bovinos que receberam dose de 2,5 e 5,0 g/kg, ao exame histológico, foi possível observar hiperplasia do epitélio da bexiga. Este fato demonstra que, espontaneamente, pode sim ocorrer casos de CCEs do TAS associados a lesões de hematúria enzoótica.

A distribuição e o tamanho das lesões macroscópicas observadas em CCE no TAS de bovinos produzidas experimentalmente com *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* foram variáveis. No presente estudo, a localização dos CCEs no TAS foi verificada na língua (Bovinos 2, 3 e 5), no esôfago (Bovinos 1, 2, 3,4 e 6) e no rúmen (bovinos 3 e 5). Localização e tamanho variável também são citados na doença natural (JARRETT *et al.*, 1978a, 1978b; GAVA *et al.*, 2002; SOUTO *et al.*, 2006).

De acordo com Jarrett *et al.* (1978a) e Head *et al.* (2002), 20 a 40% dos os CCEs em TAS metastatizam. No presente estudo *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* produziu metástase em linfonodo faríngeo (Bovino nº 2), o que representa 16,66%.

No Estado de Santa Catarina observa-se uma prevalência maior de casos de HEB na região Oeste e Alto Vale do Itajaí enquanto os CCEs no TAS são menos frequentes, ao contrário do que é observado na região Serrana, onde a ocorrência de HEB é rara e os CCEs no TAS são mais frequentes (GAVA, 2022 comunicação pessoal). A ocorrência maior de carcinomas na região Serrana, poderia ser atribuída ao fato de que, nesta Região há predominância de bovinos de corte, enquanto nas demais Regiões predomina a criação de bovinos de raças leiteiras, as quais, por necessidade consomem maior quantidade da planta em um menor período. Este fato foi observado experimentalmente com o Bovino nº 1, que recebeu dose de 5 g/kg de peso vivo, por um período de 770 dias que além do CCE em TA, teve também alterações mais significativas na bexiga.

## 5.6 CONCLUSÃO

A ingestão de *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* por bovinos em doses entre 2,5 e 5 g/Kg de peso vivo por mais de 25 meses é responsável por produzir carcinomas de células escamosas em trato alimentar superior de bovinos e, em doses de 5g/kg, além de produzir CCEs em TAS, pode produzir concomitantemente lesões na mucosa vesical, que podem induzir a hematúria enzoótica.

## 5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, B. L.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R.; GOMES, A. D.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, n. 10, p. 501-507, 2008. DOI: [https://doi.org/ 10.1590/S0100-736X2008001000010](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001000010).

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

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 2, p. 489-504, 1967.

EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R.; HUGHES, L. E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part I. **British Veterinary Journal**, Califórnia, v. 110, n. 8, p. 295-306, 1954a. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)44954-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)44954-2).

EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R.; HUGHES, L. E. Studies on bracken poisoning in cattle – Part III. Field Outbreaks of Bovine Bracken Poisoning. **British Veterinary Journal**, Califórnia, v. 110, n. 10, p. 4426-4442, 1954c. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)50123-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)50123-2).

EVANS, W. C.; EVANS, I. A., AXFORD, R. F. E., THRELFALL, G.; HUMPHREYS, D. A.; THOMAS, A. J. Studies on bracken poisoning in cattle – part VII. The toxicity of bracken rhizomes. **Veterinary Record**, Califórnia, v. 73, n. 35, p. 852-853, 1961.

EVANS, I. A. Bracken carcinogenicity. In: JAMES, G.V. Reviews on Environmental Health. **Reviews on Environmental Health**, Arizona, v. 7, n. 3, p. 161-199, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1515/REVEH.1987.7.3-4.161>.

GAVA, A.; DA SILVA NEVES, D.; GAVA, D.; DE MOURA, S. T.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*) Poisoning in Cattle in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, Dublin, Ohio, v. 44, n. 6, p. 362-365, 2002.

GAVA, A. 2022. Dados não publicados. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias. UDESC, Lages, SC.

HEAD, K. W.; ELSE, R. W.; DUBIELZIG, R. R. Tumours of the alimentary tract. In: Meuten D. J. **Tumours of Domestic Animals**. Iowa State University Press: Ames, 2002, p.444-448.

