

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PATOGÊNESE DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ALIMENTARES ASSOCIADOS AO
CONSUMO DE *Pteridium aquilinum* EM BOVINOS**

TESE DE DOUTORADO

Eduardo Kenji Masuda

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**PATOGÊNESE DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ALIMENTARES ASSOCIADOS AO CONSUMO
DE *PTERIDIUM AQUILINUM* EM BOVINOS**

por

Eduardo Kenji Masuda

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Glaucia Denise Kommers

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

M424p Masuda, Eduardo Kenji
Patogênese dos carcinomas de células escamosas alimentares associados
ao consumo *Pteridium aquilinum* em bovinos / por Eduardo Kenji Masuda
. – 2010.
104 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Glaucia Denise Kommers
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2010

1. Medicina veterinária 2. *Pteridium aquilinum* 3. Carcinoma de células
escamosas 5. Bovinos 6. Neoplasia 7. Patogênese I. Kommers, Glaucia Denise
II. Título.

CDU 619

Ficha catalográfica elaborada por Denise Barbosa dos Santos – CRB 10/1756
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**PATOGÊNESE DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ALIMENTARES ASSOCIADOS AO CONSUMO DE *Pteridium aquilinum*
EM BOVINOS**

elaborada por
Eduardo Kenji Masuda

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Glaucia Denise Kommers, PhD
(Presidente/ Orientadora)

Claudio Severo Lombardo de Barros, PhD (UFSM)

Luiz Francisco Irigoyen Conrado, PhD (UFSM)

Ana Lucia Schild, Dra (UFPel)

Eliza Simone Viégas Sallis, Dra (UFPel)

Santa Maria, 17 de dezembro de 2010.

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PATOGÊNESE DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ALIMENTARES ASSOCIADOS AO CONSUMO DE *Pteridium aquilinum* EM BOVINOS

AUTOR: EDUARDO KENJI MASUDA
ORIENTADORA: GLAUCIA DENISE KOMMERS
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 17 de dezembro de 2010.

Segundo a teoria da patogênese da síndrome papiloma-carcinoma, a formação do papiloma é o ponto crucial para o desenvolvimento dos carcinomas de células escamosas (CCEs) no trato alimentar superior (TAS) de bovinos. A partir da sua manutenção por longos períodos no TAS, devido aos imunossuppressores presentes na samambaia (*Pteridium aquilinum*), os ceratinócitos do papiloma em constante multiplicação se tornariam alvos para os carcinógenos da planta promoverem a transformação carcinomatosa. Muitas evidências da síndrome papiloma-carcinoma foram observadas *in vitro*. No entanto, elas ainda não foram totalmente comprovadas *in vivo*. Os objetivos deste estudo foram, portanto, avaliar aspectos fundamentais da patogênese da formação dos CCEs no TAS em bovinos que pastoreiam naturalmente por longos períodos áreas altamente infestadas por *Pteridium aquilinum*. Para isso, 168 lesões epiteliais iniciais foram avaliadas no TAS de 60 bovinos com CCEs alimentares provenientes de áreas com samambaia. Papilomas desenvolvidos perfizeram mais de 50% dos papilomas estudados, com alguns em crescimento (18,5%), em transformação carcinomatosa (18,5%) e poucos em regressão (9%). A transformação carcinomatosa de papilomas pode representar a evidência morfológica da necessidade do papiloma para a formação de CCEs. No entanto, 72 lesões intra-epiteliais escamosas (SILs) também estavam presentes no TAS desses bovinos. A maior parte das SILs (70%) representava lesões displásicas moderadas, acentuadas e CCEs *in situ*, com quantidade significativa de CCEs em estágio inicial. Em humanos, lesões semelhantes estão presentes em pacientes que abusam cronicamente do álcool/tabaco. As SILs no trato aerodigestivo de humanos são potencialmente malignas e podem evoluir para CCEs. As SILs nos bovinos do presente estudo podem, portanto, representar uma via alternativa de formação de CCEs no TAS, sem a necessidade da transformação do papiloma em carcinoma. A necessidade do papiloma para a formação de CCEs alimentares em bovinos também foi avaliada através da imuno-histoquímica. Trinta CCEs da região cranial do TAS (incluindo base da lingual, faringe/orofaringe e epiglote) foram avaliados quanto à origem acinar ou ductal salivar utilizando-se o anticorpo anti-citoceratinas 7/8 para epitélio simples. Dos 30 CCEs analisados, nove tinham evidências morfológicas de transformação neoplásica proveniente de ducto salivar. Destes, um foi confirmado pela imuno-histoquímica. Como o papilomavírus necessita de estratificação epitelial para a formação do papiloma, a confirmação de CCE de origem ductal salivar simples sugere que também não haja a necessidade do papiloma para o desenvolvimento de CCEs no TAS de bovinos que pastoreiam em samambaia. Paralelamente, o grau de imunossupressão por linfopenia, supostamente necessária para a manutenção dos papilomas, também foi avaliada nos casos espontâneos de CCE no TAS de bovinos de áreas com samambaia. Papilomatose alimentar foi observada em todos os 40 casos estudados. No entanto, imunossupressão por linfopenia foi incomum (três casos) e não estava relacionada com o grau de papilomatose. A ausência de linfopenia em bovinos com papilomatose alimentar indica que os mecanismos para a manutenção dos papilomas não estejam relacionados com a quantidade de linfócitos circulantes. Em conclusão, o presente estudo demonstrou haver uma via alternativa para a patogênese dos CCEs do TAS de bovinos intoxicados cronicamente por samambaia e que a papilomatose alimentar, vista nesses casos, não está associada com linfopenia.

Palavras-chave: *Pteridium aquilinum*, carcinoma de células escamosas, neoplasia, patogênese, bovinos

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PATHOGENESIS OF ALIMENTARY SQUAMOUS CELL CARCINOMAS ASSOCIATED WITH *Pteridium aquilinum* INTAKE IN CATTLE

AUTHOR: EDUARDO KENJI MASUDA
ADVISER: GLAUCIA DENISE KOMMERS
Santa Maria, December 17th, 2010.

It is believed that papilloma formation is critical to pathogenesis of the upper digestive tract (UDT) squamous cell carcinomas (SCCs) in cattle, the so called papilloma-carcinoma syndrome. Due to the maintenance of papillomas for long periods of time in the UDT, due to immunosuppressive agents in bracken fern (*Pteridium aquilinum*), the keratinocytes of papilloma become target for carcinogens to promote carcinomatous transformation. Many evidences of the papilloma-carcinoma syndrome were observed *in vitro*. However, they have not been totally proved *in vivo*. The objectives of this study were therefore to assess key aspects of the pathogenesis of SCCs of the UDT in cattle naturally grazing in *Pteridium aquilinum* for long periods of time. For this, 168 initial epithelial lesions of the UDT were evaluated in 60 cattle with alimentary SCCs from areas with bracken fern. Developed papillomas had yielded more than 50% of the studied papillomas, with some in the growing phase (18.5%) and some carcinomatous transformation of papillomas (18.5%). A few papillomas were in regression (9%). The carcinomatous transformation of papillomas may represent morphological evidence of the need for papilloma formation in the development of alimentary SCCs. However, 72 squamous intraepithelial lesions (SILs) were also present in these bovines. Most SILs (70%) were moderate to severe dysplastic lesions and carcinomas *in situ*, with a significant amount of SCCs in an early stage of development. In humans, similar lesions are found in patients who chronically abuse of alcohol/tobacco. The SILs in the aerodigestive tract of humans are potentially malignant and can evolve to SCCs. The SILs of cattle in this study may therefore represent an alternative pathway for the development of SCCs in the UDT, without the necessity of carcinomatous transformation of papilloma to SCCs. The papillomatous origin of alimentary SCCs was also assessed by immunohistochemistry. Thirty SCCs of the cranial region of the UDT (including the base of tongue, pharynx/oropharynx and epiglottis) were evaluated about the acinar or ductal salivary origin using an anti-cytokeratin 7/8 antibody specific for simple epithelium. From the 30 SCCs examined, nine had morphological evidences of neoplastic transformation from a salivary duct. One of them was confirmed by immunohistochemistry to be of salivary origin. As papillomavirus requires a stratified epithelium for the formation of the papilloma, a confirmative SCCs from a simple salivary duct suggests that there is also no need of a papilloma to the development of SCCs of the UDT in cattle chronically grazing on bracken fern. In parallel, the degree of immunosuppression by lymphopenia, supposedly necessary for the maintenance of papillomas in the UDT, was evaluated in spontaneous cases of SCCs in the UDT of cattle. Alimentary papillomatosis was observed in all 40 cases studied. However, immunosuppression by lymphopenia was uncommon (three cases) and was not related to the degree of papillomatosis. The absence of lymphopenia in cattle with alimentary papillomatosis indicates that the mechanisms for maintenance of papilloma are not related to the amount of circulating lymphocytes. In conclusion, this study demonstrated an alternative route for the pathogenesis of SCCs in the UDT of cattle chronically poisoned by bracken fern and that the alimentary papillomatosis, observed in such cases, is not associated with lymphopenia.

Key Words: *Pteridium aquilinum*, squamous cell carcinoma, neoplasia, pathogenesis, cattle.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

- Figura 1 – Diferenciação do epitélio escamoso cutâneo normal e as atividades do papilomavírus na produção de lesões benignas em humanos. Em epitélios não-ceratinizados (laríngeo ou esofágico), as ceratinas 4 e 13 são expressas no lugar das ceratinas 1 e 10 nas células diferenciadas. As atividades virais em seus estratos correspondentes, durante a infecção produtiva, demonstradas na coluna direita, foram determinadas de estudos de hibridização *in situ*. Fonte: baseado nos esquemas de HOWLEY & LOWRY (2006) e MOODY & LAIMINS (2010)..... 16
- Figura 2 – Diagrama esquemático representando os múltiplos passos da progressão neoplásica dos papilomas do trato alimentar superior. Fonte: traduzido de CAMPO (2002).....21
- Figura 3 – Representação esquemática das diversas lesões intra-epiteliais escamosas quanto à atipia celular e ao distúrbio arquitetural. A hiperplasia escamosa e a displasia leve são alterações benignas com grande chance de regressão. Displasia moderada e acentuada representam alterações epiteliais potencialmente malignas que, juntamente com o carcinoma *in situ*, podem progredir para carcinoma invasivo. Ilustração e texto baseados em HOWLEY & LOWRY (2006) e GALE *et al.* (2005)..... 25

LISTA DE TABELAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Tabela 1 – Estudos experimentais com <i>P. aquilinum</i> em diferentes espécies animais relacionados com o órgão afetado e o tipo de neoplasma desenvolvido.	12
Tabela 2 – Localização dos papilomas/fibropapilomas de bovinos, de acordo com o genótipo viral.	15
Tabela 3 – Critérios histopatológicos para cada fase de desenvolvimento do papiloma.	19
Tabela 4 – Classificação e critérios histopatológicos para lesões intra-epiteliais escamosas (SILs) de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO) para SILs de cabeça e pescoço em humanos.	24
Tabela 5 – Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO) para SILs de cabeça e pescoço em humanos.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Aspectos gerais da intoxicação por samambaia (<i>Pteridium aquilinum</i>)	9
2.2 Toxicidade da samambaia	10
2.2.1 Princípios tóxicos e carcinogênese química	10
2.3 Papilomavírus bovino	14
2.3.1 Características gerais e classificação viral.....	14
2.3.2 Estrutura molecular viral	15
2.3.3 Aspectos epidemiológicos, macroscópicos e histopatológicos dos papilomas	17
2.4 Sinergismo samambaia-BPV-4 para carcinogênese	19
2.5 Lesões displásicas intra-epiteliais escamosas induzidas por papilomavírus e por carcinógenos químicos	22
2.6 Referências	26
3. ARTIGO 1	40
4. ARTIGO 2	66
5. ARTIGO 3	87
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103

1. INTRODUÇÃO

Intoxicação por plantas é uma importante causa de mortes de bovinos e de perdas econômicas diretas e indiretas. Casos desse tipo compõem aproximadamente 10% dos diagnósticos realizados em bovinos no Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, e aproximadamente 14% dos diagnósticos na Universidade de Desenvolvimento Estadual de Santa Catarina (RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001). Em um recente estudo retrospectivo, aproximadamente 16% dos casos de morte de bovinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria foram atribuídos à ingestão de plantas tóxicas (RISSI et al., 2007).

A intoxicação crônica por samambaia (*Pteridium aquilinum*) é uma causa frequente de intoxicação de bovinos por plantas tóxicas no Rio Grande do Sul (RISSI et al., 2007). Estudos epidemiológicos e morfológicos da intoxicação crônica espontânea por samambaia foram importantes na provisão de subsídios para o estudo da patogênese da doença (SOUTO et al., 2006a; SOUTO et al., 2006b; GABRIEL et al., 2009; MASUDA et al., 2010). Tais estudos são necessários para a implementação de medidas de controle da doença, que é endêmica em algumas regiões do Brasil (TOKARNIA et al., 1969) e do mundo (CAMPO, 1997b).

A patogênese da formação de tumores no trato alimentar superior de bovinos intoxicados por samambaia ainda permanece com aspectos pouco elucidados. Dois fatores parecem agir sinergicamente na patogênese dos carcinomas de células escamosas (CCEs) do trato alimentar superior (TAS) de bovinos: o papilomavírus bovino tipo 4 (BPV-4) e os princípios tóxicos da samambaia (imunossupressores, carcinógenos e mutágenos). O papel do BPV-4 tem sido sugerido por alguns autores como o principal fator desencadeante da doença, mas seus efeitos transformadores foram observados somente *in vitro* (CAMPO, 1997b). Por outro lado, vários autores tem demonstrado que a doença (CCE no TAS) somente ocorre em bovinos que consomem samambaia por longos períodos de tempo (DÖBEREINER et al., 1967; JARRETT, 1978; JARRETT, 1980; SOUTO et al., 2006a). A samambaia tem sido implicada na manutenção dos papilomas no TAS e na transformação dos mesmos em CCEs (CAMPO et al., 1994b). Estudos celulares e moleculares têm demonstrado a interação entre carcinógenos da samambaia e genes virais, mas uma ligação causal concreta ainda não foi realmente estabelecida.

O DNA do BPV-4 tem sido identificado em uma ínfima proporção de CCEs de bovinos provenientes dessas áreas (CAMPO et al., 1980; CAMPO et al., 1985). Por outro lado, tumores cervicais uterinos em mulheres são quase que exclusivamente relacionados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (WALBOOMERS et al., 1999; BOHMER et al., 2003). Já no trato aerodigestivo de humanos, CCEs estão relacionados à carcinogênese química pelo consumo crônico de álcool e tabaco, com identificação pouco expressiva de DNA de HPV (HOBBS et al., 2006; TORRENTE & OJEDA, 2007).

Tanto nos CCEs de cabeça e pescoço de humanos (GALE et al., 2005), câncer cervical uterino de mulheres (WALBOOMERS et al., 1999) e em CCEs de bovinos (SOUTO, 2005), lesões intra-epiteliais displásicas estão presentes em conjunto com CCEs. Tais lesões precedem a formação dos CCEs nesses locais (GALE et al., 2005).

