



TANIA MARIA PEREIRA ALVARENGA

**AVALIAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA DE
RATOS ALIMENTADOS COM QUEIJO DE
LEITE DE VACAS QUE CONSUMIAM
*Pterídium aquilinum***

**LAVRAS – MG
2015**

TANIA MARIA PEREIRA ALVARENGA

**AVALIAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA DE RATOS ALIMENTADOS
COM QUEIJO DE LEITE DE VACAS QUE CONSUMIAM
*Pterídium aquilinum***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ciência dos Alimentos da Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-graduação
em Ciência dos Alimentos, para a obtenção
do título de mestre.

Orientador
Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Coorientadora
Dra. Josilene Nascimento Seixas

**LAVRAS – MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio (a) autor (a).

Alvarenga, Tania Maria Pereira.

Avaliação clinicopatológica de ratos alimentados com queijo de
leite de vacas que consumiam *Pteridium aquilinum* / Tania Maria
Pereira Alvarenga. – Lavras: UFLA, 2015.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador (a): Luiz Ronaldo de Abreu.

Bibliografia.

1. Samambaia. 2. Neoplasia. 3. Leite. 4. *Ptaquilosídeo*. 5.
Carcinógenos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

TANIA MARIA PEREIRA ALVARENGA

**AVALIAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA DE RATOS ALIMENTADOS
COM QUEIJO DE LEITE DE VACAS QUE CONSUMIAM
*Pterídium aquilinum***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ciência dos Alimentos da Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-graduação
em Ciência dos Alimentos, para a obtenção
do título de mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro 2015.

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	DCA
Dra. Josilene Nascimento Seixas	DSA
Dr. Fladimir Wouters	DMV

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu
Orientador

Dra. Josilene Nascimento Seixas
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2015**

A melhor forma de prever o futuro é criá-lo.
(Peter Druker)

À minha netinha Kaylane, como incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos Departamentos de Medicina Veterinária e de Ciência dos Alimentos, por me acolher como servidora e conceder oportunidades.

Ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência dos Alimentos, por me receber e permitir a execução deste trabalho.

À Fapemig, pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Luiz Ronaldo de Abreu, pela confiança e orientação, pessoa a quem tenho imenso respeito e admiração.

À Prof. Josilene Nascimento Seixas, pela orientação, amizade e confiança em dividir comigo o seu sonho de realização deste projeto.

Ao Prof. Fladimir Wouters, pela colaboração e por se mostrar sempre atencioso e disposto a nos ajudar.

Aos professores Raimundo, Flamarion e Adriana Coutinho pelo apoio, incentivo e atenção que sempre me dispensaram desde a graduação.

Aos colaboradores Álvaro, Ana Maria, Bruno e Marcos, pelo apoio durante a realização do experimento e ao Willian, técnico do Biotério, pela amizade e contribuição durante o ensaio com os ratos.

À Anaise Emanuele Resende, pela disposição, apoio e colaboração que foram fundamentais para execução deste trabalho e também pelo carinho e amizade.

Aos técnicos Tiãozinho e Reginaldo pela ajuda, de domingo a domingo durante o período de ordenha das vacas e processamento da samambaia.

Aos meus queridos amigos, Prof. Francisco Duque de Mesquita Neto (Chico), e Dr. Cláudio Póries Próspera, pela colaboração, por estarem sempre presentes na minha vida e pela frase “calma, tudo vai se resolver”.

À minha amiga, técnica do Laboratório de Laticínios, Creuza P. do A. Resende, pelos ensinamentos e constante ajuda durante a fabricação dos queijos.

Ao Cassio Ribeiro Gomide, amigo e colega de trabalho no Laboratório de Patologia Clínica, pelo suporte e compreensão.

Ao José Rodrigues, técnico do laboratório de Patologia, pela colaboração no preparo das lâminas.

Ao Sr. Luiz, meu pai, homem humilde, bondoso, paciente e à minha mãe, Dona Dóra, mulher guerreira e corajosa que juntos me deram a oportunidade da vida e me ensinaram a amar e lutar. (*in memoriam*). “A saudade é nossa alma dizendo para onde ela quer voltar.” (Rubem Alves).

Aos meus amados filhos, Douglas Phillipe e Célia Cristina, porque são a luz da minha vida e ao meu genro Alisson, por colaborar em todas as ocasiões.

À minha netinha Kaylane, pelos beijinhos, carinhos e sorrisos que me aquecem a alma. “Princesinha eu te amo profundamente.”

Ao querido sargento Fabi, pelo carinho, incentivo e principalmente pelas orações que me fortalecem.

“Muito obrigada.”

Meu DEUS, tu tens me dado tanto! Mas, posso pedir-te só mais uma coisa?
Abençoe a todos que colaboraram com este trabalho assim como àqueles que não o fizeram.

RESUMO GERAL

Pteridium ssp, pluma, feto, samambaia do campo ou simplesmente samambaia, como é conhecida popularmente, é uma planta tóxica capaz de promover diferentes quadros clínicos em diversas espécies animais, além de ser considerada potencial fonte carcinogênica para o homem. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os reais riscos de manifestações clínicas e patológicas em ratos alimentados com queijo fabricado com leite de vacas que consumiam quantidades conhecidas de samambaia (*Pteridium aquilinum*). Desta forma, utilizaram-se vacas saudáveis, que consumiam 2 ou 6g/kg/dia de samambaia, para a coleta do leite e posterior produção de queijo que foi adicionado (30%) à dieta de ratos por um período de 176 dias. A ausência de manifestações clínicas, alterações hematológicas e urinárias evidenciam que o consumo da planta nas doses fornecidas durante o período estudado (29 e 36 dias) não foi suficiente para promover alterações clínicas ou patológicas detectáveis, nem sequer interferiram na produção de leite das vacas. A adição do queijo na dieta não diminuiu a palatabilidade da ração que foi bem aceita pelos ratos e não interferiu no crescimento e ganho de peso dos animais. Os ratos tratados não apresentaram lesões macroscópicas nos órgãos analisados, porém apresentaram lesões histopatológicas no estômago, intestinos e bexiga, que podem ser consideradas precursoras de neoplasia e indicadoras da ação carcinogênica da samambaia.

Palavras-chave: Samambaia. Neoplasia. Leite. Ptaquilosídeo. Carcinógenos.

GENERAL ABSTRACT

Pteridium ssp, plume, fern, bracken field or simply bracken, as it is popularly known, is a toxic plant capable of promoting different clinical conditions in several animal species besides being considered carcinogenic potential source for man. This study was carried out in order to assess the risks associated with clinical and pathological manifestations in rats fed with cheese made from milk cows that consumed amounts known as bracken (*Pteridium aquilinum*). Thus, it was used healthy cows, consuming 2 or 6 g/kg/day of fern, for collection of milk and subsequent production of cheese that was added (30%) the rats diet for a period of 176 days. The absence of clinical signs, hematological and urinary changes demonstrate that the consumption of the plant in the doses given during the study period (29 and 36 days) were not enough to promote clinical or pathological changes detectable, not even interfere in the cows' milk production. The addition of the cheese in the diet did not reduce the palatability of the feed that was well accepted by rats and did not affect the growth and weight gain of the animals. The treated rats showed no macroscopic lesions in the analyzed organs but had histopathological lesions in the stomach, intestines and bladder, that can be considered precursors of neoplasia and indicators of bracken carcinogenic action.