HIRONO, I.; AISO, S.; YAMAJI, T.; MORI, H.; YAMADA, K.; NIMA, H.; OJIKA, M.; WAKAMATSU, K.; KIGOSHI, H.; NIIYAMA, K.; UOSAKI, Y. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. **GANN Japanese Journal of Cancer**

**Research**, Tokyo, v. 75, n. 10, p. 833-836, 1984. DOI: [https://doi.org/10.20772/cancersci1959.75.10\\_833](https://doi.org/10.20772/cancersci1959.75.10_833).

JARRET, W. F. H.; McNEIL, P. E.; GRIMSHAW, W. R. T.; SELMAN, I. E.; McLNTYRE, I. M. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. **Nature**, Inglaterra, v. 274, p. 215-217, 1978a. DOI: 10.1038/274215a0.

JARRETT, W. F. H. Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma in cattle. **Bull Cancer**, Califórnia, v. 65, n. 2, p.191-194, 1978b.

JÖNCK, F. **A intoxicação de bovinos por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em Santa Catarina e a identificação das bactérias envolvidas nos infartos do quadro agudo**. 2015. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

PAMUKCU, A. M.; GOKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary Bladder Neoplasms Induced by Feeding Bracken Fern (*Pteris aquilina*) to Cows. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 27, p. 917-924, 1967.

PAMUKU, A. M.; YALCINER, S.; BRYAN, G. T. Inhibition of carcinogenic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) by various chemical. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 40, p. 2450-2454, 1977. DOI: 10.1002/1097-0142(197711)40:5+<2450::aid-cncr2820400910>3.0.co;2-w.

PARKER, W. H.; McCREA, C. T. Bracken (*Pteris aquilina*) poisoning of sheep in the North York moors. **Veterinary Record**, Califórnia, v. 77, n. 30, p. 861-866, 1965.

SIPPEL, L. Bracken fern poisoning. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 121, p. 9-13, 1952.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; PIAZER, J. V. M.; RECH, R. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 26, n. 2, p. 112-122, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200009>.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. II Estudos Complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 4, p. 209-224, 1969. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab1969.v4.17847>.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. B.; PEIXOTO, P. V.; DOBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012, p. 349-364.

## 6 CARCINOGENICIDADE DE *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* X PAPILOMAVÍRUS

### 6.1 RESUMO

Os papilomavírus são vírus epiteliotrópicos, que contêm DNA, capazes de infectar epitélio cutâneo e/ou mucosas de várias espécies animais. Geralmente, os papilomavírus causam tumores benignos que regredem espontaneamente, sem provocar nenhum problema clínico ao hospedeiro, mas podem persistir evoluindo para neoplasias malignas quando há presença de cofatores carcinogênicos ambientais. Dentre estes cofatores o mais estudado é o ptaquilosídeo presente em *Pteridium* spp. Esta planta é conhecida por possuir atividade radiomimética, mutagênica e carcinogênica. O sinergismo entre o vírus e a ação imunossupressora e carcinogênica da planta vem sendo estudada em animais e humanos há muitos anos. Com o intuito de esclarecer se há participação de papilomavírus na etiologia dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) de bovinos foi utilizado PCR e sequenciamento de alto desempenho em amostras de neoplasias de TAS de bovinos que ingeriram *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*. Foram analisadas nove amostras de neoplasias coletadas em necropsia de bovinos com a doença natural e cinco amostras de bovinos submetidos a experimentação com *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* que desenvolveram a doença. Tanto na PCR como no sequenciamento de alto desempenho os resultados foram negativos para DNA de BPV. Assim podemos descartar a infecção por BPV no desenvolvimento de CCEs de TAS de bovinos e afirmar que *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*, com seus carcinógenos desenvolvem CCEs no TAS de bovinos.

Palavras-chave: Papilomavírus, samambaia, PCR, Sequenciamento de alto desempenho.

### 6.2 INTRODUÇÃO

*Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* é uma planta invasora, conhecida popularmente como samambaia, com distribuição cosmopolita. Esta planta possui efeito carcinogênico, causado por um glicosídeo norsesquiterpeno, denominado ptaquilosídeo,

que é seu princípio tóxico com alto potencial radiomimético para animais e para seres humanos (HIRONO *et al.*, 1984). Todas as partes da planta são tóxicas, no entanto, o rizoma é a parte mais tóxica. Em relação às partes aéreas, a toxicidade é maior no broto e decresce progressivamente com a maturação da planta (EVANS *et al.*, 1961; HIRONO *et al.*, 1973). Em bovinos a ação de *Pteridium* spp. varia em função da quantidade ingerida diariamente e do tempo de ingestão, podendo provocar três diferentes quadros clínico-patológico de intoxicação: a diátese hemorrágica (TOKARNIA *et al.*, 1967; JÖNCK, 2015), Hematúria enzoótica e carcinoma de células escamosas (CCEs) do trato alimentar superior (TAS) (DÖBEREINER *et al.*, 1967; TOKARNIA *et al.*, 1969).