Os objetivos deste estudo foram analisar a progressão das lesões iniciais do epitélio alimentar de bovinos, como papilomas e alterações displásicas, na tentativa de esclarecer aspectos fundamentais da patogênese química e/ou viral da doença em bovinos. Buscou-se também a confirmação das evidências morfológicas de CCEs com possível origem em ductos salivares (MASUDA et al., 2010) o que corroboraria a possibilidade de carcinogênese química direta pela samambaia, sem a necessidade de formação do papiloma. Adicionalmente, investigou-se a ocorrência de linfopenia e sua possível relação com a papilomatose alimentar observada nos casos de intoxicação crônica por samambaia em bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da intoxicação por samambaia (*Pteridium aquilinum*)

A samambaia (*Pteridium aquilinum* [L.] Kuhn) é uma planta cosmopolita pertencente à família Polypodiaceae (TOKARNIA et al., 1979; TOKARNIA et al., 2000). Somente a variedade *arachnoideum* foi identificada no Brasil (TOKARNIA et al., 2000). Estudos taxonômicos recentes reclassificaram a variedade *arachnoideum* como espécie *P. arachnoideum* (ITIS, 2010; NCBI, 2010). No entanto, todas as nomenclaturas utilizadas até hoje são consideradas sinonímias (*P. aquilinum* var. *arachnoideum*, *P. aquilinum* var. *arachnoideum* [Kaulf.] Brade e *P. arachnoideum* [Kaulf.] Maxon) (NCBI, 2010).

No Brasil, a samambaia é encontrada principalmente nas regiões Sul e Sudeste por se desenvolver melhor em áreas de temperatura amena, com boa pluviosidade, solos ácidos, arenosos e bem drenados (DÖBEREINER et al., 1967; GAVA, 1993; TOKARNIA et al., 2000). Nessas regiões, diversas síndromes clinicopatológicas são associadas ao consumo espontâneo de samambaia por animais (TOKARNIA et al., 2000).

Nos animais domésticos, a intoxicação depende da espécie afetada e da quantidade de planta ingerida. São descritas cinco síndromes clínicas de intoxicação: 1) deficiência de tiamina em monogástricos, que leva a alterações nervosas (JARRETT, 1970; EVANS, 1975); 2) degeneração progressiva da retina (*bright blindness*) em ovinos (WATSON et al., 1965; BARNETT & WATSON, 1970; WATSON et al., 1972; HIRONO et al., 1993); 3) síndrome hemorrágica aguda (SHA), associada à aplasia da medula em bovinos (HIRONO et al., 1984b; NGOMUO & JONES, 1996b; ANJOS et al., 2008, 2009); 4) forma crônica de hematúria enzoótica bovina (HEB), com neoplasmas na bexiga (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 1969; SOUTO et al., 2006b; GABRIEL et al., 2009); e 5) forma crônica caracterizada por CCEs no TAS de bovinos (DÖBEREINER et al., 1967; TOKARNIA et al., 2000; SOUTO et al., 2006a; MASUDA et al., 2010).

Neoplasmas no trato alimentar e bexiga são frequentemente encontrados em bovinos que pastoreiam em áreas infestadas por samambaia (EVANS, 1968; TOKARNIA et al., 1969; JARRETT et al., 1978). Em humanos, a alta incidência de câncer de trato alimentar superior

também têm sido associada epidemiologicamente ao consumo de samambaia em algumas regiões geográficas (HIRONO et al., 1972; HIRONO, 1985; SHAHIN et al., 1999; ABNET, 2007; VETTER, 2009), tanto *in natura*, em chás (BICUDO, 2002) ou mesmo indiretamente, através do consumo do princípio tóxico no leite (ALONSO-AMELOT et al., 1996; ALONSO-AMELOT, 1997) ou na água (HIRONO et al., 1972; ALONSO-AMELOT & AVENDANO, 2001; ALONSO-AMELOT & AVENDANO, 2002).

A interação entre carcinógenos químicos da samambaia e a infecção pelo BPV-4 tem sido relatada em bovinos (CAMPO & JARRETT, 1986; PENNIE & CAMPO, 1992; CONNOLLY et al., 1998; BENISTON et al., 2001). Aspectos relevantes quanto à etiopatogênese da forma clínica crônica de CCEs no TAS de bovinos serão revisados a partir daqui.

2.2 Toxicidade da samambaia

2.2.1 Princípios tóxicos e carcinogênese química

A samambaia é conhecida como a única planta naturalmente capaz de induzir neoplasmas malignos em animais (YAMADA et al., 2007). O efeito carcinogênico da samambaia foi descoberto durante os primeiros estudos da intoxicação crônica pela planta, no início da década de 60 do século XX. Sua carcinogenicidade foi comprovada pela primeira vez em 1965, com a indução experimental de múltiplos adenocarcinomas intestinais em ratos (EVANS & MASON, 1965). No entanto, apenas em 1983 o princípio carcinogênico foi quimicamente isolado (NIWA et al., 1983). O ptaquilosídeo, que é um glicosídeo norsesquiterpeno do tipo iludano, tem efeito radiomimético e é gradualmente convertido à pterosina B e à dienona em condições alcalinas ou fracamente ácidas (dependente de pH) (FENWICK, 1989). A pterosina, ptaquilosídeo agliconado também isolado da samambaia, é instável e se decompõe em dienona. A dienona, por sua vez, é um potente agente alquilante que age sobre as bases purinas e pirimidinas dos nucleotídeos, principalmente a guanina (5'-GMP) e a adenina (5'-AMP), formando adutos de DNA (PRAKASH et al., 1996; SHAHIN et al., 1998a). Os adutos são importantes na produção do câncer por causar mutações (PRAKASH et al., 1996; SHAHIN et al., 1998a; FREITAS et al., 2001; CULLEN et al.,

2002; WIENCKE, 2002). A alteração química do DNA causada por agentes alquilantes é geralmente responsável pela carcinogênese química (PRAKASH et al., 1996; YAMADA et al., 2007). No caso da dienona, ela leva a mutações pontuais no DNA e ao processo da carcinogênese (PRAKASH et al., 1996; SHAHIN et al., 1998a). O pH alcalino da saliva e urina (pH 8,1 e 7,5-8,5, respectivamente) auxiliária, portanto, na ação carcinogênica nos locais onde elas se acumulam (FENWICK, 1989; PRAKASH et al., 1996). As propriedades do ptaquilosídeo indicam que ele é um carcinógeno direto (não é necessária ativação enzimática) e que a dienona é o carcinógeno final (FENWICK, 1989).

A ação carcinogênica do ptaquilosídeo em bovinos está relacionada com a formação de adutos de DNA e mutações no gene *H-ras*¹ no códon 61, levando à formação de adenocarcinomas ileais (PRAKASH et al., 1996). A administração intravenosa de ptaquilosídeo também está relacionada com a indução da dupla mutação nos códons 58 e 59 do gene *H-ras* na glândula mamária de ratos, sugerindo que a ativação desse gene é o evento inicial na carcinogênese induzida pelo ptaquilosídeo (SHAHIN et al., 1998b). A carcinogenicidade também tem sido comprovada experimentalmente em camundongos, ratos, cobaios, ovinos, gansos, entre outros, que desenvolvem tumores (EVANS, 1968) com indução de adutos de DNA e mutações no gene *H-ras* (SHAHIN et al., 1998b; FREITAS et al., 2001). Os estudos experimentais em diversas espécies animais estão sumarizados na Tabela 1.

A formação de adutos de DNA e a ativação do *H-ras* são sugeridos como estágios iniciais da carcinogênese por ptaquilosídeo em adenocarcinomas no íleo de bezerros (PRAKASH et al., 1996). O gene *p53*² mutado tem também sido encontrado em papilomas experimentais e em carcinomas naturais (SCOBIE et al., 1997). É possível que ambos, *p53* e *H-ras* representem alvos para os carcinógenos da samambaia (PENNIE & CAMPO, 1992; PRAKASH et al., 1996; SCOBIE et al., 1997; BENISTON et al., 2001). Juntamente com eles, os receptores para o fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor* - EGFR) aumentam durante a carcinogênese (CAMPO et al., 1990). No entanto, um estudo em ratos com tumores ileais e de bexiga induzidos por *P. aquilinum* demonstrou que talvez possa não haver mutações nos genes *p53* e *H-ras* em tumores quimicamente induzidos por samambaia (FREITAS et al., 2002).

¹ A proteína resultante do gene *H-ras*, também conhecida como proteína transformadora p21, está envolvida na regulação da divisão celular em resposta a fatores de crescimento (LODISH et al., 1999).

² O gene *p53* é conhecido como o gene supressor tumoral. Na célula, a proteína p53 liga-se ao DNA, o qual estimula a produção da proteína transformadora p21. Quando a p21 interage com a proteína estimuladora da divisão celular (cdk2), a divisão celular é inibida. Mutações no gene *p53* alteram o controle de divisão celular, permitindo a divisão celular irrestrita (LODISH et al., 1999).

Tabela 1 – Estudos experimentais com *P. aquilinum* em diferentes espécies animais relacionados com o órgão afetado e o tipo de neoplasma desenvolvido.

Espécie	Administração	Órgão afetado	Tipo de neoplasma	Referência
Rato	Pellet da planta	Intestino	AdenoCA intestinal	(EVANS & MASON, 1965)
Bovino	Planta	Bexiga	Hemangioma, papiloma e CA vesical	(PAMUKCU et al., 1967)
Codorna japonesa	Extrato da planta	Intestino	AdenoCA ileal, cecal e colônico	(EVANS, 1968)
Cobaio	Planta	Intestino e bexiga	AdenoCA jejunal. AdenoCA e CCT vesical	(EVANS, 1968)
Ovino	Planta	Intestino	AdenoCA colônico	(EVANS, 1968)
Hamster	Planta	Intestino	AdenoCA ileal	(EVANS, 1968)
Rato	Pellet da planta	Intestino e bexiga	AdenoCA e pólipos adenomatosos intestinais. CCT vesical	(PAMUKCU & PRICE, 1969)
Camundongo suíço	Pellet da planta	Medula óssea e pulmão	Leucemia linfocítica. Adenoma e adenoCA pulmonar	(PAMUKCU et al., 1972)
Camundongo	Leite de vacas que ingeriram a planta	Pulmão	Adenoma pulmonar	(EVANS et al., 1972)
Rato	Pellet da planta	Intestino, bexiga e linfonodo.	Adenoma e adenoCA ileal. FibroSA intestinal. Papiloma e CA vesical. SA de células reticulares em linfonodo	(HIRONO et al., 1972)
Rato	Pellet da planta	Intestino e bexiga	Adenoma, adenoCA e SA ileal. AdenoCA cecal. Papiloma e CA vesical.	(HIRONO et al., 1973)
Rato albino	Pellet da planta e/ou quercetina	Intestino e bexiga	Fibroadenoma, adenoma, adenoCA ileal. CCT vesical.	(PAMUKCU et al., 1980)
Rato	Extrato da planta	Intestino, mama e bexiga	AdenoCA ileal. CA mamário. Papiloma vesical.	(HIRONO et al., 1984a)
Rato	Planta	Intestino	SA ileal.	(OGINO et al., 1986)
Rato	Ptaquilosídeo em dieta	Intestino e bexiga	Adenoma e adenoCA ileal e histiocitoma maligno fibroso no intestino. Papiloma, CCT, CCE e SA na bexiga.	(HIRONO et al., 1987)
Sapo (<i>Bufo regularis</i>)	Extrato da planta	Fígado	CA hepatocelular	(EL-MOFTY et al., 1987)
Rato Sprague Dawley	Pellet da planta	TAS, intestino, glândula mamária, linfonodo, pulmão e bexiga.	CCEs no esôfago e faringe. Papiloma, adenoma e CCT vesical. AdenoCA ileal. AdenoCA mamário. LinfoSA no linfonodo. SA indiferenciado no pulmão.	(SMITH et al., 1988)
Bovino	Planta	Bexiga	HemangioSA, hemangioendotelioma e CCT vesical.	(CAMPO et al., 1992; CAMPO et al., 1994b)
Bovino	Planta e BPV-4	TAS e Bexiga	CCE no TAS e adenoCA no intestino. Neoplasmas vesicais de histogênese variada.	(CAMPO et al., 1992; CAMPO et al., 1994b)
Rato Sprague Dawley	Ptaquilosídeo intravenoso	Glândula mamária	AdenoCA mamário	(SHAHIN et al., 1998b)
Rato	Planta seca em pó	Intestino e bexiga	Hiperplasias, adenomas e CA ileais; Hiperplasias, papilomas, adenomas e CA vesicais; outros neoplasmas	(FREITAS et al., 2002)
Hamster	Planta e BPV-2	Pele e bexiga	Papiloma e fibroma na pele e ausência de tumores na bexiga	(LEISHANGTHEM et al., 2008)

Abreviaturas usadas: adenoCA: adenocarcinoma; CA: carcinoma; SA: sarcoma; CCT: Carcinoma de células de transição; CCE: carcinoma de células escamosas; TAS: trato alimentar superior; FibroSA: fibrossarcoma; LinfoSA: linfossarcoma; HemangioSA: hemangioossarcoma.

Em altas doses, o ptaquilosídeo tem uma importante característica radiomimética que está relacionada com os sinais clínicos da intoxicação aguda (SCHACHAM et al., 1970; HIRONO et al., 1984b). Esse efeito também tem sido relacionado com a infecção pelo papilomavírus e com a permanência dos papilomas no TAS em bovinos intoxicados cronicamente por samambaia (CAMPO et al., 1994b). Em altas doses, o efeito do ptaquilosídeo é semelhante ao da radiação, com aplasia progressiva da medula óssea e acentuada queda na quantidade de leucócitos circulantes (HIRONO et al., 1984b; FENWICK, 1989). O ptaquilosídeo liga-se ao DNA e altera a expressão antigênica nas células-tronco e pluripotentes da medula óssea. Em consequência, as células-tronco e pluripotentes passam a induzir uma resposta imunológica celular, inibindo a proliferação e a diferenciação das linhagens mielóides (YOUNG, 2002). Em casos naturais e experimentais de intoxicação aguda por *P. aquilinum*, linfopenia acentuada, neutropenia, monocitopenia e trombocitopenia são frequentemente observadas (HIRONO et al., 1984b; ANJOS et al., 2008; ANJOS et al., 2009).

O flavonóide quercetina (5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona) também está presente em altas concentrações na samambaia (WANG et al., 1976; PAMUKCU et al., 1980; PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; NGOMUO & JONES, 1996a). Ele é mutagênico* e clastogênico*, levando à quebra da fita simples de DNA (BJELDANES & CHANG, 1977; PLAUMANN et al., 1996) e a aberrações cromossômicas (LIOI et al., 2004). A quercetina também age induzindo aberrações cromossomais em ensaios de transformação *in vitro* (LEAL et al., 2003). Em adição, ela age ativando ou inibindo cinases e fosfatases, interferindo em passos críticos nos sinais de transdução (CAMPO, 1997b). A quercetina promove a completa transformação de células bovinas primárias infectadas com DNA de BPV-4 (PENNIE & CAMPO, 1992; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CONNOLLY et al., 1998), através da sobre-regulação do promotor transcricional viral (CONNOLLY et al., 1998) e do aumento da expressão da proteína p53 (BENISTON et al., 2001). Todas as propriedades mutagênicas somente da quercetina ou em conjunto com a infecção pelo BPV-4 foram observadas *in vitro*, mas ainda precisam ser confirmadas *in vivo* (CAMPO, 2002).

* Mutágenos são agentes químicos ou físicos capazes de induzir mutação (LODISH et al., 1999).

* Clastógenos são substâncias que causam quebras, perdas ou rearranjos de segmentos de cromossomos (LODISH et al., 1999).

2.3 Papilomavírus bovino

2.3.1 Características gerais e classificação viral

Os papilomavírus são vírus de DNA, não-envelopados, pertencentes à família Papillomaviridae, que induzem lesões benignas proliferativas na pele e membranas mucosas de animais domésticos, silvestres e de humanos (HOWLEY & LOWY, 2006). Eles são estritamente espécie-específicos, com apenas uma condição conhecida de infecção natural entre espécies diferentes (sarcoide em equídeos pelos BPVs-1 e -2) (CAMPO, 2002; CAMPO, 2003).