Keywords: Bracken. Neoplasia. Milk. Ptaquiloside. Carcinogens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1	<i>Pteridium aquilinum</i> . A. Pastagem invadida por <i>P. aquilinum</i> em Ibituruna, Minas Gerais. B. Broto da planta.....	19
Figura 2	Concentração de ptaquilosídeo nas diferentes partes da planta ($\mu\text{g/g}$).....	21
Figura 3	Transformação do ptaquilosídeo, em meio alcalino e meio ácido.....	22
Figura 4	Rotas da exposição humana ao princípio tóxico de <i>Pteridium aquilinum</i>	33
Figura 5	Broto de samambaia. A. Broto “in natura” vendido em feira-livre para consumo humano. B. Prato produzido com broto de samambaia cozido, conhecido como warabi.....	35
Quadro 1	Relação de estudos sobre a ação carcinogênica da samambaia (<i>P. aquilinum</i>) em ratos e camundongos.....	30

CAPÍTULO 3

Quadro 1	Relação de estudos sobre a ação carcinogênica da samambaia (<i>P. aquilinum</i>) em ratos e camundongos.....	67
Tabela 1	Consumo médio diário (gramas) da dieta disponibilizada e estimativa dos teores de ptaquilosídeo consumido.....	72
Tabela 2	Lesões histopatológicas observadas nos ratos que receberam as dietas experimentais.....	76
Figura 1	Ganho de peso dos ratos Wistar durante o período de consumo da dieta experimental.....	73
Figura 2	Estômago (porção não-glandular): 2A) Estômago normal (HE, obj. 20x); 2B) Hiperplasia acentuada com projeções epiteliais para a submucosa (HE, obj. 10x); 2C) Células da camada basal agrupadas na submucosa, sem continuidade com o epitélio de revestimento (HE, obj. 10x); 2D) Notar a desorganização do epitélio proliferado (HE, obj. 20x).....	75
Figura 3	Intestino: 3A) Intestino normal; 3B) Maior evidenciação do tecido fibro-vascular da lâmina própria e rarefação do tecido linfoide (HE, obj. 20x); 3C) Criptas com maior celularidade (HE, obj. 10x); 3D) Células linfoides picnóticas (HE, obj. 40x).....	75
Figura 4	Bexiga: 4A) Bexiga normal (HE, obj. 10x); 4B) Hiperplasia da mucosa e maior evidenciação do tecido fibro-vascular da lâmina própria (HE, obj. 20x); 4C) Mucosa com moderada anisocariose, com células trinucleadas (HE, obj. 40x); 4D) Hiperplasia focal moderada (HE, obj. 40x)	76

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	Introdução geral	15
1	INTRODUÇÃO		16
2	REFERENCIAL TEÓRICO		17
2.1	<i>Pteridium aquilinum</i>		17
2.1.1	Aspectos gerais e taxonômicos		17
2.1.2	Ocorrência da <i>Pteridium aquilinum</i> no Brasil		19
2.1.3	Princípios tóxicos		20
2.2	Condições em que ocorre a intoxicação animal		22
2.3	Doenças em animais provocadas pelo consumo do <i>Pteridium aquilinum</i>		23
2.3.1	Intoxicação natural		23
2.3.1.1	Diátese hemorrágica (DH)		24
2.3.1.2	Hematúria enzoótica bovina (HEB)		25
2.3.1.3	Carcinomas das vias digestivas superiores (CVDS)		25
2.3.1.4	Tumores intestinais (TI)		26
2.3.1.5	Deficiência de tiamina (DT)		26
2.3.1.6	Degeneração progressiva da retina (DPR)		26
2.3.2	Intoxicação experimental		27
2.3.2.1	Animais de produção		27
2.3.2.1.1	Bovinos		27
2.3.2.1.2	Equinos		28
2.3.2.1.3	Ovinos		28
2.3.2.2	Animais de laboratório		29
2.4	Riscos para a saúde humana		33
2.4.1	Consumo direto da planta		34
2.4.2	Contato físico com esporos e ingestão de água contaminada		35
2.4.3	Consumo de produtos provenientes de animais contaminados		36
2.4.4	Evidências epidemiológicas		36
	REFERÊNCIAS		38

CAPÍTULO 2 Avaliação clinicopatológica de vacas em lactação após ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium aquilinum*..... 49

1	INTRODUÇÃO	52
2	MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1	Coleta e secagem da samambaia	53
2.2	Animais	53
2.3	Manejo e dieta experimental	53
2.4	Avaliação clinicopatológica	54
3	RESULTADOS	55
3.1	Rendimento e consumo da planta	55
3.2	Achados clinicopatológicos	55
4	DISCUSSÃO	56
5	CONCLUSÃO	59
6	AGRADECIMENTO	59
	REFERÊNCIAS.....	60

CAPÍTULO 3 Lesões pré-neoplásicas em ratos alimentados com queijo de leite de vacas que consumiam *Pteridium arachnoideum*..... 62

1	INTRODUÇÃO	65
2	MATERIAL E MÉTODOS	70
3	RESULTADOS.....	72
4	DISCUSSÃO.....	77
5	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	83

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Pteridium ssp, popularmente conhecida como pluma, feto, samambaia do campo ou simplesmente samambaia, está presente na maioria das propriedades rurais do mundo e é considerada uma planta tóxica importante, não só por ter extensa distribuição, mas também pelos diferentes tipos de intoxicação que provoca em diversas espécies animais. O ptaquilosídeo é descrito como o princípio tóxico mais importante da planta, capaz de atuar como um agente cancerígeno.

Para a cadeia produtiva dos alimentos de origem animal são grandes as perdas resultantes da intoxicação por samambaia, as que resultam em descarte precoce dos bovinos, perda na produção leiteira e no valor da carne, gastos em assistência veterinária e na aplicação de herbicidas (quando o combate à planta é realizado), além de degradação das pastagens.

Estudos demonstraram que o ptaquilosídeo é liberado no leite de vacas que pastejam constantemente em áreas onde a samambaia está presente e que mesmo após o processo de pasteurização, parte permanece no leite. Existe correlação positiva entre a maior prevalência de câncer gástrico no homem em áreas invadidas pela samambaia (ALONSO-AMELOT; AVENDANO, 2002; VILLALOBOS-SALAZAR, 1985).

A realização de um estudo que contribua para esclarecer os reais perigos que a ingestão de leite e/ou produtos lácteos, provenientes de vacas que consomem samambaia possam oferecer à saúde é de extrema importância, uma vez que se sabe da correlação entre a doença que ocorre nos animais com os riscos à população humana.

Objetivou-se neste estudo avaliar as manifestações clínicas e patológicas em ratos alimentados com queijo fabricado com leite proveniente de vacas consumindo quantidade conhecida de samambaia (*Pteridium aquilinum*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Pteridium aquilinum*

Pteridium aquilinum, planta vascular sem semente (pteridófita), compõem o grupo das samambaias que são consideradas uma das cinco plantas mais bem sucedidas do reino vegetal (CRUZ; BRACENSE, 2004).

2.1.1 Aspectos gerais e taxonômicos

Embora existam controvérsias, anteriormente integrado à família Polypodiaceae, a espécie *Pteridium aquilinum*, apresentando 2 subespécies e diversas variedades (ALONSO-AMELOT, 1999), passou a pertencer à família Dennstaedtiaceae após a realização de estudos biomoleculares; algumas de suas variedades foram elevadas à condição de espécies, denominadas, a partir de então, *P. caudatum* e *P. arachnoideum* (THOMSON, 2000, 2004, 2008, 2012), conforme a classificação descrita abaixo.

Taxonomia antiga

Ordem: Filicales

Família: Polypodiaceae

Gênero: *Pteridium*

Espécie: *Pteridium aquilinum*

Subespécie: *aquilinum*

Subespécie: *caudatum*

Variedade: *arachnoideum*

Variedade: *caudatum*

Taxonomia atual

Ordem: Filicales

Família: Dennstaetiaceae

Gênero: *Pteridium*

Espécie: *Pteridium caudatum*

Pteridium arachnoideum

Em artigo de revisão, Hojo-Souza, Carneiro e Santos (2010), afirmam que estudos apontam para consolidação da nova taxonomia do gênero *Pteridium*, e que alguns autores já utilizam a nova nomenclatura. Considerando-se a divergência no sistema de classificação, ao longo dessa revisão adotou-se a taxonomia mais antiga, conforme feito por Tokarnia et al. (2012).