O CCEs do TAS é uma doença crônica, progressiva e irreversível em bovinos, observada em diversas regiões do mundo. A doença tem sido diagnosticada em bovinos que pastejam em regiões com alta infestação de *Pteridium* spp., associando-se assim o aparecimento de CCEs pela ingestão de pequenas quantidades da planta, por longos períodos. Essa planta contém ptaquilosídeos com ação mutagênica, cancerígena e imunossupressora (EVANS *et al.*, 1982; HIRONO *et al.*, 1984; CAMPO, 1997), que sob condições alcalinas, é convertido em dienona, a qual se liga a nucleotídeos, causando a divisão do DNA (KUSHIDA *et al.*, 1994). No entanto, alguns autores relacionam que os CCEs do TAS dos bovinos estão epidemiologicamente associados a infecções por papilomavírus bovino tipo 4 (BPV-4), que progride para malignidade pela interação com os carcinógenos de *Pteridium* spp. (CAMPO *et al.*, 1985; JARRETT *et al.*, 1978a, b).

Os papilomavírus (PVs) são vírus epiteliotrópicos, não envelopados, que contêm DNA circular de fita dupla (ZHENG, BAKER, 2006). A infecção por BPV em bovinos causa papilomas mucocutâneos que se desenvolvem em vários locais do corpo, incluindo o TAS (cavidade oral, esôfago e rúmen). Os papilomas induzidos por vírus geralmente se resolvem espontaneamente e, portanto, são considerados hiperplásicos em vez de neoplásicos (MUNDAY, 2014). Jarrett *et al.* (1978c), observaram que papilomas frequentemente estavam presentes em bovinos com CCEs em TAS e, que os papilomas e CCEs tinham uma distribuição semelhante. A partir disso vários autores passaram a estudar a coparticipação do papilomavírus bovino na patogênese desta neoplasia.

Alguns autores sugerem que o PVs do TAS de bovinos seja o ponto de partida para o desenvolvimento de CCEs em bovinos que se alimentam de *Pteridium* spp., uma

vez que a planta causa efeito de imunossupressão limitando a resposta imunológica do animal, sendo assim um fator crucial na disseminação e persistência dos BPV (JARRETT *et al.*, 1978a, b; EVANS *et al.*, 1982; FENWICK, 1988; CAMPO *et al.*, 1980, 1994). Smith e Campo (1988), propõem que o BPV-4 esteja envolvido em uma das etapas iniciais da transformação celular, executando um ou mais eventos precoces, e que outros fatores contribuem para o estabelecimento e manutenção do fenótipo maligno. Campo *et al.* (1985), não detectaram DNA do BPV-4, por hibridização *in situ*, em neoplasias do TAS de bovinos, no entanto afirmam que, mesmo necessários para a indução de papilomas, a presença e a expressão do genoma viral não são necessárias para a progressão ou manutenção do estado maligno. Por outro lado, Faccin *et al.* (2018), não detectaram DNA de BPV em papilomas do TAS de bovinos, por PCR e descartam a infecção por BPV como coparticipante no desenvolvimento de CCEs em bovinos. Estes dados corroborando com as observações de Souto *et al.* (2006), que observaram o desenvolvimento do CCE independente da presença de papiloma no local, sugerindo assim que em epitélio normal que sofre ação dos carcinógenos químicos da samambaia pode desenvolver a neoplasia.

O objetivo deste trabalho é avaliar a presença de DNA de BPV em CCEs de TAS de bovinos, em casos de doença natural e experimental através de PCR e amplificação por círculo rolante de sequenciamento de alto desempenho.

### 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Carcinomas de células escamosas de 14 bovinos foram coletadas em diferentes localizações no trato alimentar superior (base da língua, faringe, glote, esôfago e rúmen) de bovinos. Nove amostras foram obtidas através de necropsias de bovinos que manifestaram a doença natural e pastejavam em áreas com alta infestação de *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum*. Cinco amostras foram provenientes de bovinos (três machos e duas fêmeas) com idade inicial entre 12 e 15 meses, submetidos a experimentação com *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* com doses entre 2,5 e 5,0 gramas por quilogramas de peso vivo.