Nos bovinos, há diferentes genótipos de papilomavírus (BPV-1 a -10) que são associados a diferentes lesões histopatológicas (JARRETT, 1985; BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008). As características referentes aos genótipos virais do BPVs estão sumarizadas na Tabela 2. Eles são classificados em três gêneros: Xi-, Delta- e Épsilon-papilomavírus (DE VILLIERS et al., 2004). Os Xi-papilomavírus são puramente epiteliotrópicos e compreendem os BPVs-3, -4 e -6 (CAMPO, 2002). Os Delta-papilomavírus são associados à fibropapilomas (BPVs-1 e -2) (JARRETT, 1978). Os Épsilon-papilomavírus compreendem os BPVs-5, -7 e -8, que compartilham semelhanças com os dois primeiros grupos (CAMPO, 2002; OGAWA et al., 2007; TOMITA et al., 2007). Recentemente, dois novos genótipos (BPV-9 e -10), pertencentes ao gênero Xi-papilomavírus, foram descritos (HATAMA et al., 2008). Os papilomas foram anteriormente classificados em subgrupos A e B. O primeiro compreendia os vírus indutores de fibropapilomas (BPV-1, -2 e -5), com envolvimento dermal de fibroblastos e de ceratinócitos. O subgrupo B por outro lado (BPV-3, -4 e -6), induziria apenas papilomas com envolvimento epitelial (JARRETT, 1985).

Tabela 2 – Localização dos papilomas/fibropapilomas de bovinos, de acordo com o genótipo viral.

Genótipo	Localização	Subgrupo*	Gêneros♠	Tipo†	Referência
BPV-1	Pênis e teto	A	Delta	Fibropapiloma	(MEINKE & MEINKE, 1981)
BPV-2	Pele/trato alimentar	A	Delta	Fibropapiloma	(LANCASTER, 1979)
BPV-3	Pele	B	Xi	Papiloma	(PFISTER et al., 1979)
BPV-4	Trato alimentar	B	Xi	Papiloma	(CAMPO et al., 1980)
BPV-5	Úbere	A	Épsilon	Fibropapiloma	(BLOCH et al., 1994)
BPV-6	Tetos	B	Xi	Papiloma	(JARRETT et al., 1984)
BPV-7	Teto	-	Épsilon	Papiloma	(OGAWA et al., 2007)
BPV-8	Pele	-	Épsilon	Papiloma	(TOMITA et al., 2007)
BPV-9 e -10	Úbere	-	Xi	Papiloma	(HATAMA et al., 2008)

Fontes: *(JARRETT, 1985); †(HOWLEY & LOWY, 2006; BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008); ♠(DE VILLIERS et al., 2004)

2.3.2 Estrutura molecular viral

O virião do BPV é uma estrutura icosaédrica de 55-60nm de diâmetro que forma partículas paracrystalinas no núcleo de células infectadas (HOWLEY & LOWY, 2006). Seu material genético é circular, DNA de fita dupla, com 7.265 nucleotídeos (PATEL et al., 1987). Há três diferentes regiões em seu genoma: uma região de controle longa (*long control region* - LCR), que contém os elementos necessários para replicação e transcrição, e duas regiões contendo as estruturas de leitura abertas (*open reading frames* - ORFs), correspondendo aos genes precoces (*early* – E) e tardios (*late* – L) (HOWLEY & LOWY, 2006). A infecção produtiva e a expressão gênica dos BPVs é ligada aos diferentes estágios de diferenciação celular de ceratinócitos e só ocorre naqueles que sofrem diferenciação terminal (ANDERSON et al., 1997; HOWLEY & LOWY, 2006) (Figura 1). O vírus infecta as células basais, expressa parte de seus genes, replica seu genoma nos estratos escamoso e granular, expressa seus genes estruturais e é montado nos ceratinócitos escamosos e novos vírus são liberados pela camada córnea (CAMPO, 1997b; CAMPO, 2003; MOODY & LAIMINS, 2010).

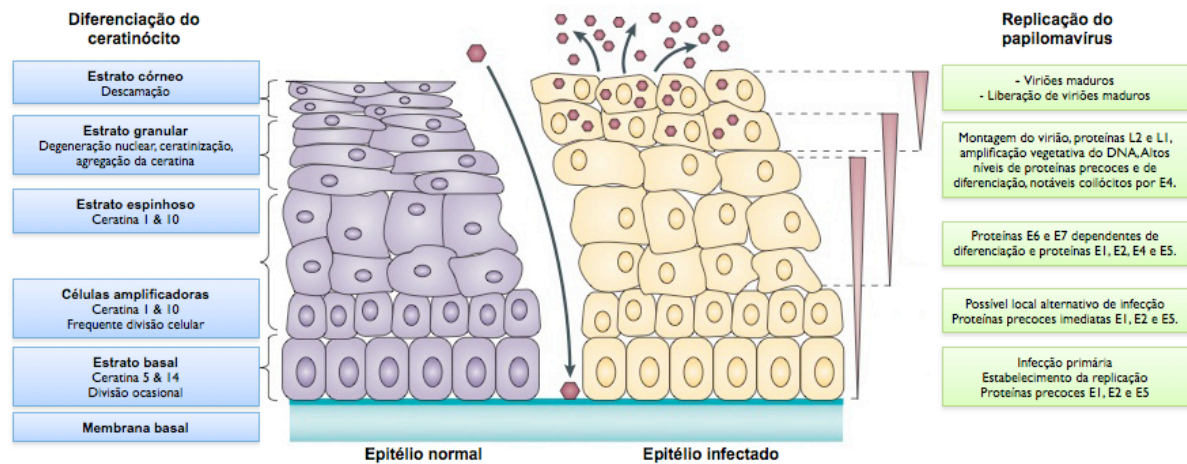


Figura 1 – Diferenciação do epitélio escamoso cutâneo normal e as atividades do papilomavírus na produção de lesões benignas em humanos. Em epitélios não-ceratinizados (laringeo ou esofágico), as ceratinas 4 e 13 são expressas no lugar das ceratinas 1 e 10 nas células diferenciadas. As atividades virais em seus estratos correspondentes, durante a infecção produtiva, demonstradas na coluna direita, foram determinadas de estudos de hibridização *in situ*. Fonte: baseado nos esquemas de HOWLEY & LOWRY (2006) e MOODY & LAIMINS (2010).

Nas células basais, os genes precoces *E1* e *E2* são responsáveis pela replicação do DNA e pelo controle da transcrição, respectivamente (HOWLEY & LOWRY, 2006; MOODY & LAIMINS, 2010). O gene precoce *E4* codifica pequenas proteínas que são abundantes no citoplasma dos ceratinócitos e que interagem com os filamentos de citoceratina (CAMPO, 1997b). As ORFs *E5*, *E6* e *E7* são capazes de sobrepor o controle do ciclo celular e participar na transformação celular das células hospedeiras (CAMPO, 1997b; MOODY & LAIMINS, 2010). A *E5* (originalmente *E8*) é a principal oncoproteína transformadora dos BPVs-1 e -4 (BURNETT et al., 1992; ANDERSON et al., 1997; TSIRIMONAKI et al., 2006; BORZACCHIELLO et al., 2009). Ela é expressa nas camadas basais e suprabasais das células transformadas (BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008; ROPERTO et al., 2008; BORZACCHIELLO et al., 2009). Sua função transformadora está na ativação do fator de crescimento β derivado das plaquetas (*platelet-derived growth factor* β - PDGF β), na regulação de ciclinas e cinases e na inibição das junções gap, levando à proliferação celular independente de ancoramento (GRINDLAY et al., 2005). A principal característica da *E5* é a subregulação do complexo principal de histocompatibilidade classe I (*major histocompatibility complex class I* – MHC-I), que representa o mecanismo pelo qual o BPV evade da resposta imune do hospedeiro (ASHRAFI et al., 2002; MARCHETTI et al., 2002). O gene *E6* é de grande importância nos BPV-1 e papilomavírus humano (HPV). Ele codifica uma oncoproteína que promove a degradação do gene supressor tumoral *p53*, inibindo a

regulação do ciclo celular e apoptose, levando à imortalização celular (CAMPO, 1997b; VIKHANSKAYA et al., 2002; MOODY & LAIMINS, 2010). A proteína p53 tem um importante papel na infecção viral, pois ela age como supressora da amplificação do DNA na replicação dos papilomavírus (LEPIK et al., 1998). O BPV-4 não tem o gene para a proteína E6 (JACKSON et al., 1991) e, por isso, necessita a presença dos princípios tóxicos da samambaia como um co-fator para a transformação oncogênica (CAMPO & JARRETT, 1986; CAMPO et al., 1994b; CAIRNEY & CAMPO, 1995; SCOBIE et al., 1997; BENISTON et al., 2001). Os genomas do BPVs-3, -4 e -6 não possuem a ORF *E6*, que é substituída pela *E5* nesses vírus (BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008). O gene precoce *E7* é expresso em todas as camadas dos papilomas por BPVs-1 e -4, e coopera com os genes *E5* e *E6* na indução da transformação celular no BPV-1 (BOHL et al., 2001; BORZACCHIELLO et al., 2009; MOODY & LAIMINS, 2010).

2.3.3 Aspectos epidemiológicos, macroscópicos e histopatológicos dos papilomas

Os papilomas e fibropapilomas de bovinos podem ocorrer em diferentes locais/órgãos, nos quais diferentes genótipos são encontrados. Papilomas cutâneos são comuns no bovino e não há predileção por sexo e raça (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Eles ocorrem principalmente em áreas de abrasão, que são a porta de entrada do vírus para se multiplicar (STUDDERT et al., 1988). Papilomas no trato alimentar de bovinos ocorrem em qualquer idade, mas são mais encontrados em animais com menos de dois anos (JARRETT, 1980). Os papilomas geralmente são auto-limitantes e podem levar até doze meses para sua regressão (CAMPO et al., 1994b). No entanto, em regiões com grande infestação por samambaia, a presença e a persistência de acentuada quantidade de papilomas do trato alimentar (papilomatose) é comum em bovinos de várias idades (DÖBEREINER et al., 1967; BORZACCHIELLO et al., 2003; SOUTO et al., 2006a). A influência da idade, fatores radiomiméticos da samambaia, infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008) e o uso de imunossupressores exógenos (CAMPO et al., 1994b) atuam positivamente na persistência dos papilomas e na reativação viral (CAMPO, 1997a).

Macroscopicamente, os papilomas podem ser pequenos ou atingir grandes tamanhos, podem ser únicos, múltiplos ou coalescentes, formando placas, massas pedunculadas, sésseis

e pouco aderidas ao tecido adjacente (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). A característica mais marcante é o desenvolvimento de formações exofíticas digitiformes, papilares ou frondosas (HEAD et al., 2002). Fibropapilomas tendem a ser massas irregulares, friáveis com áreas necróticas e de hemorragia. Ao corte, eles são firmes, com centro úmido e fibroso (JARRETT, 1985).

Os papilomas podem ser classificados: a) quanto a sua origem, em viral e não-viral; e/ou b) quanto à proliferação do componente mesenquimal dérmico, em escamoso (apenas epitelial) ou fibropapiloma (epitélio e mesênquima proliferados) (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Os papilomas escamosos induzidos pelo papilomavírus devem ser diferenciados dos papilomas escamosos não-virais. Ainda que compartilhem muitas características clínicas e histopatológicas, alguns componentes são importantes em sua distinção (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). Inclusões virais não são frequentemente encontradas na histopatologia (DÖBEREINER et al., 1967), mas podem ser melhor visualizadas com auxílio de outras técnicas (JARRETT, 1980). Nessas áreas, grande quantidade de viriões pode ser observada através da microscopia eletrônica (JARRETT, 1985). O efeito citopático viral nas células pode ser observado de duas maneiras. A primeira consiste na observação de ceratinócitos apoptóticos. A segunda, e mais importante, é a presença de coilócitos, que são ceratinócitos (escamosos ou granuloso) com núcleo picnótico, excêntrico, e com marcado halo perinuclear (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; HEAD et al., 2002).

Histologicamente, os papilomas por papilomavírus se desenvolvem em três fases: crescimento, desenvolvimento e regressão (Tabela 3) (HAMADA et al., 1990). A primeira é caracterizada por hiperplasia das células basais, acantose leve a moderada, hiperkeratose e parakeratose e poucos corpúsculos de inclusão. A fase de desenvolvimento envolve acentuada acantose, com tumefação celular e acentuada hiperkeratose ortoceratótica e parakeratótica. Nesse estágio, muitos corpúsculos de inclusão viral intranucleares podem estar presentes em células tumefeitas ou degeneradas das camadas espinhosa e granular (JARRETT, 1985). A regressão dos papilomas é caracterizada por leve hiperplasia epidérmica, acentuação da formação de redes, moderada proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e infiltrado de linfócitos T na interface dermo-epidérmica (KNOWLES et al., 1996; NICHOLLS & STANLEY, 2000; NICHOLLS et al., 2001; GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002).

Tabela 3 – Critérios histopatológicos para cada fase de desenvolvimento do papiloma.

Papiloma	Critério histopatológico
Em crescimento	Hiperplasia das células basais, leve a moderada acantose com leve a moderada hiper ou paraceratose.
Desenvolvido	Acantose proeminente, edema e fusão celular e acentuada hiper ou paraceratose.
Em regressão	Leve hiperplasia epitelial. Acentuação das papilas intradérmicas proliferando internamente em direção à lâmina própria, moderada proliferação de fibroblastos e produção de fibras colágenas, com infiltrado inflamatório linfocítico na interface epitelial-lâmina própria.

Fonte: traduzido de HAMADA et al. (1990)

A regressão dos papilomas ocorre naturalmente em indivíduos imunocompetentes, tanto em humanos quanto em animais domésticos (KNOWLES et al., 1996; NICHOLLS et al., 2001; PALEFSKY et al., 2001). Nos bovinos, a involução dos papilomas ocorre depois de vários meses de infecção (JARRETT, 1985), através da infiltração de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (KNOWLES et al., 1996; NICHOLLS & STANLEY, 2000; NICHOLLS et al., 2001). Nos papilomas induzidos por BPV-4, a infiltração de linfócitos T CD4⁺ ocorre nas camadas basais, enquanto que os CD8⁺ estão presentes no interior das frondes (KNOWLES et al., 1996; ANDERSON et al., 1997). Como essas células são consideradas as principais células citolíticas, sua proximidade aos ceratinócitos infectados poderia potencialmente eliminar células infectadas (KNOWLES et al., 1996). Alta infiltração de linfócitos tem sido observada em papilomas por BPV-2 e BPV-4 após vacinação com proteínas L2 e E7, respectivamente (JARRETT et al., 1991; CAMPO et al., 1994b; CAMPO, 1997a). Mesmo após a regressão, formas epissomais de DNA de BPV são encontradas em linfócitos circulantes (ROPERTO et al., 2008), o que sugere que fatores imunossupressivos ou citocinas podem reativar a latência viral e produzir lesões (CAMPO et al., 1994a; CAMPO, 2002).