Pteridium aquilinum é uma planta bem sucedida em termos adaptativos, (RASMUSSEN, 2003), resistente às diversidades ambientais, que cresce bem em solos ácidos (FURLAN et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013) e se dispersa através de seus esporos que são carreados pelo vento (ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2002). É uma planta invasiva e a única limitação à sua distribuição são temperaturas extremamente frias (RASMUSSEN, 2003).

Trata-se de uma planta perene, rizomatosa, com folhas grandes que formam touceiras e produzem grande quantidade de biomassa (GAVA, 1994; RIBEIRO et al., 2013). Normalmente, o rizoma e seus rizoides formam uma extensa rede com alta capacidade de rebrota e estão profundamente enterrados no solo, o que permite alta resistência às queimadas (FENWICK, 1988). Com isso se espalha rapidamente em pastagens, áreas marginais e degradadas e é favorecida pelo fogo e pela acidez do solo se tornando difícil o seu controle (DURÃO et al., 1995; FURLAN et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013).

Sua presença reduz a produtividade da terra, afeta negativamente a biodiversidade (RIBEIRO et al., 2013) e põe em risco a economia da atividade pecuária (ALONSO-AMELOT, 1999) e a saúde humana (ALONSO-AMELOT; AVENDANÕ, 2001, 2002).



Figura 1 *Pteridium aquilinum*. A. Pastagem invadida por *P. aquilinum* em Ibituruna, Minas Gerais. B. Broto da planta

2.1.2 Ocorrência da *Pteridium aquilinum* no Brasil

Duas variedades de *Pteridium aquilinum* são encontradas no Brasil, *caudatum* e *arachnoideum* sendo a última a espécie de maior prevalência (TOKARNIA et al., 2012). A variedade *caudatum* foi descrita no estado do Amazonas e no norte do Mato Grosso (FURLAN et al., 2014).

Pastagens invadidas pela samambaia do campo foram registradas praticamente em todos os estados brasileiros (TOKARNIA et al., 2012), no Rio de Janeiro (MARTINI-SANTOS et al., 2010), em São Paulo (TOKARNIA; DOBREINER; CANELLA, 1967), no Rio Grande do Sul (ANJOS et al., 2008), no Paraná (FALBO et al., 2005; MARÇAL et al., 2001), no Espírito Santo (SILVA et al., 2009), em Santa Catarina (BORELLI et al., 2008) e no Mato Grosso (FURLAN et al., 2014; MENDES et al., 2011). Em Minas Gerais, observaram-se *P. aquilinum* em diversos municípios: Alto Caparaó, Araponga, Araxá, Aiuruoca, Belo Horizonte, Boa Esperança, Camanducaia, Caratinga, Catas Altas, Diamantina, Felício dos Santos, Formoso, Grão Mogol, Itamarandiba, Itamonte, Joaquim Felício, Marliéria, Nova Lima, Ouro Preto, Poços de Caldas, Resplendor, Santa Maria do Salto, Santana do Riacho, Santo

Antônio do Itambé, São Gonçalo do Rio Abaixo, São Roque de Minas, Simonésia, Três Marias, Turmalina e Viçosa (ASSIS, 2008).

2.1.3 Princípios tóxicos

A ação tóxica da samambaia, *Pteridium aquilinum*, vem sendo estudada há muito tempo através da indução de lesões com várias substâncias isoladas da planta, dentre elas o ácido chiquímico (EVANS, 1979; HIRONO; FUSHIMI; MATSUBARA, 1977), a quercitina (PAMUCKU et al., 1980a), os taninos (PAMUCKU et al., 1980b) e o ptaquilosídeo (GIL DA COSTA et al., 2012; HIRONO et al., 1987; SHAHIN et al., 1998). Outro princípio tóxico encontrado na *Pteridium aquilinum* é a tiaminase (MARTINI-SANTOS, 2010). No entanto, conforme revisado (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; HOJO SOUZA; CARNEIRO; SANTOS, 2010; RASMUSSEM, 2003) o ptaquilosídeo, é considerado o principal agente tóxico.

Isolado pela primeira vez, simultaneamente, por Niwa et al. (1983) e por Van Der Hoeven et al. (1983 citado por CRUZ; BRACARENCE, 2004, p. 9), o ptaquilosídeo foi identificado como um glicosídeo norsesquiterpeno, composto amorfo, incolor, de fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_8$. Encontrado em todas as estruturas da samambaia, o ápice do broto é a parte aérea da planta (consumida pelos bovinos) que concentra a maior quantidade desse composto. Smith, Lauren e Prakash (1999) encontraram concentrações de até 12.945 $\mu\text{g/g}$ de broto seco. Sabe-se que a idade da planta (TOKARNIA et al., 2012), o tipo de solo, o clima, a geografia (ALONSO-AMELOT, 1999), e a luminosidade (SMITH; LAUREN; PRAKASH, 1999) interferem na toxicidade da planta. Durante a primavera (SMITH; LAUREN; PRAKASH, 1999) e em altitudes de 1400 a 1800m (VILLALOBOS-SALAZAR; HERNANDEZ; MENESES, 1999) esta concentração é maior.

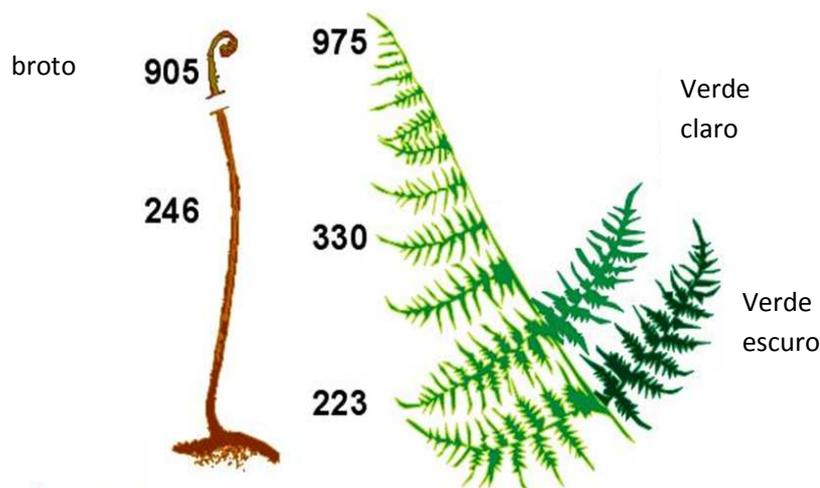


Figura 2 Concentração de ptaquilosídeo nas diferentes partes aéreas da planta (µg/g).

Fonte: Adaptado de Smith (1997)

O ptaquilosídeo se mantém estável por mais de uma semana à temperatura ambiente e por mais de seis meses a temperaturas entre -20 e 0°C (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). É instável em solução aquosa na presença de base, ácido ou calor. Sob condições ácidas o ptaquilosídeo produz pterosina B direta e rapidamente, porém em condições alcalinas é formada uma dienona instável que é potencialmente carcinogênica e mutagênica que pode sofrer aromatização e liberar a pterosina B. A dienona é considerada o verdadeiro composto indutor de carcinogênese (MATOBA et al., 1987 apud CRUZ; BRACARENCE, 2004, p. 252; YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007).