Em todos os casos foram coletadas áreas periféricas das neoplasias mantidas congeladas a temperatura de -80°C e posteriormente submetidas a extração de DNA viral para PCR e sequenciamento de alto desempenho. Outra parte periférica das

neoplasias foram fixadas em formalina tamponada 10%, processadas rotineiramente para análise histopatológica.

### 6.3.1 Extração de DNA, PCR e Sequenciamento de Alto Desempenho

As amostras foram maceradas e diluídas 20% (w/v) em PBS pH 7,2, centrifugadas a 1.800 x g durante trinta minutos, filtradas em filtro com membrana 0,45 µL e armazenadas a -80 °C. O DNA total foi extraído de 100 µm de amostra utilizando um protocolo de fenol clorofórmio (SAMBROOK, RUSSEL, 2001). A qualidade do material extraído foi aferida utilizando NanoDrop™ 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific). O DNA extraído foi enriquecido randomicamente utilizando a técnica de círculo rolante (RCA) (DAUDT *et al.*, 2016) com um kit comercial (TempliPhi™100Amplification Kit, GE Healthcare) para amplificar o número de genomas circulares na amostra. Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,5% e visualizados em luz UV.

As amostras foram purificadas utilizando o MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Life Technologies) e quantificadas utilizando o fluorômetro para DNA fita dupla Qubit® 2.0 (Life Technologies), e sua qualidade e pureza avaliadas com NanoDrop™ 3300 Fluorospectrometer.

As amostras de DNA viral total foram submetidas a sequenciamento de alto desempenho (HTS) na plataforma Illumina MiSeq®. As bibliotecas foram geradas com a aplicação do kit Nextera XT (Illumina) e sequenciadas utilizando o MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Para tanto, foi utilizado o cartucho de sequenciamento de 2 x 150 ciclos paired-end (MiSeq v2 Reagent Kit 300 Cycles PE). Para remoção dos index e adaptadores dos fragmentos, foi usado um filtro de controle de qualidade MiSeq Control Software.

As sequências de nucleotídeos foram analisadas e os *contigs* montados em sequências finais para demais análises com o programa SPADES em sua última versão (Bankevich *et al.*, 2012). Para análise das possíveis identidades (caracterização taxonômica preliminar) das sequências encontradas, foi utilizada a ferramenta BlastX disponível no programa BLAST2GO (GÖTZ *et al.*, 2008). As regiões abertas de leitura (*open reading frame*, ORF) foram analisadas e anotadas com o programa Geneious em sua última versão (KEARSE *et al.*, 2012).



### 6.3.2 Declaração de ética

A reprodução experimental da doença foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/CAV-UDESC), e registrada sob o número 6544210716. As amostras coletadas de bovinos com a doença natural foram provenientes da rotina diagnóstica do Laboratório de Patologia Veterinária, do Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages/SC.

## 6.4 RESULTADOS

As amostras oriundas da doença natural foram coletadas de vacas com idade entre 5 e 10 anos, sendo, duas da raça Hereford e sete sem raça definida. As amostras da reprodução experimental foram provenientes de machos e fêmeas (Aberdeen Angus/ 2, Jersey/ 1 e mestiços 2), com idade média de 14 meses, que receberam *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* nas doses de 2,5 e 5,0 g/Kg/dia, por um período entre 770 - 1239 dias.

A localização anatômica e a característica dos CCEs, nos bovinos com doença natural e experimental foram semelhantes e observados em base de língua, glote, esôfago e rúmen. Os processos neoplásicos apresentavam-se sob forma de massas amareladas, infiltrativas, na maioria das vezes com superfície ulcerada. Ao longo do TAS, desde o palato mole até a entrada do rúmen, os 14 bovinos apresentaram alguns ou múltiplos papilomas, de tamanhos variando de poucos milímetros até 1 cm de diâmetro, pedunculados ou sésseis, com superfície irregular (semelhante a couve-flor) e com cobertura queratinizada. Metástases em linfonodos retrofaríngeos foram observadas em um animal com intoxicação natural e um experimental.