2.4 Sinergismo samambaia-BPV-4 para carcinogênese

Em bovinos, o BPV-4 infecta a mucosa do trato alimentar superior (TAS) e leva à formação de papilomas que regridem naturalmente após um ano (JARRETT, 1980). No entanto, papilomas e CCEs no TAS tem sido encontrados conjuntamente em animais de

diversas idades no Brasil, Escócia, Itália, entre outros (BUENO, 1953; DÖBEREINER et al., 1967; JARRETT, 1978; JARRETT et al., 1978; BORZACCHIELLO et al., 2003). Em todas essas áreas, a presença desses tumores no TAS está fortemente relacionada com a alta infestação por samambaia (EVANS & MASON, 1965; DÖBEREINER et al., 1967; BORZACCHIELLO et al., 2003; SOUTO et al., 2006a). As evidências epidemiológicas levaram pesquisadores a associarem o efeito carcinogênico dos princípios tóxicos da samambaia com a infecção viral na formação de CCEs do TAS (JARRETT et al., 1978; CAMPO et al., 1980). Segundo esses autores, a persistência dos papilomas e a reativação viral ocorreria pela imunossupressão crônica nesses animais que pastoreiam nas áreas infestadas por samambaia (CAMPO et al., 1992; CAMPO et al., 1994b).

Em 1994, CAMPO et al. publicaram um estudo experimental de 13 anos de duração sobre o que seria a patogênese da intoxicação crônica pela samambaia e a interação viral. Nesse estudo, e em estudos subsequentes, a papilomatose ocorreu e persistiu no TAS após estados imunossupressivos, através da administração de azatioprina ou samambaia (CAMPO et al., 1994b; BORZACCHIELLO et al., 2003). Apenas nos animais infectados por BPV-4, e que foram alimentados com samambaia, os CCEs se desenvolveram no TAS. Apesar do DNA viral ter sido encontrado em apenas parte dos papilomas e em nenhum CCE, a teoria de que os carcinomas se originavam *de novo* pela ação direta dos carcinógenos foi considerada, na época, pouco provável devido a ausência de tumores no grupo sem BPV-4 e alimentados apenas com samambaia (CAMPO et al., 1994b).

Nos anos seguintes, foi proposto um diagrama representando a relação entre o BPV-4 e a samambaia no desenvolvimento de CCE no TAS (Figura 2). A transformação maligna completa dependeria, portanto, da ação de mutágenos, tais como a quercetina e o ptaquilosídeo, os quais agiriam sinergicamente com o vírus no processo carcinogênico, iniciando a expressão gênica do BPV e levando ao desenvolvimento do CCE (CAMPO, 2002). Durante o processo carcinogênico, o número de receptores celulares para o EGFR aumenta, o gene *ras* é ativado e o gene *p53* é mutado. Esses efeitos transformadores são causados, provavelmente, pelos princípios tóxicos da samambaia (CAMPO, 2002)

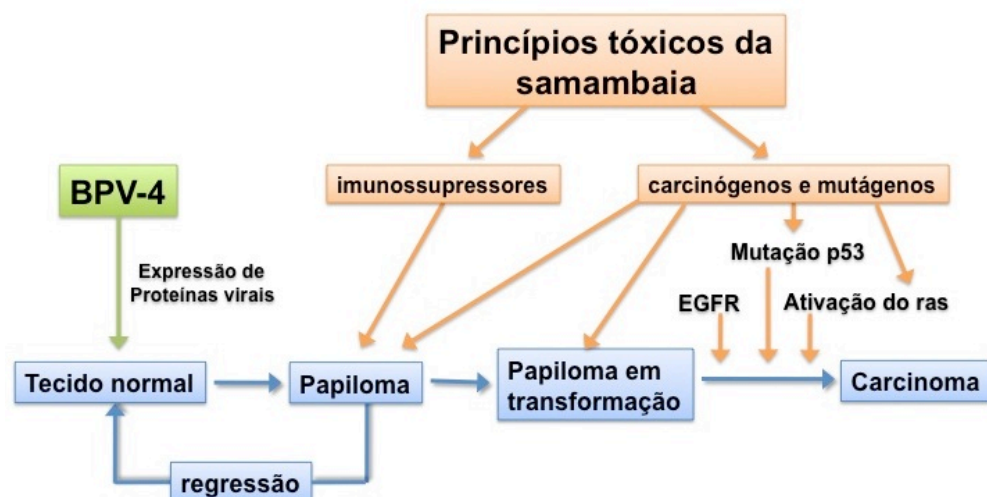


Figura 2 – Diagrama esquemático representando os múltiplos passos da progressão neoplásica dos papilomas do trato alimentar superior. Fonte: traduzido de CAMPO (2002).

Nos casos de CCEs induzidos por samambaia em bovinos, evidências morfológicas de papilomas em transformação carcinomatosa (PT) para CCE tem sido observadas (JARRETT, 1978; SOUTO et al., 2006a). Os mecanismos moleculares propostos se baseiam principalmente na ação da quercetina e do ptaquilosídeo sobre os proto-oncogenes celulares e as ORFs virais, sendo que o papel do BPV-4 tem sido apenas demonstrado *in vitro* (JAGGAR et al., 1990; PENNIE & CAMPO, 1992; PENNIE et al., 1993; CAIRNEY & CAMPO, 1995; CAMPO, 1997b; SCOBIE et al., 1997; CONNOLLY et al., 1998; ASHRAFI et al., 2002; ARAIBI et al., 2006). A presença apenas do BPV-4 não induz transformação de fibroblastos primários de palato bovino (*primary bovine palate fibroblasts* - PaIFs) pela ausência da ORF *E6*, ao contrário dos BPVs-1 e -2 (JACKSON et al., 1991). Ele precisa da ativação do gene *ras* para transformar as células (JAGGAR et al., 1990). Apesar de morfológicamente transformadas, essas PaIFs não são tumorigênicas, possuindo apenas crescimento independente de ancoramento. A adição de quercetina nessas culturas, entretanto, é capaz da transformação completa, com imortalização celular e indução de tumor em ratos (PENNIE & CAMPO, 1992). Na presença de quercetina, o *E7* é o único oncogene viral requerido para a transformação viral e foi sugerido por alguns autores que a quercetina seja o componente mais ativo na carcinogênese dos CCEs do TAS (CAIRNEY & CAMPO, 1995; CAMPO, 1997b). A ação da quercetina sobre o BPV-4 induz o aumento na expressão dos oncogenes virais pela sobre-regulação da LCR, aumentando o grau de transformação celular (CONNOLLY et al., 1998). Além disso, o aumento da expressão da ORF *E5* promove a diminuição da regulação do MHC-1, promovendo a evasão das células infectadas pelo BPV-4 contra o sistema imune

(linfócitos T citotóxicos e nulas [*natural-killers* - NK]) (ASHRAFI et al., 2002; ARAIBI et al., 2006; TSIRIMONAKI et al., 2006). Esse efeito promoveria o aumento na quantidade e persistência dos papilomas, além da diminuição da vigilância imunológica anti-neoplásica (BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008). Este mecanismo de evasão das células do sistema imune, especialmente dos linfócitos T e NK (ASHRAFI et al., 2002), está presente na infecção natural pelo papilomavírus. No entanto, somente este mecanismo de evasão natural não consegue explicar completamente a persistência dos papilomas em animais cronicamente intoxicados por samambaia.

Recentemente, um estudo com extrato de samambaia em camundongos C57BL/6 demonstrou a ação modulatória direta do princípio tóxico sobre células do sistema imune com efeito citotóxico seletivo e direto nas células NK (LATORRE et al., 2009). Camundongos tratados com samambaia tiveram uma diminuição na citotoxicidade mediada pelas células NK, os quais interrompem suas ações sobre os linfócitos T. A redução seletiva da atividade das células NK (citotoxicidade e produção de interferon gama) poderia estar diretamente envolvida na manutenção dos papilomas e formação de tumores em animais cronicamente intoxicados por samambaia (LATORRE et al., 2009). Dessa forma, os efeitos imunotóxicos da samambaia poderiam afetar não apenas a resposta imune contra a infecção viral, mas também a vigilância imunológica para a formação de tumores.

2.5 Lesões displásicas intra-epiteliais escamosas induzidas por papilomavírus e por carcinógenos químicos

Apesar da teoria da patogênese dos CCEs no TAS de bovinos que pastoreiam por longos períodos em samambaia ser bastante aceita, ela ainda tem que ser comprovada *in vivo* (CAMPO, 2002). Estudos tem relacionado a interação entre carcinógenos e ORFs, mas uma ligação causal concreta ainda não foi realmente estabelecida. O DNA do BPV-4 tem sido identificado em uma ínfima proporção de CCEs de bovinos cronicamente intoxicados por samambaia (CAMPO et al., 1980; CAMPO et al., 1985). Por outro lado, a formação de tumores cervicais uterinos em humanos pelo HPV é quase que exclusivamente relacionado à infecção viral. O DNA do HPV tem sido recuperado de 99% dos casos de câncer cervical uterino, principalmente relacionado aos genótipos de alto risco, como o HPV-16 e o HPV-18 (WALBOOMERS et al., 1999; BOHMER et al., 2003).

Alguns estudos sugerem que haja um papel similar do HPV nos CCEs de cabeça e pescoço de humanos (SYRJANEN, 2005). No entanto, identificação positiva de DNA de HPV ocorre em uma pequena percentagem desses casos (HOBBS et al., 2006; TORRENTE & OJEDA, 2007) e uma percentagem semelhante de DNA viral é identificado na mucosa aerodigestiva de pessoas saudáveis (HOWLEY & LOWY, 2006). Os casos de CCEs de cabeça e pescoço tem sido relacionados à lesão química crônica pelo consumo abusivo de álcool e tabaco (MUSCAT & WYNDER, 1992; MAIER & TISCH, 1997). Em alguns casos de carcinoma gástrico, suspeita-se do envolvimento da samambaia na alimentação humana, principalmente através do consumo direto do broto (ALONSO-AMELOT et al., 1996) ou indiretamente pelo leite (ALONSO-AMELOT & AVENDANO, 2002).

Seja de origem química pelo álcool/tábaco ou viral pelo HPV nos tratos aerodigestivo ou genital de humanos, respectivamente, lesões intra-epiteliais (*squamous intra-epithelial lesions* - SILs) hiperplásicas, displásicas e carcinomas *in situ* podem estar presentes em conjunto ou não com CCEs (WALBOOMERS et al., 1999; GALE et al., 2009). As características histopatológicas de cada alteração está demonstrada nas Tabela 4 e 5. Tais lesões predizem ou antecedem a formação desses tumores (GALE et al., 2005). A transição de um epitélio normal a carcinoma é um processo lento e multivariado. A soma ou acúmulo de alterações genéticas não-deletérias, que levam à seleção de uma população clonal de células epiteliais malignas transformadas, é a base patogenética da formação de SILs e CCEs (GALE et al., 2009). Todo espectro dessas alterações histológicas ocorrendo nesse processo é chamado de SILs, que varia de hiperplasia escamosa, displasia à carcinoma *in situ* (Figura 3) (GALE et al., 2005). Em sua evolução, alguns tipos de SILs são auto-limitantes e reversíveis, alguns persistem e alguns progridem a CCE (GALE et al., 2009).

Tabela 4 – Classificação e critérios histopatológicos para lesões intra-epiteliais escamosas (SILs) de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO) para SILs de cabeça e pescoço em humanos.

SIL	Critério histopatológico
Hiperplasia escamosa	Aumento no número de células na camada espinhosa (acantose) e/ou na camada basal/parabasal (hiperplasia de células basais); a arquitetura demonstra estratificação regular sem atipia celular.
Displasia leve	O distúrbio arquitetural está limitado no terço inferior do epitélio, acompanhado por atipia celular leve.
Displasia moderada	O distúrbio arquitetural se estende ao terço médio do epitélio, acompanhado por atipia celular moderada.
Displasia acentuada	O distúrbio arquitetural envolve mais de dois terços do epitélio, com acentuada atipia celular.
Carcinoma <i>in situ</i>	Distúrbio arquitetural em toda (ou quase toda) espessura do epitélio, acompanhada por acentuada atipia celular.

Fonte: GALE et al. (2005)

Tabela 5 – Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO) para SILs de cabeça e pescoço em humanos.

Distúrbio arquitetural	Atipia celular
<ul style="list-style-type: none"> • Estratificação epitelial irregular; • Perda de polaridade das células basais; • <i>Rete ridges</i> em formato de gota; • Aumento no número de figuras mitóticas; • Mitoses superficiais anormais; • Ceratinização prematura de células (disceratose); • Pérolas de ceratina dentro de <i>rete pegs</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Variação anormal no tamanho do núcleo (anisonucleose); • Variação anormal no formato do núcleo (pleomorfismo nuclear); • Variação anormal no tamanho das células (anisocitose); • Variação anormal no formato das células (pleomorfismo celular); • Aumento na razão núcleo-citoplasma; • Aumento no tamanho nuclear; • Figuras de mitose atípicas; • Aumento no tamanho e no número de nucléolo; • Hiperchromasia.

Fonte: GALE et al. (2005)

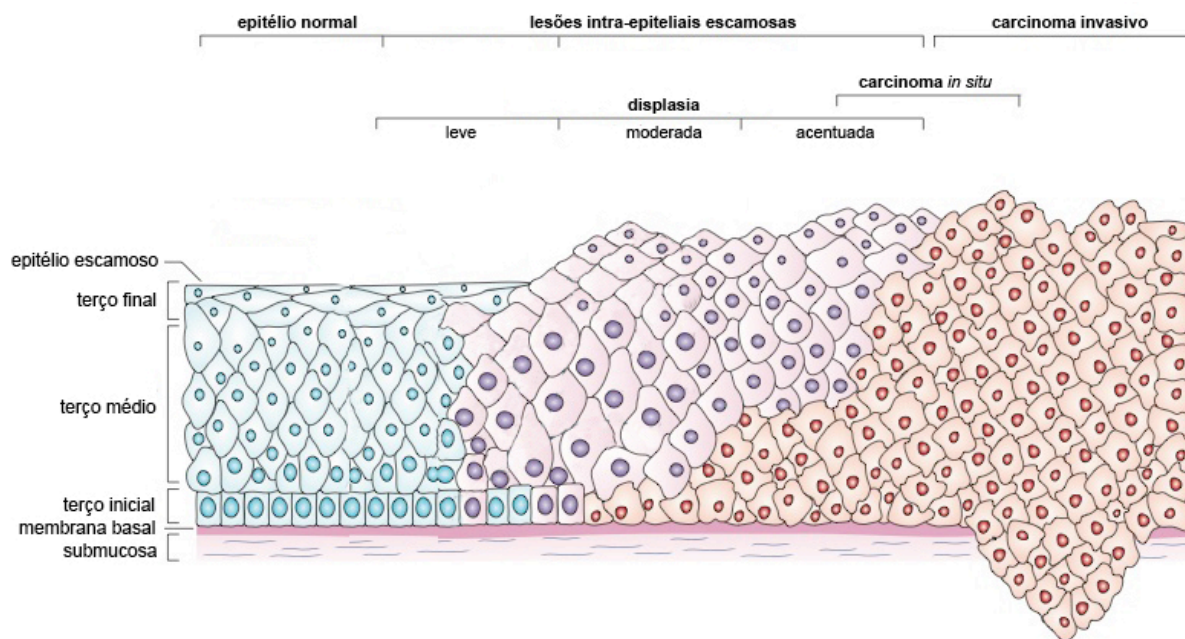


Figura 3 – Representação esquemática das diversas lesões intra-epiteliais escamosas quanto à atipia celular e ao distúrbio arquitetural. A hiperplasia escamosa e a displasia leve são alterações benignas com grande chance de regressão. Displasia moderada e acentuada representam alterações epiteliais potencialmente malignas que, juntamente com o carcinoma *in situ*, podem progredir para carcinoma invasivo. Ilustração e texto baseados em WOODMAN et al. (2007), HOWLEY & LOWRY (2006) e GALE et al. (2005).