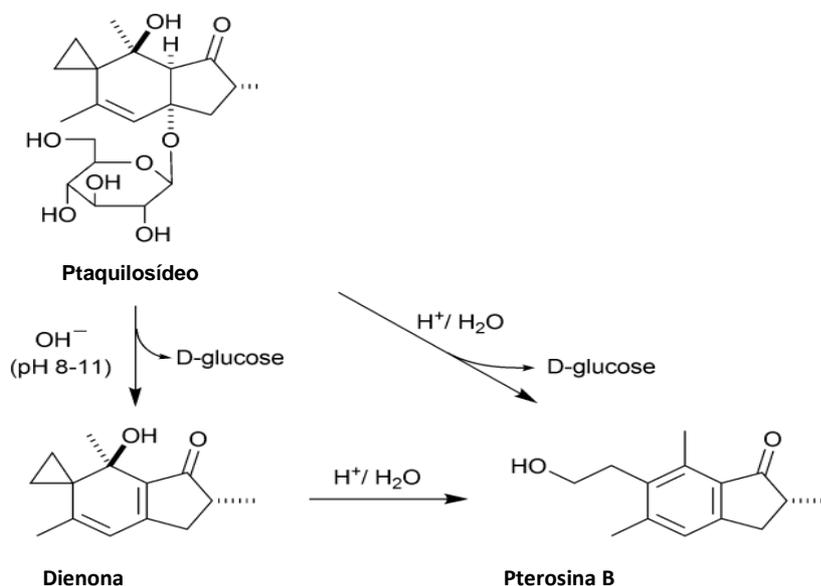


Figura 3 Transformação do ptaquilosídeo, em meio alcalino e meio ácido.

Fonte: Yamada, Ojika e Kigoshi (2007) (modificado)

O ptaquilosídeo atravessa as membranas celulares, e no núcleo é capaz de associar-se às proteínas com terminais amino expostos, como o DNA (ALONSO-AMELOT, AVENDANÕ, 2002) causando alterações permanentes em genes que codificam a ativação de outros, ou que têm função reguladora como, por exemplo, a regulação da apoptose e a supressão de tumores (SANTOS; BRASILEIRO FILHO; SILVA, 1992). Desse modo, propicia a formação e multiplicação de tecido tumoral, sendo considerado um verdadeiro componente tóxico (CRUZ; BRACARENSE, 2004).

2.2 Condições em que ocorre a intoxicação animal

Embora não seja palatável (MARÇAL, 1990), brotos e partes jovens da samambaia são consumidos pelos animais em épocas de escassez de alimento (TOKARNIA et al., 2012), o que normalmente ocorre nas estações secas, após

queimadas, geadas, roçadas (MARÇAL et al., 2001) e em condições de superlotação do pasto (MARÇAL, 1990). Outros fatores como a deficiência de fibra na dieta, a contaminação do feno com a samambaia, o vício e a utilização da planta como cama (TOKARNIA et al., 2012), também levam os animais à ingestão da planta inteira.

Surtos de intoxicação aguda por samambaia em geral são esporádicos, com baixa taxa de morbidade, alta mortalidade (EVANS; EVANS; HUGHES, 1954) e alta letalidade (ANJOS et al., 2008), porém podem alcançar grandes proporções quando associados a ocorrências de geadas frequentes e severas (MARÇAL et al., 2001), após roçadas (SANTOS et al., 2010) e em casos de superlotação de pastos. Esses fatores tornaram as pastagens cultivadas muito baixas, favorecendo a procura pela samambaia, que se mantém viçosa (MARÇAL et al., 2002) e com grande quantidade de massa verde (RIBEIRO et al., 2013).

2.3 Doenças em animais provocadas pelo consumo do *Pteridium aquilinum*

O efeito tóxico e/ou carcinogênico de *P. aquilinum* varia em função da quantidade ingerida, do tempo de ingestão da planta e da espécie animal envolvida (TOKARNIA et al., 2012). A intoxicação pode se manifestar de forma aguda ou crônica apresentando diferentes quadros clínicos (SMITH; LAREN; PRAKASH, 1999). A forma aguda está associada ao consumo de brotos da planta em quantidades superiores a 10g/kg/dia (10 a 30g/kg) durante dias (EVANS; EVANS; HUGHES, 1954; TOKARNIA et al., 2012) e a forma crônica, pela ingestão de quantidades inferiores a 10g/kg/dia durante um ou mais anos (TOKARNIA et al., 2012).

2.3.1 Intoxicação natural

Em bovinos, onde não há predisposição por raça (PAMUKCU; PRICE; BRYAN, 1976) ou sexo (HOPKINS, 1986), três síndromes são bem conhecidas: Diátese hemorrágica, Hematúria Enzoótica bovina e Carcinomas do trato digestivo superior. Além dessas, ocasionalmente, em outras espécies são

observadas a ocorrência da deficiência de tiamina, tumores intestinais e degeneração progressiva da retina (CRUZ; BRACARENCE, 2004).

2.3.1.1 Diátese hemorrágica (DH)

É uma síndrome hemorrágica aguda na qual o animal apresenta sangramento espontâneo na pele e mucosas, muco sanguinolento nas narinas podendo ocorrer diarreia com sangue (TOKARNIA et al., 2012). Afeta animais jovens e adultos, porém é mais frequente em animais de até 2 anos de idade. (TOKARNIA; DOBEREINER; CANELLA, 1967; TOKARNIA et al., 2012). Os sinais clínicos aparecem cerca de 3 semanas após o início do consumo e até 8 semanas depois da última ingestão da planta (EVANS; EVANS, 1961; EVANS; EVANS; HUGHES, 1954). O índice de letalidade na doença é alto e esta normalmente está associada ao consumo da brotação que é a parte aérea mais tóxica da planta (TOKARNIA et al., 2012).

No Brasil surtos da doença foram observados nos estados do Rio de Janeiro (MARTINI-SANTOS et al., 2010), São Paulo, Minas Gerais (TOKARNIA; DOBEREINER; CANELLA, 1967), Paraná (MARÇAL et al., 2001, 2002), Rio Grande do Sul (ANJOS et al., 2009; BARROS et al., 1987), e Mato Grosso (FURLAN et al., 2014).

Surtos de intoxicação aguda foram descritos no estado do Paraná com morte de 25 bovinos no município de Reserva (MARÇAL et al., 2001), 14 óbitos de bovinos da raça Aberdeen angus no município de Ortigueira (MARÇAL et al., 2002).

Na cidade de Visconde de Mauá, município do Rio de Janeiro, 12 de 15 bovinos morreram 7 meses após terem sido introduzidos em pastagem invadida por samambaia, após raçada (MARTINI-SANTOS et al., 2010).

No município de União do Sul, norte do Mato Grosso, constatou-se morte de 22 animais 40 dias após um lote de bovinos machos, com idade entre

um e dois, ser transferido para um piquete invadido por *Pteridium spp* (FURLAN et al., 2014).

2.3.1.2 Hematúria enzoótica bovina (HEB)

A HEB é uma doença de evolução crônica, conhecida também pelos nomes de hematúria vesical bovina, cistite crônica hemorrágica, hematúria essencial e hematúria vesical crônica (RAVE; SANCHEZ; LUQUE, 1978), caracterizada pela perda de sangue na urina (hematúria), contínua ou intermitente (FALBO et al., 2005), prostração, anemia e emagrecimento (TOKARNIA et al., 2012). A doença é determinada por processos neoplásicos e/ou hiperplásicos da mucosa da bexiga, que variam desde alguns milímetros até vários centímetros de diâmetro; entretanto em alguns casos, a hematúria não está relacionada com a presença de neoplasias e sim às lesões não neoplásicas como a ectasia de vasos sanguíneos (TOKARNIA et al., 2012). O pH alcalino da urina de bovinos (7,5 – 8,5) favorece a formação de tumores por propiciar a transformação de ptaquilosídeo em dienona (MATOBA et al., 1987 apud CRUZ; BRACARENCE, 2004, p. 252).

Excluindo-se os casos determinados pela ingestão de *Pteridium spp*, a ocorrência de tumores na bexiga em bovinos é rara (BROBST; OLSON, 1963).

No Brasil é comum a ocorrência de HEB, oriundos dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo (PEIXOTO et al., 2003; TOKARNIA; DOEREINER; CANELA, 1969), Rio Grande do Sul (SOUTO et al., 2006) e Mato Grosso (FURLAN et al., 2014).

2.3.1.3 Carcinomas das vias digestivas superiores (CVDS)

A formação de neoplasias na base da língua, da faringe, do esôfago e do rúmen pode ser induzida pela ação dos carcinógenos da samambaia ou através

da diminuição da resposta imunológica do animal frente aos vírus causadores de tumores conforme (SOUTO et al., 2006).