### 6.4.1 PCR e sequenciamento de alto desempenho

O resultado dos testes para detecção de papilomavírus bovino nos pools de amostras de neoplasias do trato alimentar superior (base de língua, faringe, laringe, esôfago e rúmen) de 14 bovinos com a doença natural e experimental foram negativos, uma vez que não foram obtidas leituras caracterizadas ou relacionadas a membros da família *Papillomaviridae* após o sequenciamento de alto desempenho.

## 6.5 DISCUSSÃO

O sequenciamento de alto desempenho, consiste em uma técnica sensível na detecção de DNA de BPV. Com a não detecção do DNA viral nas 14 amostras avaliadas, pode-se afirmar que o BPV não está presentes nos CCEs nas amostras TAS de bovinos que ingerem *Pteridium esculentum* subsp. *arachnoideum* analisadas no presente experimento.

A ausência da detecção de DNA de BPV por PCR, em papilomas associados a neoplasias sugerem que papilomas de TAS de bovinos podem não estão associados ao desenvolvimento de CCEs.

A papilomatose em TAS de bovinos é um achado comum associado a CCEs em bovinos que pastam por longos períodos em locais com alta invasão de *P. esculentum* subsp. *arachnoideum* (DÖBEREINER *et al.*, 1967; CAMPO *et al.*, 1980; JARRETT, 1980). Alguns autores sugerem que a ação mutagênica, carcinogênica e imunossupressora crônica e persistente induzida pelo glicosídeo norsesquiterpeno, ptaquilosídeo (EVANS *et al.*, 1982; HIRONO *et al.*, 1984; CAMPO, 1997), limitam a resposta imunológica do animal, assim permitindo a formação e manutenção dos BPV (JARRETT *et al.*, 1978b; EVANS *et al.*, 1982; FENWICK, 1988; CAMPO *et al.*, 1980, 1994). Desta forma, os CCEs seriam induzidos quimicamente por carcinógenos de *Pteridium* spp. e o BPV seria oportunista, multiplicando-se pela baixa resposta imune do animal.

A patogênese da intoxicação crônica por *Pteridium* spp. está relacionada com a localização dos CCEs uma vez que a saliva no TAS e a urina na bexiga têm pH alcalino em condições normais. O ptaquilosídeo sob condições alcalinas sofre ativação transformando-se em um composto carcinogênico-mutágeno, a diedona, que causa alterações celulares locais (FENWICK, 1988; YAMADA *et al.*, 2007).

## 6.6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através de experimentação e o resultado negativo para papilomavírus bovino nas 14 amostras avaliadas sugerem que *P. esculentum* subsp.

*arachnoideum* pode ser considerado como causa de carcinomas de células escamosas em trato alimentar superior de bovinos sem a participação dos papilomavírus bovino.

## 6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, Providence, v. 19, n. 5, 2012. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; JARRETT, W. F. H.; LAIRD, H. M. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, Inglaterra, v. 286, p. 180-182, 1980. DOI: 10.1038/286180a0.
- CAMPO, M. S.; MOAR, M. H.; SARTIRANA, M. L.; KENNEDY, I. M.; JARRETT, W. F. H. The presence of bovine papillomavirus type 4 DNA is not required for the progression to, or the maintenance of, the malignant state in cancers of the alimentary canal in cattle. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 4, n. 7, p. 1819-1825, 1985. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb03856.x.
- CAMPO, M. S.; O'NEIL, W. B.; BARRON, J. R.; JARRETT, W. F. H. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 15, n. 8, p. 1597-1601, 1994. DOI: 10.1093/carcin/15.8.1597.
- CAMPO, M. S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, Califórnia, v. 154, p. 175-188, 1997. DOI: 10.1016/s1090-0233(97)80019-6.
- DAUDT, C.; DA SILVA, F. R. C.; STRECK, A. F.; WEBER, M. N.; MAYER, F. Q.; CIBULSKI, S. P.; CANAL, C. W. How many papillomavirus species can go undetected in papillomalesions? **Scientific Reports**, Califórnia, v. 6, p. 1-7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep36480>.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 2, p. 489-504, 1967.
- EVANS, W. C.; EVANS, I. A.; AXFORD, R. F. E.; THRELFALL, G.; HUMPHREYS, D. A.; THOMAS, A. J. Studies on bracken poisoning in cattle – part VII. The toxicity of bracken rhizomes. **Veterinary Record**, Califórnia, v. 73, n. 35, p. 852-853, 1961.
- EVANS, W. C.; PATEL, M. C.; KOOHY, Y. Acute bracken poisoning in monogastric and ruminant animals. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, Cambridge, v. 81, p. 29-64, 1982.