As SILs também foram observadas em bovinos intoxicados crônica e espontaneamente por samambaia. A observação de pequenos CCEs em estágios iniciais (JARRETT, 1978; CAMPO et al., 1994b) e lesões epiteliais displásicas (SOUTO, 2005) no TAS de bovinos intoxicados espontaneamente por samambaia, bem como uma possível origem dos CCEs de faringe a partir do epitélio de ductos salivares (MASUDA, 2007; MASUDA et al., 2010), pode sugerir também uma ação direta dos princípios tóxicos da planta na gênese tumoral. Foi sugerido que a avaliação imuno-histoquímica para diferentes tipos específicos de citoceratinas, por exemplo o uso das citoceratinas 7/8, que são específicas de epitélios glandulares/ductais e não reagem ao epitélio estratificado maduro (RAUL et al., 2004; FILLIES et al., 2006; KATO et al., 2007), poderia ser uma ferramenta útil na distinção da origem dos CCEs nestes casos (MASUDA, 2007).

2.6 Referências

ABNET, C. C. Carcinogenic food contaminants. **Cancer Investigation**, Nova Iorque, EUA, v.25, n.3, p.189-196, 2007.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.382, n.6592, p.587, 1996.

ALONSO-AMELOT, M. E. The link between bracken fern and stomach cancer: milk. **Nutrition**, Burbank, EUA, v.13, n.7-8, p.694-696, 1997.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDANO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. **International Journal of Cancer**, Schiphol, Holanda, v.91, n.2, p.252-259, 2001 .

_____. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. **Current Medicinal Chemistry**, Londres, Inglaterra, v.9, n.6, p.675-686, 2002.

ANDERSON, R. A. et al. Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours. **Vet. J.**, Londres, Inglaterra, v.154, n.1, p.69-78, 1997.

ANJOS, B. L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.28, n.10, p.501-507, 2008.

ANJOS, B. L. et al. Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.29, n.9, p.753-766, 2009.

ARAIBI, E. H. et al. The E5 oncoprotein of BPV-4 does not interfere with the biosynthetic pathway of non-classical MHC class I. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.353, n.1, p.174-183, 2006.

ASHRAFI, G. H. et al. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. **Oncogene**, Basingstone, Inglaterra, v.21, n.2, p.248-259, 2002.

BARNETT, K. C.; WATSON, W. A. Bright blindness in sheep. A primary retinopathy due to feeding bracken (*Pteris aquilina*). **Research in Veterinary Science**, Oxford, Inglaterra, v.11, n.3, p.289-290, 1970.

BENISTON, R. G. et al. Quercetin, E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. **Carcinogenesis**, Nova Iorque, EUA, v.22, n.7, p.1069-1076, 2001.

BICUDO, F. Perigo à mesa: samambaia consumida em Minas Gerais favorece reprodução de vírus ligado a tumores. **Pesquisa FAPESP**, Botucatu, SP, v.80, p.44-47, 2002.

BJELDANES, L. F.; CHANG, G. W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. **Science**, Washington, EUA, v.197, n.4303, p.577-578, 1977.

BLOCH, N.; SUTTON, R. H.; SPRADBROW, P. B. Bovine cutaneous papillomas associated with bovine papillomavirus type 5. **Archives of Virology**, Wien, EUA, v.138, n.3-4, p.373-377, 1994.

BOHL, J.; HULL, B.; VANDE POL, S. B. Cooperative transformation and coexpression of bovine papillomavirus type 1 E5 and E7 proteins. **Journal of Virology**, Baltimore, EUA, v.75, n.1, p.513-521, 2001.

BOHMER, G. et al. No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, EUA, v.189, n.1, p.118-120, 2003.

BORZACCHIELLO, G. et al. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, Inglaterra, v.128, n.2-3, p.203-206, 2003.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, Paris, França, v.39, n.5, p.45-74, 2008.

BORZACCHIELLO, G. et al. Co-expression of bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring carcinomas of the urinary bladder in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, Inglaterra, v.141, n.1, p.84-88, 2009.

BUENO, P. Papilomatose faríngea em bovinos. **O Biológico**, São Paulo, SP, v.19, p.3, 1953.

BURNETT, S.; JAREBORG, N.; DIMAIO, D. Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, EUA, v.89, n.12, p.5665-5669, 1992.

CAIRNEY, M.; CAMPO, M. S. The synergism between bovine papillomavirus type 4 and quercetin is dependent on the timing of exposure. **Carcinogenesis**, Nova Iorque, EUA, v.16, n.8, p.1997-2001, 1995.

CAMPO, M. et al. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.286, n.5769, p.180-182, 1980.

CAMPO, M. S. et al. 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**, Oxford, Inglaterra, v.4, n.7, p.1819-1825, 1985.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F. Papillomavirus infection in cattle: viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumours. **Ciba Foundation Symposium**, Philadelphia, EUA, v.120, p.117-135, 1986.

CAMPO, M. S. et al. The Harvey ras 1 gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the upper alimentary canal in cattle. **Oncogene**, Basingstoke, Inglaterra, v.5, n.3, p.303-308, 1990.

CAMPO, M. S. et al. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, Chicago, EUA, v.52, n.24, p.6898-6904, 1992.

CAMPO, M. S. et al. Latent papillomavirus infection in cattle. **Research in Veterinary Science**, Oxford, Inglaterra, v.56, n.2, p.151-157, 1994a.

CAMPO, M. S. et al. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, Nova Iorque, EUA, v.15, n.8, p.1597-1601, 1994b.

CAMPO, M. S. Vaccination against papillomavirus in cattle. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, EUA, v.15, n.2, p.275-283, 1997a.

_____. Bovine papillomavirus and cancer. **Veterinary Journal**, v.154, n.3, p.175-188, 1997b.

_____. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, Amsterdã, Holanda, v.89, n.2, p.249-261, 2002.

_____. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary Comparative Oncology**, Oxford, Inglaterra, v.1, n.1, p.3-14, 2003.

CONNOLLY, J. A. et al. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. **Oncogene**, Basingstoke, Inglaterra, v.16, n.21, p.2739-2746, 1998.

CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumours in domestic animals**. 4th edição. Iowa, EUA: Iowa State Press, 2002. p. 3-44.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.324, n.1, p.17-27, 2004.

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

EL-MOFTY, M. et al. Alpha-ecdysone, a new bracken fern factor responsible for neoplasm induction in the Egyptian toad (*Bufo regularis*). **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, EUA, v.9, n.2-3, p.103-107, 1987.

EVANS, I. A.; MASON, J. Carcinogenic activity of bracken. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.208, n.5013, p.913-914, 1965.

EVANS, I. A. The radiomimetic nature of bracken toxin. **Cancer Research**, Chicago, EUA, v.28, n.11, p.2252-2261, 1968.

EVANS, I. A.; JONES, R. S.; MAINWARING-BURTON, R. Passage of bracken fern toxicity into milk. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.237, n.5350, p.107-108, 1972.

EVANS, W. C. Thiaminases and their effects on animals. **Vitamins and Hormones**, Nova Iorque, EUA, v.33, p.467-504, 1975.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) - Toxic effects and toxic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, Inglaterra, v.46, n.2, p.147-173, 1989.

FILLIES, T. et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **BMC Cancer**, Londres, Inglaterra, v.6, p.10, 2006.

FREITAS, R. N. et al. Bracken (*Pteridium aquilinum*)-induced DNA adducts in mouse tissues are different from the adduct induced by the activated form of the Bracken carcinogen ptaquiloside. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, EUA, v.281, n.2, p.589-594, 2001.

FREITAS, R. N. et al. Bracken fern-induced malignant tumors in rats: absence of mutations in p53, H-ras and K-ras and no microsatellite instability. **Mutation Research**, Amsterdã, Holanda, v.499, n.2, p.189-196, 2002.

GABRIEL, A. L. et al. Clinical and hematological aspects and urinary bladder lesions in chronic spontaneous poisoning by *Pteridium aquilinum* in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.29, n.7, p.515-525, 2009.

GALE, N. et al. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon, France: IARC Press, 2005. 430 p.

GALE, N. et al. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. **Histopathology**, Oxford, Inglaterra, v.54, p.639-656, 2008.

GAVA, A. Intoxicação por *Pteridium aquilinum*. In: RIET-CORRÊA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. (Ed.). **Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos**. 2 edição. Pelotas/RS: Editora Hemisfério Sul, 1993. p. 247-258.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumours of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumours in domestic animals**. 4th edição. Iowa, EUA: Iowa State Press, 2002. p. 45-118.

GRINDLAY, G. J.; CAMPO, M. S.; O'BRIEN, V. Transactivation of the cyclin A promoter by bovine papillomavirus type 4 E5 protein. **Virus Research**, Amsterdã, Holanda, v.108, n.1-2, p.29-38, 2005.

HAMADA, M. et al. Histopathological development of equine cutaneous papillomas. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, Inglaterra, v.102, n.4, p.393-403, 1990.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. **Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.89, n.Pt 1, p.158-163, 2008.

HEAD, K. W.; ELSE, R. W.; DUBIELZIG, R. R. Tumours of the alimentary tract. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumours in domestic animals**. 4th edição. Iowa, EUA: Iowa State Press, 2002. p. 401-482.

HIRONO, I. et al. Carcinogenic activity of processed bracken used as human food. **Journal of the National Cancer Institute**, Cairo, Egito, v.48, n.4, p.1245-1250, 1972.

HIRONO, I. et al. Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. **Journal of the National Cancer Institute**, Cairo, Egito, v.50, n.5, p.1367-1371, 1973.

HIRONO, I. et al. Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. **Gann**, Tokyo, Japão, v.75, n.10, p.833-836, 1984a.

HIRONO, I. et al. Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. **Veterinary Record**, Londres, Inglaterra, v.115, n.15, p.375-378, 1984b.

HIRONO, I. Human carcinogenic risk in the use of bracken fern. **Princess Takamatsu Symposium**, Tokyo, Japão, v.16, p.139-145, 1985.

HIRONO, I. et al. Induction of tumors in ACI rats given a diet containing ptaquiloside, a bracken carcinogen. **Journal of the National Cancer Institute**, Cairo, Egito, v.79, n.5, p.1143-1149, 1987.

HIRONO, I. et al. Reproduction of progressive retinal degeneration (bright blindness) in sheep by administration of ptaquiloside contained in bracken. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, Japão, v.55, n.6, p.979-983, 1993.

HOBBS, C. G. et al. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Otolaryngology**, Oxford, Inglaterra, v.31, n.4, p.259-266, 2006.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses. In: KNIPE, D. M. et al. (Ed.). **Fields virology**. 5th edição. Boston, Massachusetts: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 2299-2354.

ITIS. *Pteridium arachnoideum* (Kaulfuss) Maxon. 2010. Disponível em: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=504657&print_version=PRT&source=to_print>.

JACKSON, M. E. et al. The B subgroup bovine papillomaviruses lack an identifiable E6 open reading frame. **Molecular Carcinogenesis**, Nova Iorque, EUA, v.4, n.5, p.382-387, 1991.

JAGGAR, R. T. et al. Cooperation between bovine papillomavirus type 4 and ras in the morphological transformation of primary bovine fibroblasts. **Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.71, p.3041-3046, 1990.

JARRETT, J. Thiaminase-induced encephalopathy. A review. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, Bonner Springs, EUA, v.65, n.7, p.704-708, 1970.

JARRETT, W. F. Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma in cattle. **Bulletin of Cancer**, Paris, França, v.65, n.2, p.191-194, 1978.

_____. Bracken fern and papilloma virus in bovine alimentary cancer. **British Medical Bulletin**, Londres, Inglaterra, v.36, n.1, p.79-81, 1980.

JARRETT, W. F. et al. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.136, n.2, p.255-264, 1984.

JARRETT, W. F. The natural history of bovine papillomavirus infection. **Advances in Virology**, Cairo, Egito, v.5, p.83-101, 1985.

JARRETT, W. F. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.184, n.1, p.33-42, 1991.

JARRETT, W. F. H. et al. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma-virus. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.274, n.5668, p.215-217, 1978.

KATO, K. et al. Immunohistochemical studies on cytokeratin 8 and 18 expressions in canine cutaneous adnexa and their tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, Japão, v.69, n.3, p.233-239, 2007.

KNOWLES, G.; O'NEIL, B. W.; CAMPO, M. S. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. **Journal of Virology**, Baltimore, EUA, v.70, n.12, p.8451-8458, 1996.

LANCASTER, W. D. Physical maps of bovine papillomavirus type 1 and type 2 genomes. **Journal of Virology**, Baltimore, EUA, v.32, n.2, p.684-687, 1979.

LATORRE, A. O. et al. Immunomodulatory effects of *Pteridium aquilinum* on natural killer cell activity and select aspects of the cellular immune response of mice. **Journal of Immunotoxicology**, Philadelphia, EUA, v.6, n.2, p.104-114, 2009.

LEAL, A. M. et al. Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. **Veterinary Comparative Oncology**, Oxford, Inglaterra, v.1, n.1, p.15-21, 2003.

LEISHANGTHEM, G. D.; SOMVANSHI, R.; LAUREN, D. R. Pathological studies on Bovine papilloma virus-fern interaction in hamsters. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, Índia, v.46, n.2, p.100-107, 2008.

LEPIK, D. et al. p53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplificational replication. **Journal of Virology**, Baltimore, EUA, v.72, n.8, p.6822-6831, 1998.

LIOI, M. B. et al. Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, Inglaterra, v.131, n.2-3, p.233-236, 2004.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 4th edição. Nova Iorque, EUA: W. H. Freeman and Company, 1999. 1184 p.

MAIER, H.; TISCH, M. Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. **Acta Oto-laryngologica. Supplementum**, Estocolmo, Suécia, v.527, p.160-164, 1997.

MARCHETTI, B. et al. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. **Oncogene**, Basingstoke, Inglaterra, v.21, n.51, p.7808-7816, 2002.

MASUDA, E. K. **Morfologia e imunoistoquímica dos carcinomas de células escamosas alimentares associados ao consumo de *Pteridium aquilinum* em bovinos**. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2007.

MASUDA, E. K. et al. Morphological factors as indicators of malignancy of squamous cell carcinomas in cattle exposed naturally to bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, Inglaterra, in press, 2010.

MEINKE, W.; MEINKE, G. C. Isolation and characterization of the major capsid protein of bovine papilloma virus type 1. **Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.52, n.1, p.15-24, 1981.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews. Cancer**, Londres, Inglaterra, v.10, n.8, p.550-560, 2010.

MUSCAT, J. E.; WYNDER, E. L. Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. **Cancer**, Nova Iorque, EUA, v.69, n.9, p.2244-2251, 1992.

NCBI. *Pteridium arachnoideum*. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=104584&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>.

NGOMUO, A. J.; JONES, R. S. Cytotoxicity studies of quercetin, shikimate, cyclohexanecarboxylate and ptaquiloside. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, EUA, v.38, n.1, p.14-18, 1996a.

_____. Genotoxicity studies of quercetin and shikimate in vivo in the bone marrow of mice and gastric mucosal cells of rats. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, EUA, v.38, n.3, p.176-180, 1996b.

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

NICHOLLS, P. K. et al. Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.283, n.1, p.31-39, 2001.

NIWA, H. et al. Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var *Latiusculum*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, Inglaterra, v.24, n.48, p.5371-5372, 1983.

OGAWA, T. et al. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. **Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.88, n.Pt 7, p.1934-1938, 2007.

OGINO, H.; FUJIMOTO, M.; HIRONO, I. Reexamination of histological findings of ileal sarcomas induced in rats given diet containing bracken fern. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, Alemanha, v.112, n.1, p.6-10, 1986.

PALEFSKY, J. M. et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, EUA, v.183, n.3, p.383-391, 2001.

PAMUKCU, A. M.; GOKSOY, S. K.; PRICE, J. M. Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris Aquilina*) to cows. **Cancer Research**, Chicago, EUA, v.27, p.917-920, 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**, Cairo, Egito, v.43, n.1, p.275-281, 1969.