Essas neoplasias quase só acometem bovinos de idade mais avançada, a partir de aproximadamente 5 a 8 anos de idade (TOKARNIA et al., 2012), sua evolução é crônica, variando de meses a vários anos de ingestão da planta). Parte dos animais apresenta HEB e CVDS, simultaneamente (ANJOS et al., 2008).

2.3.1.4 Tumores intestinais (TI)

Relatam-se que tumores intestinais foram observados em ovelhas mantidas em áreas infestadas por *P. aquilinum* na Inglaterra, Nova Zelândia, Austrália, Islandia, Inglaterra e Escócia (FRANÇA; TOKARNIA, PEIXOTO, 2002).

2.3.1.5 Deficiência de tiamina (DT)

Em revisão, França, Tokarnia e Peixoto (2002) também mencionam a existência da tiaminase na planta, que é muito representativa em termos tóxicos aos equinos e determina o desenvolvimento de um quadro neurológico, contudo a intoxicação raramente ocorre de forma natural.

2.3.1.6 Degeneração progressiva da retina (DPR)

A assim chamada “*bright blindness*” (cegueira brilhante), uma enfermidade que afeta ovinos principalmente na Grã-Bretanha, é determinada pela ingestão de *P. aquilinum*. A doença ocorre, sobretudo em animais de 3 a 4 anos de idade, sendo raramente vista antes dos 2 anos de idade. A cegueira é bilateral e permanente, a pupila responde fracamente à luz e o animal adota uma atitude alerta (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002).

2.3.2 Intoxicação experimental

Experimentalmente, quadros patológicos têm sido promovidos em bovinos (ANJOS et. al., 2009), equinos (MARTINI-SANTOS, 2010), ovinos (TOKARNIA et al., 2012), ratos (CRUZ et al., 2005), camundongos, cobaias e codornas (TOKARNIA et al., 2012).

2.3.2.1 Animais de produção

O potencial tóxico da samambaia (*P. aquilinum*) para animais de produção foi testado e confirmado, por diversos pesquisadores, através da administração de diferentes doses da planta fresca e desidratada (FRANÇA; TOARNIA; PEIXOTO, 2002; MARÇAL, 2003; MARTINI-SANTOS, 2010).

2.3.2.1.1 Bovinos

Os aspectos da intoxicação induzida pela ingestão de samambaia em bovinos foram revisados (ANJOS et al., 2008, 2009; CRUZ; BRACARENCE, 2004; FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; MARÇAL, 2003; VETER, 2009).

Conforme revisado por França, Tokarnia e Peixoto (2002) cinco bovinos, de idades variadas foram alimentados com *P. aquilinum* por Rosenberger e Heeschen (1960) e todos os animais desenvolveram hematúria entre 12 e 15 meses após o início do experimento, porém quatro deles morreram de DH, então Rosenberger (1965) realizou outros experimentos com mais quatro bovinos e durante o estudo, a administração da planta foi reduzida ou suspensa periodicamente. Três bovinos de 2 anos consumiram diariamente cerca de 2 kg de feno de samambaia e uma vaca jovem recebeu dose entre 0,5kg/dia a 1,5kg/dia com períodos de suspensão. Os três bovinos começaram a apresentar hematúria a partir de 8 meses e meio de ingestão e, apesar da redução da dose, os três animais morreram de DH. A vaca apresentou hematúria nove meses após

o início da ingestão quando foi suspenso o fornecimento da planta. Mesmo assim o animal permaneceu apresentando hematúria intermitente por mais 22 meses quando foi detectado tumor na bexiga.

Sinais clínicos de intoxicação aguda por *P. aquilinum* foram reproduzidos em bovinos com a administração de 3 a 4 kg de samambaia fresca por um período de 3 meses (WANG et al., 1984 apud VETER, 2009, p. 1880), e quando o peso da planta ingerida atingiu a proporção de 47 a 63% do peso corporal em um período de 53 a 58 dias (ANJOS et al., 2009),

Pamukcu, Erturk e Yalçiner (1978) promoveram tumores pélvicos, vesicais e intestinais em vacas que receberam 1g/kg de samambaia por 2 anos

2.3.2.1.2 Equinos

A toxicidade da samambaia foi testada também em equinos, Fernandes (1990), promoveu intoxicação em equinos com a administração de 10g/kg de samambaia seca por um período de 108 a 106 dias. Martini-Santos (2010) promoveu quadro clínico neurológico em equinos após administração de 50 e 75% de samambaia seca na dieta.

2.3.2.1.3 Ovinos

Durante 8 meses dois ovinos foram alimentados com “*pellets*” de *P. aquilinum*, um apresentou adenocarcinoma cólon espiral, com metástases no fígado, após 2 anos e 8 meses do início da ingestão (EVANS, 1968). Sintomas de DH foram reproduzidos em ovelhas alimentadas com a planta fresca (64 e 66 dias) ou dessecada (16, 33 e 70 dias); febre, severa dispneia e descarga nasal foram os sintomas observados em ovelha que recebeu broto de *P. aquilinum* seco, durante 45 meses. Os achados de necropsia eram os do quadro hemorrágico clássico (FRANÇA; TOARNIA; PEIXOTO, 2002).

2.3.2.2 Animais de laboratório

A toxicidade da samambaia foi comprovada após o isolamento do ptaquilosídeo (EVANS; MANSON, 1965) e ensaios biológicos realizados ao longo do tempo, demonstram que o órgão alvo para carcinogenicidade depende da via de administração, da dose aplicada, do tempo de exposição ao carcinógeno e da espécie animal envolvida (TOKARNIA et al., 2012). O potencial carcinogênico da planta foi testado através da administração por via oral (planta fresca, planta desidratada, água de fervura do broto, extrato aquoso da planta, leite cru e em pó proveniente de vacas doentes), intravenosa (dose baixa de ptaquilosídeo), e intraperitoneal (ptaquilosídeo) (Quadro 1).

Quadro 1 Relação de estudos sobre a ação carcinogênica da samambaia (*P. aquilinum*) em ratos e camundongos

Referência	Animal	Via	Fonte	Dose	Duração	Resultado
Evans e Manson (1965)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i>	1/3 da dieta	64 dias	Adenocarcinoma de íleo
Price e Pamukcu (1968)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i>	1/3 da dieta	8 meses	Adenocarcinoma de intestino
Pamukcu e Price (1969)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i>	1/3 da dieta	29 semanas	Tumores intestinais e neoplasia de bexiga
Hirono et al. (1970)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (planta seca)	33% da dieta	4 meses	Pólipos adenomatosos e sarcoma de íleo
Hirono et al. (1972)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> após fervura e natural	NE ¹	4 e 9 meses	Adenoma e sarcoma de íleo com incidência menor no grupo <i>P. aquilinum</i> tratada
Yasuda, Kihara e Nishimura (1974)	Camundongos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (planta seca)	33% da dieta	NE	Anomalia de costela, fusão incompleta do esterno e falta de ossificação nos embriões de grávidas.
Pamukcu, Erturk e Yalçiner (1978)	Camundongos	Oral	Leite (fresco e pó) de vacas ingerindo 1g de <i>P. aquilinum</i> /kg de pv/dia	Leite fresco 65 e 75 ml/dia e leite em pó 15 a 20g/rato/dia	+ de 10 meses	Tumor intestinal, renal, pélvico e vesical, isolados ou em combinação.
Hirono, Hosaka e Kuhara (1982)	Ratos	Oral	Broto de <i>P. aquilinum</i> (seco)	33% da dieta	4 meses	Tumor de íleo

¹ Trabalho original não consultado

Continuação...