FACCIN, T. C.; CARGNELUTTI, J. F.; RODRIGUES, F. S.; MENEZES, F. R.; PIAZER, J. V. M.; MELO, S. M. P.; LAUTERT, B. F.; FLORES, E. F.; KOMMERS, G. D. Bovine upper alimentary squamous cell carcinoma associated with bracken fern poisoning: Clinical-pathological aspects and etiopathogenesis of 100 cases. **Plos One**, São Francisco, v. 13, n. 9, p. 1-13, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0204656.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) – Toxic effects and to constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Nova Jersey, v. 46, p. 147-173, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740460204>.

GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALÓN, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 2008. DOI: 10.1093/nar/gkn176.

HIRONO, I.; FUSHIMI, K.; MORI, H.; MIWA, T.; HAGA, M. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1367-1371, 1973. DOI: 10.1093/jnci/50.5.1367.

HIRONO, I.; AISO, S.; YAMAJI, T.; MORI, H.; YAMADA, K.; NIMA, H.; OJIKI, M.; WAKAMATSU, K.; KIGOSHI, H.; NIYAMA, K.; UOSAKI, Y. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. **GANN Japanese Journal of Cancer Research**, Tokyo, v. 75, n. 10, p. 833-836, 1984. DOI: [https://doi.org/10.20772/cancersci1959.75.10\\_833](https://doi.org/10.20772/cancersci1959.75.10_833).

JARRET, W. F. H.; McNEIL, P. E.; GRIMSHAW, W. R. T.; SELMAN, I. E.; McLNTYRE, I. M. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. **Nature**, Inglaterra, v. 274, p. 215-217, 1978a. DOI: 10.1038/274215a0.

JARRETT, W. F. H. Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma in cattle. **Bull Cancer**, Califórnia, v. 65, n. 2, p.191-194, 1978b.

JARRETT, W. F.; MURPHY, J.; O'NEIL, B. W.; LAIRD, H. M. Virus-induced papillomas of the alimentary tract of cattle. **International Journal of Cancer**, Heidelberg, v. 22, n. 3, p. 323-328, 1978c. DOI: 10.1002/ijc.2910220316.

JARRETT, W. F. Bracken fern and papilloma virus in bovine alimentary cancer. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 36, p. 79-81, 1980. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071618.

JÖNCK, F. **A intoxicação de bovinos por *Pteridium (aquilinum) arachnoideum* em Santa Catarina e a identificação das bactérias envolvidas nos infartos do quadro agudo**. 2015. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an

integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics Applications Note**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.

KUSHIDA, T.; UESUGI, M.; SUGIURA, Y.; KIGOSHI, H.; TANAKA, H.; HIROKAWA, J.; OJIKAWA, M.; YAMADA, K. DNA damage by ptaquiloside, a potent bracken carcinogen: detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage products. **Journal of the American Chemical Society**, Nova York, v. 116, n. 2, p. 479-486, 1994. DOI:10.1021/ja00081a007.

MUNDAY, J. S. Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. **Veterinary Pathology**, Califórnia, v. 51, n. 6, p.1063-1075, 2014. Doi:10.1177/0300985814537837.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor: New York, 2001.

SMITH, K. T.; CAMPO, M. S. “Hit and run” transformation of mouse C127 cells by bovine papillomavirus type 4: the viral DNA is required for the initiation but not for maintenance of the transformed phenotype. **Virology**, Califórnia, v. 164, p. 39–47, 1988. DOI: 10.1016/0042-6822(88)90617-4.

SOUTO, M. A. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; PIAZER, J. V. M.; RECH, R. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 26, n. 2, p. 112-122, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200009>.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da intoxicação aguda pela “samambaia” (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 2, p. 329-336, 1967. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab1967.v2.17929>.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência da hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestório superior em bovinos no Brasil. II Estudos Complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Seropédica, v. 4, p. 209-224, 1969. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab1969.v4.17847>.

YAMADA, K.; OJIKAWA, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpenoid glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Products Report**, Londres, v. 24, n. 4, p. 798-813, 2007. DOI: 10.1039/b614160a.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, Lausanne, v. 11, p. 2286-2302, 2006. Doi: 10.2741/1971.