PAMUKCU, A. M. et al. Lymphatic leukemia and pulmonary tumors in female Swiss mice fed bracken fern (*Pteris aquilina*). **Cancer Research**, Chicago, EUA, v.32, n.7, p.1442-1445, 1972.

PAMUKCU, A. M. et al. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, Chicago, EUA, v.40, n.10, p.3468-3472, 1980.

PATEL, K. R.; SMITH, K. T.; CAMPO, M. S. The nucleotide sequence and genome organization of bovine papillomavirus type 4. **Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.68, p.2117-2128, 1987.

PENNIE, W. D.; CAMPO, M. S. Synergism between bovine papillomavirus type-4 and the flavonoid quercetin in cell-transformation in vitro. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.190, n.2, p.861-865, 1992.

PENNIE, W. D. et al. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type-4. **Virology**, Nova Iorque, EUA, v.193, n.2, p.614-620, 1993.

PFISTER, H. et al. Seroepidemiologic studies of bovine papillomavirus infections. **Journal of the National Cancer Institute**, Cairo, Egito, v.62, n.6, p.1423-1425, 1979.

PLAUMANN, B. et al. Flavonoids activate wild-type p53. **Oncogene**, Basingstoke, Inglaterra, v.13, n.8, p.1605-1614, 1996.

PRAKASH, A. S. et al. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. **Natural Toxins**, Nova Iorque, EUA, v.4, n.5, p.221-227, 1996.

RAUL, U. et al. Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype. **International Journal of Cancer**, Geneva, Suíça, v.111, n.5, p.662-668, 2004.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.21, p.38-42, 2001.

RISSI, D. R. et al. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.27, p.261-268, 2007.

ROPERTO, S. et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. **Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.89, n.Pt 12, p.3027-3033, 2008.

SCHACHAM, P.; PHILP, R. B.; GOWDEY, C. W. Antihematopoietic and carcinogenic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, EUA, v.31, n.1, p.191-197, 1970.

SCOBIE, L.; JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S. The role of exogenous p53 and E6 oncoproteins in in vitro transformation by bovine papillomavirus type 4 (BPV-4): significance of the absence of an E6 ORF in the BPV-4 genome. **The Journal of General Virology**, Londres, Inglaterra, v.78, p.3001-3008, 1997.

SHAHIN, M. et al. H-ras activation is an early event in the ptaquiloside-induced carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, EUA, v.250, n.2, p.491-497, 1998a.

SHAHIN, M. et al. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, EUA, v.244, n.1, p.192-197, 1998b.

SHAHIN, M.; SMITH, B. L.; PRAKASH, A. S. Bracken carcinogens in the human diet. **Mutation Research**, Amsterdã, Holanda, v.443, n.1-2, p.69-79, 1999.

SMITH, B. L. et al. Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium esculentum*) in New Zealand. **The New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, Nova Zelândia, v.36, n.2, p.56-58, 1988.

SOUTO, M. A. **Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*)**. 2005. 139f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.

SOUTO, M. A. M. et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.26, p.112-122, 2006a.

SOUTO, M. A. M. et al. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.36, p.1647-1650, 2006b.

STUDDERT, M. J. et al. Papilloma of the ears of calves following tattooing. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, Austrália, v.65, n.12, p.399, 1988.

SYRJANEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, Holanda, v.32 Suppl 1, p.59-66, 2005.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de hematúria enzoótica e carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. II. Estudos complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v.4, p.209-224, 1969.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; DA SILVA, M. F. *Pteridium aquilinum*. In: _____ (Ed.). **Plantas tóxicas da Amazônia**. edição. Manaus, AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1979. p. 48-57.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas de ação radiomimética. In: _____ (Ed.). **Plantas tóxicas do Brasil**. edição. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Helianthus, 2000. p. 178-187.

TOMITA, Y. et al. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. **Virus Genes**, Boston, EUA, v.35, n.2, p.243-249, 2007.

TORRENTE, M. C.; OJEDA, J. M. Exploring the relation between human papilloma virus and larynx cancer. **Acta Oto-laryngologica**, Estocolmo, Suécia, v.127, n.9, p.900-906, 2007.

TSIRIMONAKI, E. et al. Similarities and differences between the E5 oncoproteins of bovine papillomaviruses type 1 and type 4: cytoskeleton, motility and invasiveness in E5-transformed bovine and mouse cells. **Virus Research**, Amsterdã, Holanda, v.115, n.2, p.158-168, 2006.

VETTER, J. A biological hazard of our age: bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]--a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapeste, Hungria, v.57, n.1, p.183-196, 2009.

VIKHANSKAYA, F. et al. Human papillomavirus type 16 E6-enhanced susceptibility to apoptosis induced by TNF in A2780 human ovarian cancer cell line. **International Journal of Cancer**, Geneva, Suíça, v.97, n.6, p.732-739, 2002.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, Londres, Inglaterra, v.189, n.1, p.12-19, 1999.

WANG, C. Y. et al. Identification of carcinogenic tannin isolated from Bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of the National Cancer Institute**, Cairo, Egito, v.56, n.1, p.33-36, 1976.

WATSON, W. A.; BARLOW, R. M.; BARNETT, K. C. Bright blindness--a condition prevalent in Yorkshire hill sheep. **Veterinary Record**, Londres, Inglaterra, v.77, n.37, p.1060-1069, 1965.

WATSON, W. A. et al. Experimentally produced progressive retinal regeneration (bright blindness) in sheep. **British Veterinary Journal**, Londres, Inglaterra, v.128, n.9, p.457-469, 1972.

WIENCKE, J. K. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. **Oncogene**, Basingstoke, Inglaterra, v.21, n.48, p.7376-7391, 2002.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews. Cancer**, Londres, Inglaterra, v.7, n.1, p.11-22, 2007.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Products Report**, Londres, Inglaterra, v.24, n.4, p.798-813, 2007.

YOUNG, N. S. Acquired aplastic anemia. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, EUA, v.136, n.7, p.534-546, 2002.

3. ARTIGO 1

ARE PAPILOMAS REALLY NECESSARY FOR THE DEVELOPMENT OF BRACKEN FERN-ASSOCIATED UPPER DIGESTIVE TRACT SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF CATTLE?

Masuda E.K.^{*}, Kommers G.D.[†], Rosa F.B.^{**}, Barros C.S.L.[†], Piazer J.V.M.[‡]

(Submetido para publicação em Setembro de 2010 para o
Journal of Comparative Pathology)

^{*} Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM. ^{**} Bolsista PIBIC, UFSM.

[†] Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-970, Santa Maria/RS, Brazil.

[‡] Inspeção Veterinária, Jaguari/RS, Brazil.

Corresponding author: G.D. Kommers. Address: Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-970, Santa Maria/RS, Brazil. Tel: +55 (55) 3220-8168; Fax: +55 (55) 3220-8284. E-mail address: glaukommers@yahoo.com (G.D. Kommers)

Are papillomas really necessary for the development of bracken fern-associated upper digestive tract squamous cell carcinomas of cattle?

E.K. Masuda*, G.D. Kommers†, F.B. Rosa*, C.S.L. Barros†, J.V.M. Piazer‡

Summary

Squamous cell carcinomas (SCCs) of the upper digestive tract (UDT) of cattle have been associated with chronic bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning and bovine papillomavirus type-4 (BPV-4) infection. According to the hypothesis designated as “papilloma-carcinoma syndrome” and established in 1994, BPV-4 infects the mucosa and induces papillomas, a vastly expanded target for chemical carcinogens in bracken fern. However, similarly to what is observed in human head and neck cancer, dysplastic squamous intraepithelial lesions (SILs) are also observed in cattle with naturally-occurring SCCs grazing on bracken fern. Morphologic analysis of papillomatous lesions and dysplastic SILs of spontaneous cases can provide important additional data to the establishment of the disease etiopathogenesis and this is the aim of the present study. Epithelial samples (n=268) from the UDT mucosa of 60 bovines diagnosed with SCCs from highly contaminated areas with bracken fern were collected. Grossly, the lesions corresponded to mucosal wrinkles, small erosions and ulcers, nodules up to 0.5cm in diameter, rugged plaques, and papillomatous lesions. Microscopically, 168 papillomatous lesions, 72 SILs and 28 SCCs in initial phase of growth were identified. Papillomas were subdivided into four phases: a growing phase, a developing phase, a regressing phase, and a carcinomatous transforming phase. More than a half of all papillomatous lesions were well-developed papillomas. Transforming papillomas observed in 18.5% of all papillomas is the morphological evidence to support the papilloma-carcinoma syndrome hypothesis. However, potentially malignant epithelial dysplastic lesions that have a greater likelihood of progression to SCCs without passing through a papillomatous stage, such as moderate and severe dysplasia and carcinoma *in situ*, were observed in the majority of the SILs. Similarly to what is observed in human head and neck SCCs, potentially malignant SILs may be the second hypothetic pathway for the development of UDT SCCs of cattle grazing on bracken fern. Although a role of BPV-4 infection in the development of SILs

cannot be completely ruled out, direct-acting carcinogens of bracken fern can be a plausible explanation for the development of SILs in the upper alimentary tract of cattle.

Introduction

Two factors have been related to the pathogenesis of bovine squamous cell carcinomas (SCC) of the upper digestive tract (UDT) of cattle: bracken fern (*Pteridium aquilinum*) toxicity and bovine papillomavirus type-4 (BPV-4) infection (Evans and Mason, 1965; Jarrett *et al.*, 1978b; Campo *et al.*, 1980). The tumours only occur in cattle grazing on bracken fern highly contaminated areas (Döbereiner *et al.*, 1967; Jarrett, 1978). Extensive papillomatosis in the UDT is common in these same animals (Döbereiner *et al.*, 1967; Jarrett, 1980; Gava *et al.*, 2002; Borzacchiello *et al.*, 2003).

Bracken fern is the only known plant that naturally causes cancer in animals (Yamada *et al.*, 2007). Ptaquiloside (Hirono *et al.*, 1984; Yamada *et al.*, 2007) and quercetin (Bjeldanes and Chang, 1977; Lioi *et al.*, 2004) are the most important carcinogenic compounds of the plant leading to the development of neoplasms in several animal species (Evans and Mason, 1965; Pamukcu and Price, 1969; Pamukcu *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 1988; Shahin *et al.*, 1998).

The relationship between BPV-4 and the carcinogenic compounds of bracken fern in the development of SCCs of the UDT of cattle has been studied *in vivo* and *in vitro* (Pennie and Campo, 1992; Campo *et al.*, 1994; Connolly *et al.*, 1998; Campo, 2002). According to these studies, the BPV-4 infects the mucosa of the UDT, expresses its transforming proteins and induces the formation of papilloma (Jarrett *et al.*, 1978a; Campo *et al.*, 1980). In cattle grazing on bracken fern, it was hypothesized that papillomas are a vastly expanded target for chemical carcinogens by the interaction between viral proteins and bracken carcinogens, such as quercetin (Bjeldanes and Chang, 1977; Campo *et al.*, 1994). Some of these transforming events have been shown *in vitro*, but it remains to be established *in vivo* (Campo, 2002).

The actual involvement of BPV-4 in the development of SCCs in cattle grazing on bracken fern areas is still somehow not fully defined. Bovine papillomavirus DNA has been identified in a few cases of well-established SCCs (Campo *et al.*, 1980; Campo *et al.*, 1985). High-risk human papillomaviruses (mostly HPV-16 and -18) have been recovered from almost all cases of uterine cervical cancer (Walboomers *et al.*, 1999; Bohmer *et al.*, 2003). Some studies suggest that there might be a similar role of high-risk HPV in human head and

neck SCCs (Syrjanen, 2005). However, similarly to what is seen in bovine SCCs of the UDT of cattle, HPVs are recovered in a few cases of human head and neck cancer (Hobbs *et al.*, 2006; Torrente and Ojeda, 2007). Human head and neck SCCs are epidemiologically and experimentally related to chronic abuse of alcohol and tobacco (Muscat and Wynder, 1992; Maier and Tisch, 1997; Morse *et al.*, 2007; Seitz and Stickel, 2007). Interestingly, some human cases of gastric cancer are suspected of bracken fern involvement (Alonso-Amelot, 1997; Alonso-Amelot and Avendano, 2001; Alonso-Amelot and Avendano, 2002).

In papillomavirus- or chemically- induced cancers in humans, hyperplastic and dysplastic squamous intraepithelial lesions (SILs) arise preceding the formation of SCCs (Walboomers *et al.*, 1999; Gale *et al.*, 2005; Gale *et al.*, 2009). Dysplastic SILs were mentioned in a recent study of naturally occurring SCCs in cattle grazing on bracken fern in Brazil. They were found in the same regions of the UDT where papillomas and SCCs were observed (Souto *et al.*, 2006). Other studies on SCCs of the UDT of bovine grazing on bracken fern also presented similar gross and microscopic early lesions (Tokarnia *et al.*, 1969; Jarrett *et al.*, 1978b; Campo *et al.*, 1994)

The aim of the present study was to perform a criterious analysis of the morphology of papillomas, cancerous transforming papillomas, hyperplastic and dysplastic SILs observed within the UDT of cattle diagnosed with alimentary SCCs and grazing on pastures with a high content of bracken fern. This may result in important additional data to the establishment of the disease etiopathogenesis.

Material and methods

Three to five lesions were sampled from the oral, oesophageal and rumenal (entrance) mucosa of 60 necropsied bovines diagnosed with SCCs on the UDT. These animals had grazed for long periods of time on pastures with high levels of contamination with bracken fern (*P. aquilinum*). Necropsies were performed between years 2003 and 2009. All animals had at least one large neoplastic mass within the UDT, diagnosed as SCC, that was not the target of the present study. Grossly, the sampled lesions corresponded to mucosal wrinkles, small erosions and ulcers, nodules up to 0.5 cm in diameter, rugged plaques (Figs. 1A and 1B), and papillomatous lesions (Figs. 1C and 1D). All samples were fixed in 10% buffered formalin, processed routinely and stained with haematoxylin and eosin (HE).

Mucosal epithelial lesions were recorded as hyperplastic, dysplastic, or neoplastic. Papillomas were subdivided into four phases: a growing phase, a developing phase, a regressing phase (Hamada *et al.*, 1990), and a carcinomatous transforming phase (Jarrett, 1978; Campo, 1997). The main characteristics of each papillomatous phase are summarized on Table 1.

The presence of koilocytes (i.e., keratinocytes with eccentric pyknotic nuclei and a perinuclear halo observed at the upper spinous layer), indicative of papillomavirus infection (Goldschmidt and Hendrick, 2002), were recorded in each papillomatous lesion.

Hyperplastic and dysplastic SILs of the bovine UDT were categorized according to the latest World Health Organization (WHO) classification for human head and neck epithelial lesions (Gale *et al.*, 2005). The SILs ranged from squamous hyperplasia to mild, moderate or severe dysplasia and carcinoma *in situ*. The classification and characteristics of SILs are listed on Tables 2 and 3. Other small mucosal lesions were diagnosed as invasive SCCs in early stage of growth.

Results

All cattle of this study had a large spectrum of gross lesions distributed throughout the mucosa of the UDT (Fig. 1). Microscopically, 268 epithelial lesions were analyzed and were divided in 168 papillomatous lesions, 72 SILs and 28 invasive SCCs in initial phase of growth.