<u>Hirono et al. (1983)</u>	Ratos	Oral	Broto de <i>P. aquilinum</i> (seco)	33% da dieta	8 meses	Tumor de mama
<u>Hirono et al. (1984)</u>	Ratos	Oral	Broto de <i>P. aquilinum</i>	30% da dieta	180 e 260 dias	Nódulos hiperplásicos no fígado
Santos, <u>Hojo e Brasileiro (1986)</u>	Ratos	Oral	Broto de <i>P. aquilinum</i> (desidratado)	33% na dieta	9 semanas	Neoplasia íleo
<u>Hirono et al. (1987)</u>	RATOS	Oral	<u>Ptaquilosídeo</u> purificado	0,027g/ 0,08% da dieta	210 dias	Tumor de íleo e bexiga
Santos, Brasileiro Filho e <u>Hojo, (1987)</u>	Ratos	Oral	Broto de <i>P. aquilinum</i> (desidratado)	5% da dieta	70 semanas	<u>Adenocarcinomas</u> , sarcomas e adenomas no <u>íleo</u>
<u>Villalobos-Salazar, Meneses e Pashov (1990)</u>	Camundongos	Oral	1. Broto de <i>P. aquilinum</i> 2. Leite de vacas alimentadas com <i>P. aquilinum</i>	I - 33% da dieta II - NR ²	52 semanas	<u>Adenocarcinoma</u> mamário e adenoma pulmonar (1 e 2)
Santos, Brasileiro Filho e Silva (1992)	Ratos	Oral	Água de fervura do broto	<u>ad libitum</u>	54 dias	Tumor vesical e de íleo
<u>Shahin et al. (1998)</u>	Ratos	Endovenosa	<u>Ptaquilosídeo</u> ativado (NaOH)	3mg por semana	10 semanas	<u>Adutos</u> de DNA e tumores de glândula mamária e íleo. Aumento no nível de monócitos e concomitante aumento do nível de <u>TNFα</u>

¹ Não relatado

Continuação...

Cruz et al. (2005)	Ratos	Oral	Extrato aquoso do broto de <i>P. aquilinum</i>	<i>ad libitum</i>	15 meses	Degeneração hidrópica renal, necrose e atrofia vilosidade intestinal, neoformação polipoide e adenocarcinoma
Freitas et al. (2002)	Ratos	Oral	1. Broto <i>P. aquilinum</i> seco e triturada 2. Água de cocção da samambaia como única fonte	1. 10% na ração 2. <i>ad libitum</i>	15 a 24 meses	Hiperplasia, adenoma, adenocarcinoma e carcinoma de íleo e bexiga; papiloma de bexiga (em ambos os grupos)
Egert et al. (2011)	Ratos	Oral	Leite cru vaca com Hematúria	NR	60 e 90 dias	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário discreto no duodeno, hiperplasia do GALT, projeções papiliformes na mucosa e um carcinoma de células escamosas
Gil da Costa et al. (2012)	Camundongos	Intraperitoneal	Ptaquilosídeo isolado da planta dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) pH 5,4	0,5mg	15 semanas	Baixo grau de displasia urotelial (60%) e alto grau de displasia urotelial zonal (20%)

2.4 Riscos para a saúde humana

Existem indicações de que a toxicidade do *P. aquilinum* também seja responsável por induzir a formação de tumores em seres humanos. São citados três modos prováveis de exposição humana ao princípio carcinogênico da planta, a ingestão direta da planta, contato físico com os esporos (inalação ou ingestão da água) e ingestão de produtos provenientes de animais contaminados (ALONSO-AMELOT; AVENDANO, 2001, 2002; POTTER; BAIRD, 2000 VILLALOBOS-SALAZAR, 1985).

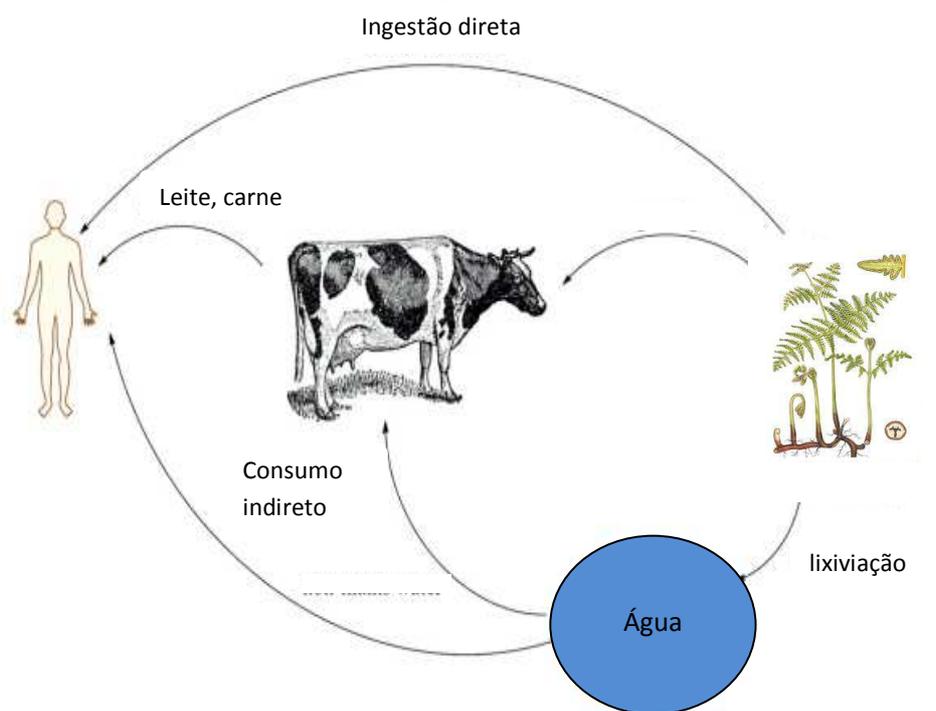


Figura 4 Rotas da exposição ao(s) princípio(s) tóxico(s) de *P. aquilinum*
Fonte: Gil da Costa et al. (2012) (modificado)

2.4.1 Consumo direto da planta

Pteridium spp é consumido, em quantidades significativas, em algumas partes do mundo, como Estados Unidos, Canadá, China, Sibéria (FENWICK 1988), na Nova Zelândia, Dinamarca (RASMUSSEN, 2003) em algumas áreas da Grã-Bretanha (EVANS, 1979), no Brasil (CRUZ; BRACARENCE, 2004; SANTOS; BRASLEIRO FILHO; HOJO, 1987) e principalmente no Japão (ALONSO-AMELOT; AVENDANO, 2002; HIRONO et al., 1970, 1972; PAMUKCU; PRICE, 1969) onde se consome broto de *P. aquilinum* cozido (prato nacional conhecido por “warabi”). No Brasil, existe o hábito de consumo de brotos de samambaia em populações orientais da cidade de São Paulo e norte do Paraná. Populações não orientais também consomem o broto nas regiões de Minas Gerais (MARLIE'RE et al., 2000; SANTOS; BRASLEIRO FILHO; HOJO, 1987) e Espírito Santo (EGERT et al., 2011).

Recouso et al. (2003) demonstraram que há aumento significativo dos níveis de anormalidades cromossômicas nos linfócitos circulantes de pessoas que consumiam brotos ou folhas jovens de samambaia (*Pteridium arachnoideum*).

Apesar da instabilidade do ptaquilosídeo, mesmo após fervura, o broto de samambaia ainda conserva parte do seu potencial carcinogênico (HIRONO et al., 1970, 1972).

O ptaquilosídeo ingerido pelo homem pode ser degradado no estômago pelo suco gástrico e parte desse princípio passa intacta para o intestino, podendo ser absorvido e conseqüentemente propiciando o desenvolvimento de câncer a longo prazo (ALONSO-AMELOT, 1999).



Figura 5 Broto de samambaia. A. Broto “in natura” vendido em feira livre para consumo humano. B. Prato produzido com broto de samambaia cozido, conhecido como warabi

Fonte: A. BROTO... (2014)

B. WARABI...(2014)

2.4.2 Contato físico com esporos e ingestão de água contaminada

Estudos sugerem que a inalação de esporos da samambaia induz a carcinogênese (RASMUSSEM, 2003). Células de cultura foram tratadas com extrato de esporos da planta, e após 2 horas de exposição apresentaram quebra no DNA; segundo os pesquisadores esse resultado mostra claramente que o extrato de esporos da samambaia pode causar lesões de DNA em células humanas *in vitro* (SIMAN et al., 2000).