All four phases of papillomas were observed in the present study. Growing papillomas had mild epithelial cupped hyperplasia, with initial formation of rete ridges in the *lamina propria* (Fig. 2A). Developing papillomas had typical digitiform fronds with moderate to severe parakeratosis, anchored in a moderate collagenous stroma (Fig. 2B). Regressing papillomas were composed of attenuated fronds with accentuation of rete ridges formation and moderate to severe infiltrate of lymphocytes (Fig. 2C). Carcinomatous transforming papillomas also had typical papillomatous fronds with carcinomatous formations invading the subjacent lamina propria (Fig. 2D). There were moderate nuclear and cellular pleomorphism, with dyskeratosis and keratin pearls. Mild to moderate lymphocytic inflammatory infiltrate was also observed in carcinomatous transforming papillomas. The distribution of each papillomatous lesion, according to the phases of growth and transformation, and the presence of koilocytes are demonstrated on Table 4.

More than 54% of all papillomatous lesions were in the developing phase. Only 9% were regressing papillomas. Growing and carcinomatous transforming papillomas were observed in approximately 18,5% of all papillomatous lesions each. Koilocytes were observed in more than 90% of papillomas in the developing and transforming phases. Less than 20% of growing papillomas had koilocytes.

Squamous hyperplasia described in this study was present as focal patches of increased prickle layer (Fig. 3A). When architectural disturbance was accompanied by cellular atypia, those lesions were categorized as dysplasia. Lesions categorized as mild dysplasia had architectural disturbance limited to the lower third of the epithelium, accompanied by mild cellular atypia (Fig. 3B). In each case of mild dysplasia of the present study, basal and parabasal cell layers were proliferated. In moderate dysplastic lesions, the initial criteria utilized to recognize this category was the architectural disturbance extending into the middle third of the epithelium. In these cases, cellular atypia was more pronounced and more frequent than in mild dysplasia (Fig. 3C). The recognition of severe dysplasia started with more than two-thirds of the epithelium showing architectural disturbance with associated severe cellular atypia. In all cases of severe dysplasia, there were loss of stratification or maturation of the epithelium, drop-shaped rete ridges, increased number of mitosis and dyskeratotic cells (Fig 3D). Samples categorized as carcinoma *in situ* had full thickness architectural abnormalities and pronounced cellular atypia. In the present study, carcinoma *in situ* had atypical mitotic figures and abnormal superficial mitosis, with dyskeratosis and/or keratin pearls without evidences of invasion of the lamina propria (Fig. 4A). The distribution of hyperplastic and dysplastic SILs are on Table 5.

Approximately one third of all epithelial non-papillomatous samples were squamous hyperplasia or mild dysplasia. Moderate and severe dysplasia and carcinoma *in situ* were observed in about 70% of the SILs. All cases of moderate to severe dysplasia and carcinoma *in situ* were accompanied by moderate lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate.

Some gross nodular lesions with 0,1-0,3 cm in diameter, revealed invasive SCCs in initial stage of growth (Fig. 4B). They were observed in 28 epithelial samples. In these cases, groups or small islands of neoplastic keratinocytes were observed invading the subjacent lamina propria, frequently accompanied by lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate.

Discussion

All bovines of the present study had SCCs within the UDT and were grazing on highly contaminated areas with bracken fern. They all had papillomas in diverse stages of development, transforming papillomas, SILs and small foci of SCCs. The etiopathogenesis of these lesions will be discussed hereafter.

A possible pathogenesis for the development of SCCs of the UDT of cattle was established after the publication of an experimental study in 1994 (Campo *et al.*, 1994; Campo, 2002). Theoretically, the papillomas induced by BPV-4 would serve as an expanded target for bracken carcinogens, giving rise to SCCs (Campo *et al.*, 1994). The results of the present study may demonstrate that this papilloma-carcinoma syndrome might not be the only pathway for the development of bovine alimentary SCCs.

Alimentary papillomatosis, characterized by papillomas spread throughout the UDT (Tsirimonaki *et al.*, 2003), was observed in the animals of the present study. This lesion in cattle is rare and it is observed in specific cases of immunosuppression (Duncan *et al.*, 1975; Jarrett *et al.*, 1978a), such as iatrogenic administration of azathioprine (Campo *et al.*, 1994) and chronic poisoning by bracken fern (Döbereiner *et al.*, 1967; Jarrett *et al.*, 1978b; Souto *et al.*, 2006). In the present study, the majority of papillomas corresponded to growing and developing papillomas. A few papillomatous lesions were regressing papillomas, supporting the role of bracken fern carcinogens on its maintenance.

Papillomas undergoing carcinomatous transformation, like the ones observed in the present study, are the morphologic evidence for the involvement of papilloma as a target for bracken carcinogens (Jarrett, 1978; Campo *et al.*, 1994). Quercetin has been pointed out as the major bracken fern carcinogen (Bjeldanes and Chang, 1977) that interacts with papillomavirus oncoproteins (Pennie and Campo, 1992; Cairney and Campo, 1995; Connolly *et al.*, 1998; Beniston *et al.*, 2001). The result of such interaction is the activation of the *H-ras* gene (Campo *et al.*, 1990) and the mutation of the *p53* gene (Beniston *et al.*, 2001), leading to oncogenic cellular transformation. An interesting finding of the present study was the expressive percentage of carcinomatous transforming papillomas with koilocytes, significantly similar to the percentage observed in developing papillomas. This data supports the molecular evidence that bracken carcinogens might be involved in the activation/inhibition of important papillomaviral genes (Anderson *et al.*, 1997; Connolly *et al.*, 1998). Quercetin would act raising the expression of viral oncogenes through the up-regulation of the long control region (LCR) transcriptional activity, contributing further to cellular transformation (Connolly *et al.*, 1998). Although transforming papillomas were

significantly found in the present study, other epithelial non-papillomatous lesions were also observed.

Transition from a normal epithelium to SCC is a lengthy, comprehensive and multi-stage process, causally related to progressive accumulation of genetic changes and the selection of a clonal population of transformed epithelial cells (Braakhuis *et al.*, 2002; Gale *et al.*, 2009). The whole spectrum of histological changes occurring in this process has been designated as SILs in human patients (Gale *et al.*, 2005). In the evolution of SILs, some lesions are self-limited and reversible, some persist, and some progress to SCC (Gale *et al.*, 2009).

Hyperplastic and dysplastic SILs were observed in 72 epithelial samples of the UDT mucosa. Approximately 70% of all SILs were composed of pre-malignant to malignant lesions (moderate to severe dysplasia and carcinoma *in situ*) that potentially could give rise to invasive SCCs (Gale *et al.*, 2009). These potentially malignant and non-invasive malignant epithelial histomorphologic alterations may represent important findings to the establishment of the pathogenesis of SCCs in cattle grazing on bracken fern. Also, small foci of SCCs in initial phase of growth (smaller than 0.5 cm) found throughout the UDT epithelium did not seem to be passing through a papillomatous stage. Those lesions may have arisen *in situ* in the epithelium due to malignant progression of SILs and/or *de novo* growth.

In humans, SILs are frequently observed in the upper aerodigestive tract and in the cervical uterine epithelium (Woodman *et al.*, 2007; Jayshree *et al.*, 2009). They are morphologically similar to the lesions observed in the present study, and they are categorized under the same histopathologic criteria used for the present study. In women uterine cervix, SILs are mainly attributed to high-risk HPVs (Walboomers *et al.*, 1999; Bohmer *et al.*, 2003). However, epidemiologic and molecular studies did not support entirely the involvement of HPV in human head and neck SILs and SCCs (Gale *et al.*, 2005). In fact, they are strongly related to chemical carcinogenesis by chronic abuse of alcohol and tobacco (Gale *et al.*, 2005; Morse *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2010).

The BPV-4 DNA has been detected in a very few cases of bovine digestive SCCs (Campo *et al.*, 1985; Campo *et al.*, 1994). Although some experimental, morphologic and molecular evidences support the papilloma-carcinoma syndrome hypothesis, the BPV-4 gene lacks the open reading frame E6, defined as the major oncogene for malignant cell transformation in high-risk HPVs (Scobie *et al.*, 1997; Moody and Laimins, 2010). The causal relationship between BPV-4 and bracken fern still remains obscure (Campo, 1997).

Carcinogens of bracken fern induce tumours in several animal species (Evans and Mason, 1965; Pamukcu and Price, 1969; Hirono *et al.*, 1973; Smith *et al.*, 1988; Shahin *et al.*, 1998). Development of chemically induced lesions by bracken fern carcinogens (without passing through a papilloma stage) may be a plausible explanation for some SILs and SCCs in bovine chronically and spontaneously poisoned by bracken fern. The presence of multiple SILs and SCC in early stages of development in a same bovine was a very common finding in this study.

In 1953, Slaughter *et al.* proposed the clinical concept of “field cancerization” to explain the pathogenesis of multiple SILs and SCCs in the upper aerodigestive tract of smoking people. The concept was based on chemical exposure for long period of time leading to the development of multiple independent malignant transforming areas (Slaughter *et al.*, 1953). More recently, three hypotheses try to explain the development of such SILs: formation of multiple sites with independent genetic cellular anomalies, metastatic implantation via saliva or intraepithelial migration of malignant progenitor cells (van Oijen and Slootweg, 2000; Braakhuis *et al.*, 2002). Based on morphological evidences of the present study, the field cancerization hypothesis could be applied in the pathogenesis of digestive SCCs in cattle grazing for long periods of time on bracken fern.

In the present study, it is possible that the formation of bovine alimentary SILs could be related to the carcinogenic induction of multiple foci with independent malignant cell transformation. This hypothesis can be supported by two major chemically-based evidences: pH-dependent activation of ptaquiloside and the combined presence of neoplasias in the UDT and in the urinary bladder of bovines chronically and spontaneously poisoned by bracken fern. The potent direct-acting carcinogen/mutagen dienone is formed when ptaquiloside is submitted to alkaline conditions (Vanderhoeven *et al.*, 1984; Potter and Baird, 2000; Yamada *et al.*, 2007). Epithelial lesions are frequently observed in the UDT and in the urinary bladder of bovines chronically exposed to bracken fern (Peixoto *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006; Gabriel *et al.*, 2009; Roperto *et al.*, 2010). Multifocal transformation of these epithelia could be induced by chronic exposure to the potent activated carcinogen by saliva (pH 8.1-8.2) or urine (pH 7.5-8.5) (Fenwick, 1989). Exposure to non-contiguous epithelia, like the UDT and urinary bladder, and formation of tumours are unlikely to be clonally related and they do not represent metastatic spread. Rather than, they are indicators of the degree of carcinogen exposure or general organism-wide susceptibility to carcinogenesis (Ha and Califano, 2003). These chemically-based evidences supports the concept that a group of carcinogens can,

simultaneously, affect multiple epithelia when systemically metabolized (Ha and Califano, 2003).

In conclusion, the presence of digestive papillomatosis and mostly of carcinomatous transforming papillomas simultaneously with well developed SCCs in the UDT is in agreement with the papilloma-carcinoma syndrome theory. However, the marked presence of SILs and early stage invasive SCCs point out to another pathway to the development of SCCs of the UDT in cattle chronically poisoned by bracken fern. Although a role for the BPV-4 oncoproteins in the development of SILs (with great likelihood of progression to SCCs) cannot be disregarded, the results of the present study might indicate that direct-acting carcinogens of bracken fern might represent an alternate etiopathogenetic route for the development of SCCs in cattle.

Acknowledgements

Authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support (Grant # 478692/2007-2). G.D. Kommers has a fellowship (CNPq-PQ) from CNPq. F.B. Rosa has a scholarship (PIBIC/UFMS) from CNPq. E.K. Masuda has a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Alonso-Amelot ME. (1997). The link between bracken fern and stomach cancer: milk. *Nutrition*, **13**, 694-696.
- Alonso-Amelot ME, Avendano M. (2001). Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *International Journal of Cancer*, **91**, 252-259.
- Alonso-Amelot ME, Avendano M. (2002). Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Current Medicinal Chemistry*, **9**, 675-686.

- Anderson RA, Scobie L, O'Neil BW, Grindlay GJ, Campo MS. (1997). Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours. *Veterinary Journal*, **154**, 69-78.
- Beniston RG, Morgan IM, O'Brien V, Campo MS. (2001). Quercetin, E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. *Carcinogenesis*, **22**, 1069-1076.
- Bjeldanes LF, Chang GW. (1977). Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, **197**, 577-578.
- Bohmer G, van den Brule AJ, Brummer O, Meijer CL, Petry KU. (2003). No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **189**, 118-120.
- Borzacchiello G, Ambrosio V, Roperto S, Poggiali F, Tsirimonakis E *et al.* (2003). Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. *Journal of Comparative Pathology*, **128**, 203-206.
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB *et al.* (2002). Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head & Neck*, **24**, 198-206.
- Cairney M, Campo MS. (1995). The synergism between bovine papillomavirus type 4 and quercetin is dependent on the timing of exposure. *Carcinogenesis*, **16**, 1997-2001.
- Campo M, Moar MH, Jarrett WF, Laird HM. (1980). A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. *Nature*, **286**, 180-182.
- Campo MS. (1997). Bovine papillomavirus and cancer. *Veterinary Journal*, **154**, 175-188.
- Campo MS. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research*, **89**, 249-261.

- Campo MS, McCaffery RE, Doherty I, Kennedy IM, Jarrett WF. (1990). The Harvey ras 1 gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the upper alimentary canal in cattle. *Oncogene*, **5**, 303-308.
- Campo MS, Moar MH, Sartirana ML, Kennedy IM, Jarrett WF. (1985). 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*, **4**, 1819-1825.
- Campo MS, O'Neil BW, Barron RJ, Jarrett WF. (1994). Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. *Carcinogenesis*, **15**, 1597-1601.
- Carvalho T, Pinto C, Peleteiro MC. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *Journal of Comparative Pathology*, **134**, 336-346.
- Connolly JA, Morgan IM, Jackson ME, Campo MS. (1998). The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. *Oncogene*, **16**, 2739-2746.
- Döbereiner J, Tokarnia CH, Canella CFC. (1967). Ocorrência de hematuria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **2**, 489-504.
- Duncan JR, Corbeil LB, Davies DH, Schultz RD, Whitlock RH. (1975). Persistent papillomatosis associated with immunodeficiency. *The Cornell Veterinarian*, **65**, 205-211.
- Evans IA, Mason J. (1965). Carcinogenic activity of bracken. *Nature*, **208**, 913-914.
- Fenwick GR. (1989). Bracken (Pteridium-Aquilinum) - Toxic Effects and Toxic Constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **46**, 147-173.

- Gabriel AL, Kommers GD, Masuda EK, Figuera RA, Piazer JVM *et al.* (2009). Clinical and hematological aspects and urinary bladder lesions in chronic spontaneous poisoning by *Pteridium aquilinum* in cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **29**, 515-525.
- Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N *et al.* (2009). Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology*, **54**, 639-656.
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. (2005). *Pathology and genetics of head and neck tumours*. IARC Press, Lyon, France, pp. 430.
- Gava A, Neves DD, Gava D, Saliba TD, Schild AL *et al.* (2002). Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in southern Brazil. *Veterinary and Human Toxicology*, **44**, 362-365.
- Goldschmidt MH, Hendrick MJ. (2002). Tumours of the skin and soft tissues. In: *Tumours in domestic animals*, DJ Meuten, Ed, Iowa State Press, Iowa, EUA, pp. 45-118.
- Ha PK, Califano JA. (2003). The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **14**, 363-369.
- Hamada M, Oyamada T, Yoshikawa H, Yoshikawa T, Itakura C. (1990). Histopathological development of equine cutaneous papillomas. *Journal of Comparative Pathology*, **102**, 393-403.
- Hirono I, Fushimi K, Mori H, Miwa T, Haga M. (1973). Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. *Journal of the National Cancer Institute*, **50**, 1367-1371.
- Hirono I, Kono Y, Takahashi K, Yamada K, Niwa H *et al.* (1984). Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. *Veterinary Record*, **115**, 375-378.

- Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA *et al.* (2006). Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Otolaryngology*, **31**, 259-266.
- Jarrett WF. (1978). Transformation of warts to malignancy in alimentary carcinoma in cattle. *Bulletin of Cancer*, **65**, 191-194.
- Jarrett WF. (1980). Bracken fern and papilloma virus in bovine alimentary cancer. *British Medical Bulletin*, **36**, 79-81.
- Jarrett WF, Murphy J, O'Neil BW, Laird HM. (1978a). Virus-induced papillomas of the alimentary tract of cattle. *International Journal of Cancer*, **22**, 323-328.
- Jarrett WF, Mcneil PE, Grimshaw WTR, Selman IE, McIntyre WIM. (1978b). High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma-virus. *Nature*, **274**, 215-217.
- Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. (2009). Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *The Indian Journal of Medical Research*, **130**, 286-295.
- Lioi MB, Barbieri R, Borzacchiello G, Dezzi S, Roperto S *et al.* (2004). Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. *Journal of Comparative Pathology*, **131**, 233-236.
- Maier H, Tisch M. (1997). Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. *Acta Oto-laryngologica. Supplementum*, **527**, 160-164.
- Moody CA, Laimins LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews. Cancer*, **10**, 550-560.
- Morita M, Kumashiro R, Kubo N, Nakashima Y, Yoshida R *et al.* (2010). Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. *International Journal of Clinical Oncology*, **15**, 126-134.

- Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, Cohen D, Mohit-Tabatabai M *et al.* (2007). Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes & Control*, **18**, 919-929.
- Muscat JE, Wynder EL. (1992). Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. *Cancer*, **69**, 2244-2251.
- Pamukcu AM, Price JM. (1969). Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Journal of the National Cancer Institute*, **43**, 275-281.
- Pamukcu AM, Yalciner S, Hatcher JF, Bryan GT. (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research*, **40**, 3468-3472.
- Peixoto PV, França TdN, Barros CSL, Tokarnia CH. (2003). Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **23**, 65-81.
- Pennie WD, Campo MS. (1992). Synergism between bovine papillomavirus type-4 and the flavonoid quercetin in cell-transformation in vitro. *Virology*, **190**, 861-865.
- Potter DM, Baird MS. (2000). Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. *British Journal of Cancer*, **83**, 914-920.
- Roperto S, Borzacchiello G, Brun R, Leonardi L, Maiolino P *et al.* (2010). A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. *Journal of Comparative Pathology*, **142**, 95-108.
- Scobie L, Jackson ME, Campo MS. (1997). The role of exogenous p53 and E6 oncoproteins in in vitro transformation by bovine papillomavirus type 4 (BPV-4): significance of the absence of an E6 ORF in the BPV-4 genome. *The Journal of General Virology*, **78**, 3001-3008.

- Seitz HK, Stickel F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, **7**, 599-612.
- Shahin M, Smith BL, Worrall S, Moore MR, Seawright AA *et al.* (1998). Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNF alpha levels, and mammary gland carcinoma in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **244**, 192-197.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, **6**, 963-968.
- Smith BL, Embling PP, Agnew MP, Lauren DR, Holland PT. (1988). Carcinogenicity of bracken fern (*Pteridium esculentum*) in New Zealand. *The New Zealand Veterinary Journal*, **36**, 56-58.
- Souto MAM, Kommers GD, Barros CSL, Piazer JVM, Rech RR *et al.* (2006). Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **26**, 112-122.
- Syrjanen S. (2005). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology*, **32 Suppl 1**, S59-66.
- Tokarnia CH, Döbereiner J, Canella CFC. (1969). Ocorrência de hematúria enzoótica e carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. II. Estudos complementares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **4**, 209-224.
- Torrente MC, Ojeda JM. (2007). Exploring the relation between human papilloma virus and larynx cancer. *Acta Oto-laryngologica*, **127**, 900-906.
- Tsirimonaki E, O'Neil BW, Williams R, Campo MS. (2003). Extensive papillomatosis of the bovine upper gastrointestinal tract. *Journal of Comparative Pathology*, **129**, 93-99.
- van Oijen MG, Slootweg PJ. (2000). Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **9**, 249-256.

Vanderhoeven JCM, Lagerweij WJ, Jongen WMF, Posthumus MA, Vanveldhuizen A *et al.* (1984). Aquilide-a, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*) (L) Kuhn. *Mutation Research*, **130**, 241-241.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA *et al.* (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, **189**, 12-19.

Woodman CB, Collins SI, Young LS. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews. Cancer*, **7**, 11-22.

Yamada K, Ojika M, Kigoshi H. (2007). Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Natural Products Report*, **24**, 798-813.

Table 1 – Histopathologic criteria of each phase of the papilloma development.

<i>Papillomatous phase</i>	<i>Histopathologic criteria</i>
Growing*	Hyperplasia of the basal cells, mild to moderate acanthosis and mild to moderate hyper- to parakeratosis.
Developing*	Prominent acanthosis, cellular swelling and fusion and marked hyper- to parakeratosis.
Regressing*	Slight epithelial hyperplasia. Accentuation of the rete peg proliferation downward into the lamina propria, moderate proliferation of fibroblasts and collagen fibres with an infiltrate of lymphocytes at the epithelial-lamina propria interface.
Carcinomatous transforming [†]	Irregularity of the lower edge of epithelium, early neoplastic squamous transformation characterized by dyskeratosis, keratin pearls, mild cellular pleomorphism and invasion of subjacent tissues.

Source: adapted from *Hamada et al. (1990) and [†]Jarret (1978).

Table 2 – Histopathologic classification and criteria for squamous intraepithelial lesions (SILs) according to the World Health Organization (WHO) classification for human head and neck epithelial lesions.

<i>SIL</i>	<i>Histopathologic criteria</i>
Squamous hyperplasia	Increased number of cells in the spinous layer (acanthosis) and/or in the basal/parabasal cell layers (basal cell hyperplasia); the architecture shows regular stratification without cellular atypia
Mild dysplasia	The architectural disturbance is limited to the lower third of the epithelium accompanied by mild cellular atypia
Moderate dysplasia	The architectural disturbance extends into the middle third of the epithelium with moderate cellular atypia.
Severe dysplasia	The architectural disturbance involves more than two thirds of the epithelium with severe cellular atypia.
Carcinoma <i>in situ</i>	Full thickness or almost full thickness architectural disturbance in the viable cell layers accompanied by pronounced cellular atypia

Source: Gale *et al.* (2005)

Table 3 – Criteria used for diagnosing dysplasia according to the World Health Organization (WHO) classification for human head and neck epithelial lesions.

<i>Architectural disturbance</i>	<i>Cellular atypia</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Irregular epithelial stratification • Loss of polarity of basal cells • Drop-shaped rete ridges • Increased number of mitotic figures • Abnormal superficial mitoses • Premature individual cell keratinization (dyskeratosis) • Keratin pearls within rete pegs 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal variation in nuclear size (anisonucleosis) • Abnormal variation in nuclear shape (nuclear pleomorphism) • Abnormal variation in cell size (anisocytosis) • Abnormal variation in cell shape (cellular pleomorphism) • Increased nuclear-cytoplasmic ratio • Increased nuclear size • Atypical mitotic figures • Increased number and size of nucleoli • Hyperchromasia

Source: Gale *et al.* (2005)

Table 4 – Histopathologic classification and distribution of papillomatous lesions and the percentage of cases with koilocytes.

<i>Type</i>	<i>Classification</i>	<i>Amount</i>	<i>Koilocytes (%)</i>
Papillomas (N=168)	Growing phase	31	6 (19)
	Developing phase	92	83 (90)
	Regressing phase	15	10 (67)
	Carcinomatous transforming phase	30	28 (93)

Table 5 – Histopathologic classification and distribution of squamous intraepithelial lesions (SILs).

<i>Type</i>	<i>Classification</i>	<i>Amount (%)</i>
Squamous intraepithelial lesions (N=72)	Squamous hyperplasia	10 (14%)
	Mild dysplasia	12 (17%)
	Moderate dysplasia	20 (28%)
	Severe dysplasia	22 (31%)
	Carcinoma <i>in situ</i>	8 (11%)

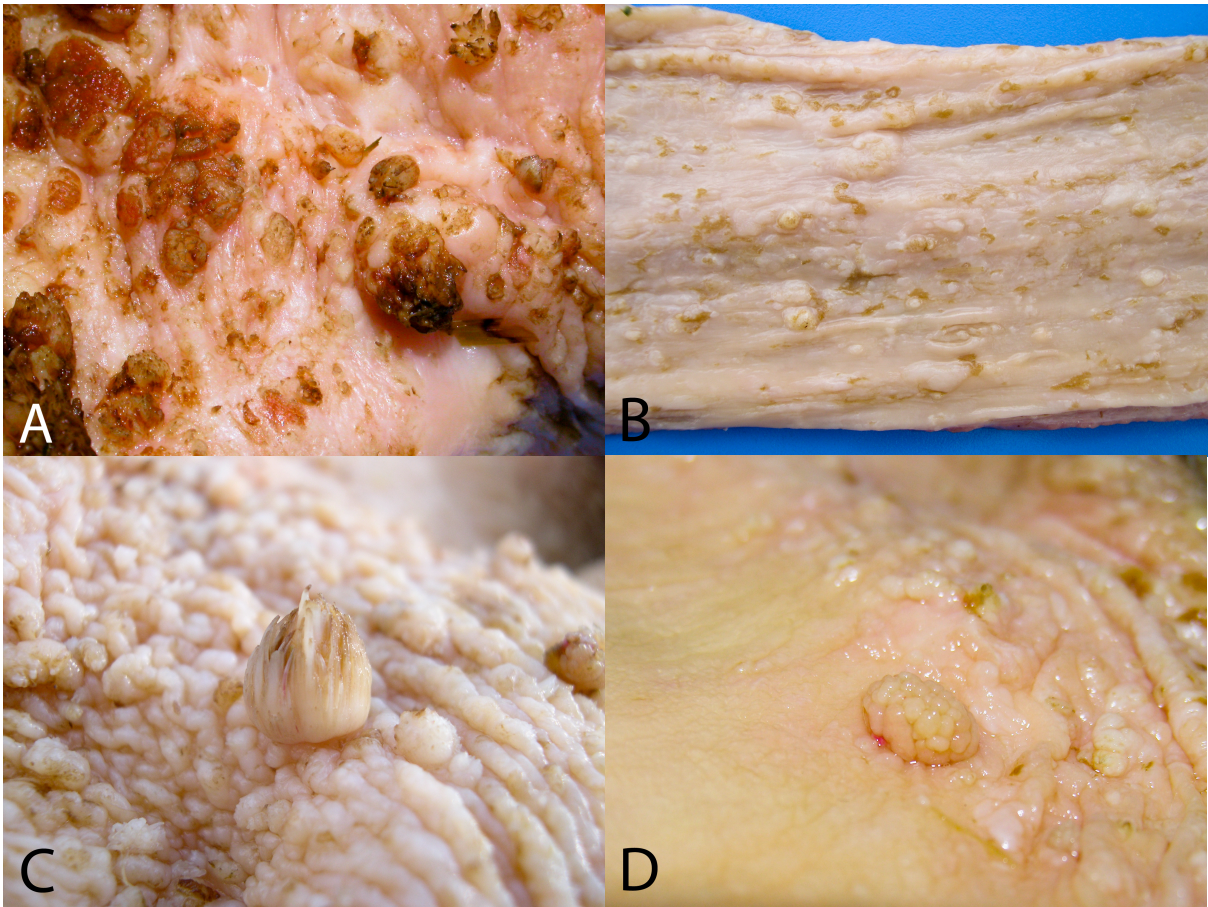


Fig. 1. Gross lesions observed in cattle with squamous cell carcinoma of the upper digestive tract and grazing on bracken fern. (A) Pharynx. There are numerous papillomatous lesions, small erosions and ulcers and nodules up to 0.5 cm in diameter. (B) Oesophagus. Multiple small nodules, rugged plaques and erosions are seen throughout the whole oesophageal epithelium. (C) Rumen entrance. Developing papilloma with marked digitiform keratinized frond. (D) Entrance of the rumen. A carcinomatous transforming papilloma with attenuation of the papillomatous fronds is observed in the epithelium.

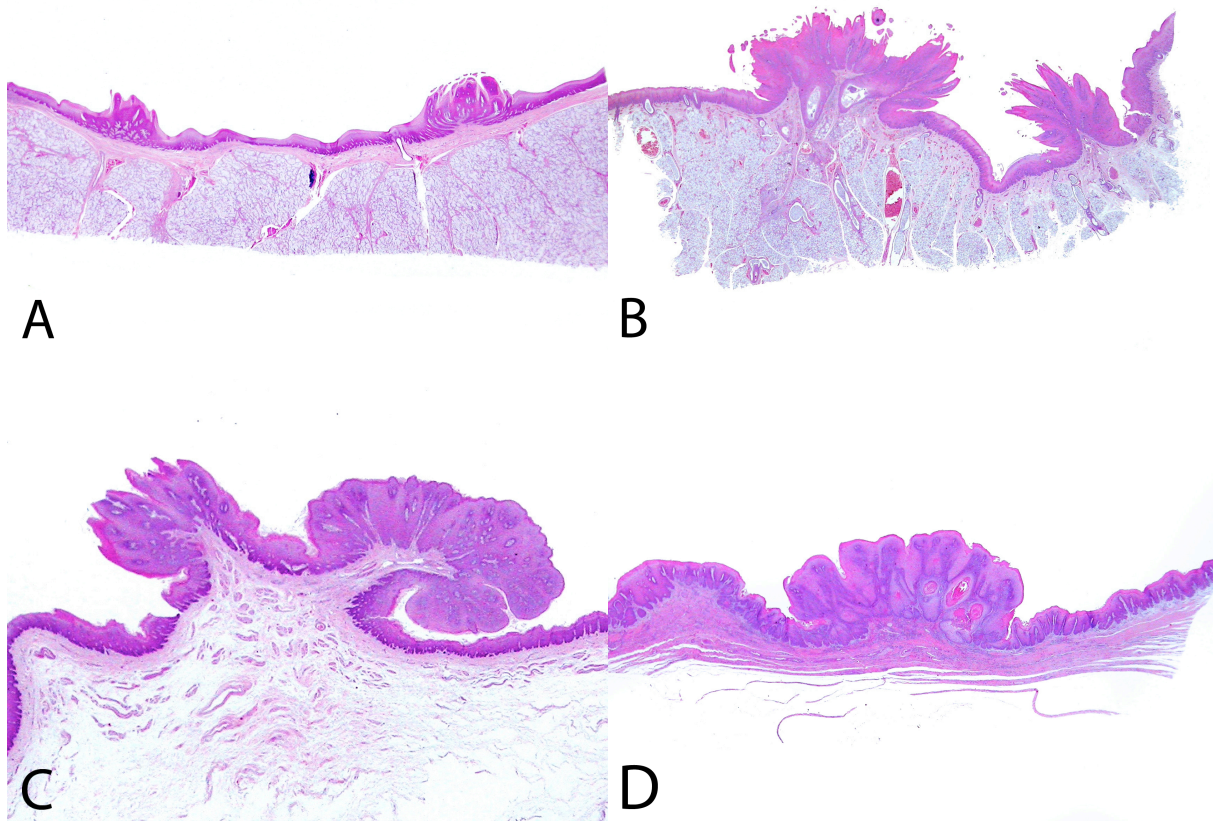


Fig. 2. Papillomatous stages. (A) Growing papillomas. (B) Developing papillomas. (C) Regressing papillomas. (D) Carcinomatous transforming papilloma. Haematoxylin and eosin. Objective, 2.5x.