A ingestão do princípio tóxico também pode ocorrer por meio do consumo de água de reservatórios localizados em áreas muito invadidas por *P. aquilinum*, fato demonstrado pela contaminação da água e do solo após as chuvas. (RASMUSEM, 2003; RASMUSEM; HANSEN; LAUREN, 2005).

Engel et al. (2007) concluíram que o ptaquilosideo não é tóxico para os microrganismos no solo e se degrada, mas afirma que o ptaquilosideo é altamente móvel no solo e pode escapar à degradação microbiana e conseqüentemente contaminar a água subterrânea durante e após chuvas fortes.

2.4.3 Consumo de produtos provenientes de animais contaminados

Estima-se que 8,6% do total de ptaquilosídeo ingerido pelos bovinos durante um período de 5 dias são eliminados no leite durante o mesmo período de tempo (ALONSO-AMELOT et al., 1998) e que através do processo de pasteurização do leite ocorre diminuição de 50 a 75% na presença do ptaquilosídeo, mas isso não o torna menos tóxico aos consumidores, já que há um acúmulo do princípio tóxico no organismo (RASMUSSEN, 2003).

ALONSO-AMELOT et al., 1996, demonstrando que os bezerros que mamam o leite de vacas intoxicadas fecham o ciclo da doença e continuarão a ser doentes; Francesco et al. (2011) detectou a presença de ptaquilosídeo em 9 de 29 amostras de leite (vaca, jumenta, éguas, ovelha e cabra) analisadas e Fletcher et al. (2011) detectaram resíduo do glicosídeo em tecidos de bovinos que se alimentaram com samambaia e levantaram preocupações com a saúde dos consumidores.

Outros pesquisadores recomendam que se evite o consumo da carne de animais que pastejam em áreas muito infestadas de samambaia, como prevenção da saúde humana (POTTER; BAIRD, 2000; WILSON; DONALDSON; SEPAI, 1998).

2.4.4 Evidências epidemiológicas

Existe uma correlação positiva entre a ingestão do leite de vacas contaminado pelo ptaquilosídeo e a maior incidência de tumor esofágico e gástrico no homem (ALONSO-AMELOT et al., 1996) e menciona-se uma possível associação entre *P. aquilinum* e a alta incidência de tumores de bexiga em humanos na Irlanda (FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2000). Em áreas invadidas pela samambaia a alta incidência de neoplasias ocorre não apenas na população que consome a planta, mas também naquelas que apesar de não consumirem, estão expostas à ela por longo período de tempo (RASMUSSEN, 2003).

Villalobos-Salazar (1985), em um estudo feito na Costa Rica relataram um aumento de duas a três vezes a presença de carcinoma gástrico em crianças alimentadas com leite bovino de região endêmica de samambaia.

Alonso-Amelot e Avendanõ (2001) estabeleceram conexão entre o maior índice de câncer gástrico, o consumo de leite proveniente de vacas que pastejam em áreas infestadas pela samambaia e o grande número de casos de HEB em uma região da Venezuela. A presença de *P. Aquilinum* no pasto representa um risco no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico para pessoas que viveram nesses locais por mais de 20 anos ou que foram expostas durante a infância (ALONSO-AMELOT; AVENDANÕ, 2002).

Na região de Ouro Preto (MG) a incidência de câncer de estômago é 3,63% maior entre a população que consome o broto da samambaia cozido (MARLIE'RE et al., 2000; SANTOS; BRASILEIRO FILHO; SILVA, 1992).

REFERÊNCIAS

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDANO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: review of the evidence. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 9, n. 6, p. 675-686, 2002.

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

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

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Excretion through milk, of ptaquiloside in Bracken-fed cows. A quantitative assessment. **Lait**, Les Ullis, n.78, p. 413-423, 1998.

ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, n. 16, p. 528-541, 1999.

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, v. 28, n. 10, p. 501-507, out. 2008.

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

ASSIS, F. C. **A família dennstaedtiaceae pic. Serm. Sensu lato (polypodiopsida) no estado de Minas Gerais, Brasil**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

BARROS, C. S. L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Revista A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 7, p. 333-339, 1987.

BORELI, V. et al. Itoxicação por plantas diagnosticada em bovinos pelo laboratório de patologia animal CAVE/UDESC no período de janeiro de 2000 a abril de 2008. In: ENCONTRO NACIONAL DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO, 6., 2008, Campo Grande. **Anais...Campo Grande: UFMS**, 2008. p. 61.

BROBST, D. F.; OLSON, C. Neoplastic and proliferative esions of bovine urinary bladder. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 24, p. 105-110, 1963.

BROTO de samambaia. Disponível em: <http://dentistanh.blogspot.com.br/2010_03_01_archive.html>. Acesso em: 23 dez. 2014.

CRUZ, G. D.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Toxicidade da samambaia (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) para a saúde animal e humana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 249-258, 2004.

CRUZ, G. D. et al. Alterações anátomo-histopatológicas em ratos submetidos à dieta com extrato de broto de samambaia (*Pteridium aquilinum* var. *arachnoideum*) de dois municípios do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 409-411, 2005.

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

DURÃO, C. J. F. et al. Pathological and clinical aspects of bovine enzootic hematuria. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 60, n. 515, p. 132-137, 1995.

EGERT, L. et al. Alterações do trato gastrointestinal de ratos submetidos à dieta com leite de vacas intoxicadas por *pteridium arachnoideum*. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 15., e CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1., 2011, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EVZ/UFG, 2011. 1 CD ROM.

ENGEL, P. et al. Microbial degradation and impact of Bracken toxin ptaquiloside on microbial communities in soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 67, p. 202–209, 2007.

EVANS, I. A. Bracken carcinogenicity. **Research Veterinary Science**, London, v. 26, p. 339-348, 1979.

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

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

EVANS, W. C.; EVANS, E. T. R.; HUGHES, L. E. Studies on bracken fern poisoning in cattle. **British Veterinary Journal**, London, v.110, n. 1, p. 295-306, 1954.

EVANS, W. C.; EVANS, I. A. Studies on bracken poisoning in cattle – Part VII. The toxicity of bracken rhizomes. **Veterinary Record**, London, v. 73, n. 35, p. 852-853, 1961.

FALBO, M. K. et al. Hematoogycal, biochemical, urinary and histopathological changes in natural intoxication in bovine by bracken fern (*pteridium aquilinum*) (L.) kuhn. semina: **Ciências Agrarias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 547-558, 2005.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*)-Toxic effects and to constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, n. 46, p. 147-173, 1988.

FERNANDES et al. Intoxicação experimental de equinos por *Pteridium aquilinum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 13, n. 1, p. 112-124, 1990.

FLETCHER, M. T. et al. Residue potential of Norsesquiterpene Glycosides in Tissues of cattle Fed Austral Bracken (*Pteridium esculentum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 8518–8523, 2011.

FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 85-96, 2002.

FRANCESCO, B. et al. A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. **Food Chemistry**, Barking, v. 124 p. 660–665, 2011.

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**, Amsterdam, v. 499, p. 189–196, 2002.

FURLAN, F. H. et al. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2014.

GAVA, A. Intoxicações por plantas de ação anti-hematopoiética e mutagênica. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C. **Doenças de ruminantes e equinos**. Pelotas: UFPel, 1994. p. 247-258.

GIL COSTA, R. M. et al. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 1, n. 12, p. 203-204, 2012.

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

HIRONO, I. et al. Hyperplastic nodules of the liver induced in rats fed bracken diet. **Cancer Letters**, Virgínia, v. 22, p. 151–155, 1984.

HIRONO, I. et al. Induction of mammary cancer in CD rats fed bracken diet. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 4, p. 883–887, 1983.

HIRONO, I. et al. Induction of tumors in ACI Rats Given a diet containing Ptaquiloside, a Bracken Carcinogen. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 79, n. 5, p. 1143-1149, 1987.

HIRONO, I. et al. Studies on carcinogenic properties of bracken, *Pteridium aquilinum*. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 45, p. 179-188, 1970.

HIRONO, I.; FUSHIMI, K.; MATSUBARA, N. Carcinogenicity test of shikimic acid in rats. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 1, p. 9-10, 1977.

HIRONO, I.; HOSAKA, S.; KUHARA, K. Enhancement by bracken of induction of tumours of upper alimentary tract by N-propyl-N-Nitrosourethane, **Br. Journal of Cancer**, Baltimore, v. 46, p. 423–427, 1982.

HOJO-SOUZA, N. S.; CARNEIRO, C. M.; SANTOS, R. C. *Pteridium aquilinum*: o que sabemos e o que ainda falta saber. **Bioscience Jornal**, Uberlândia, v. 26, n. 5, p. 798-808, set./out. 2010.

HOPKINS, N. C. G. Aetiology of enzootic haematuria. **The Veterinary Record**, London, v. 28, p.715-717, June 1986.

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

MARÇAL, W. S. et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Abbeerden angus. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 77-81, 2002.

MARÇAL, W. S. et al. Ocorrência de intoxicação aguda em bovinos pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn) no norte do Paraná, Brasil. **Semina**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 139-144, 2001.

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

MARLIE`RE, C. A. P. et al. Bracken fern consumption and oesophageal and stomach cancer in the Ouro Preto, region, MG, Brazil. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Ed.). **Bracken fern: toxicity, biology and control**. Aberystwyth: International Bracken, 2000. p. 144-149. (Special publication, 4).

MARTINI-SANTOS, B. J. **Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação experimental por *Pteridium arachnoideum* (Dennstatiaceae) em equinos**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

MARTINI-SANTOS, B. J. et al. Surto de intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* (*Kaulf.*) em bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 92-96, abr./jun. 2010.

MATOBA, M. et al. Assay of ptaquiloside, the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. **Mutagenesis**, Oxford, v. 2, p. 419-425, 1987.

MENDES, E. R. S. et al. Intoxicação aguda por samambaia em bovinos em Mato Grosso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 15., e CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1., 2011, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EVZ/UFG, 2011. 1 CD ROM.

NIWA, H. et al. Ptaquiloside, a novel norsesquiterpine glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 24, p. 4117-4120, 1983.

PAMUCKU, A. M.; ERTURK, E.; YALÇINER, S. Carcinogenic and mutagenic activities of milk From cows fed Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, p. 1556-1560, 1978.

PAMUCKU, A. M. et al. Carcinogenicity of tannin and tannin-free extracts of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 65, p. 131-136, 1980b.

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

PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M.; BRYAN, G. T. Naturally occurring and bracken fern-induced bovine urinary bladder tumors. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 13, p. 110-111, 1976.

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**, Cary, v. 43, n.1, p. 275-281, 1969.

PEIXOTO, P. V. et al. Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 65-81, 2003.

POTTER, D. M.; BAIRD, M. S. Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. **British Journal of Câncer**, Edinburgh, v. 83, n. 7, p. 914-920, 2000.

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

RASMUSSEN, L. H.; HANSEN, H. C. B.; LAUREN, D. Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 58, p. 823-835, 2005.

RASMUSSEN, L. H. **Ptaquiloside an environmental hazard? Occurrence and fate of a Bracken (*Pteridium sp.*) toxin in terrestrial environments.** 2003. 124 p. Thesis (Ph.D) - The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 2003.

RAVE, V. G.; SÁNCHEZ, F. O.; LUQUE, F. E. Estudio clinicopatológico de la hematuria vesical bovina. **Revta ICA**, Bogotá, v. 13, n. 4, p. 671-679, 1978.

RECOUSO, R. C. et al. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. **Veterinary and Comparative Oncology**, Hoboken, v. 1, n. 1, p. 22-29, 2003.

RIBEIRO, S. C. et al. Regeneração natural em áreas desmatadas e dominadas por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. na serra da Mantiqueira. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 65-76, jan./mar. 2013

ROSENBERGER, G.; HEESCHEN, W. Adlerfarn (*Pteris aquilina*) - die Ursache des sog. Stallrotes der Rinder (Haematuria vesicalis bovis chronica). **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, Hanover, v. 67, n. 8, p. 201-208, 1960.

ROSENBERGER, G. Längere Aufnahme von Adlerfarn (*Pteris aquilina*) – die Ursache der chronischen vesikalen Haematurie des Rindes. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, Horn, v. 52, n. 5, p. 415-421, 1965.

SANTOS, B. J. M. et al. Surto de intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* (Kaulf) em Bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 92-96, 2010.

SANTOS, R. C.; BRASILEIRO FILHO, G.; HOJO, E. S. Induction of tumors in rats by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) from Ouro Preto (Minas Gerais, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 73-77, 1987.

SANTOS, R. C.; BRASILEIRO FILHO, G.; SILVA, M. E. Tumorigenicity of boiling water extract of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 72-76, 1992.

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

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**, Orlando, v. 244, p. 192-197, 1998.

SILVA, M. A. et al. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1847-1850, set. 2009.

SIMAN, S. E. et al. Fern spore extracts can damage DNA. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 83, n. 1, p. 69-73, 2000.

SMITH, B. L. The toxicity of bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. In: D`MELLO, F. (Ed.). **Handbook of plant and fungal toxicants**. Boca Raton: CRC, 1997. p. 63-76.

SMITH, B. L.; LAUREN, D. R.; PRAKASH, A. S. Bracken fern (*Pteridium*): toxicity in animal and human health. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Ed.). **Bracken fern: toxicity, biology and control**. Aberystwyth: International Bracken Group, 1999. p. 76-85.

SOUTO, M. A. M. et al. Nplasias de bexiga associada à hematúria enzoótica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 36, n. 5, p. 1647-1650, 2006.

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

THOMSON, J. A. Morphotype and conflicting taxonomies in *Pteridium* (Dennstaedtiaceae: Pteridophyta). **Fern Gazette**, London, v. 18, p. 101–109, 2008.

THOMSON, J. A. Taxonomic status of diploid southern hemisphere brackens (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae). **Teloepa. Journal of Plant Systematics**, Sydney, v. 14, p. 43-48, 2012.

THOMSON, J. A. Towards a taxonomic revision of *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). **Teloepa. Journal of Plant Systematics**, Sydney, v. 10, p. 793–803, 2004.

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

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Ocorrência de intoxicação aguda pela “samambaia” (*Pteridium aquilinum*) em bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 2, p. 329-336, 1967.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 586 p.

VAN DER HOEVEN, J. C. M. et al. Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Carcinogenesis**, Oxford, v. 4, p. 1587-1590, 1983.

VETTER, J. A. Biological hazard of our age: Bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]. a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 57, n. 1, p. 183–196, 2009.

VILLALOBOS-SALAZAR, J. Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cancer gastrico en Costa Rica. **Revista Costa Rica de Ciências Médicas**, San José, v. 6, p. 131–139, 1985.

VILLALOBOS-SALAZAR, J. et al. Factors which may affect ptaquiloside levels in milk; effects of altitude, bracken fern growth stage, and milk processing. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Ed.). **Bracken fern: toxicity, biology and control**. Aberystwyth: International Bracken, 1999. p. 68-73.

VILLALOBOS-SALAZAR, J.; MENESES, A.; PASHOV, B. Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on bracken fern. In: THOMPSON, L. A.; SMITH, R. T (Ed.). **Bracken biology and management. AIAS Ocassional Publication**, Melbourn, v. 40, p. 247-251, 1990.

WANG, Y. D. et al. Studies on experimental bovine bracken poisoning. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, Beijing, v.15, p. 235–239, 1984.

WARABI no hitashi. Disponível em: <<http://blog.jagaimo.com/archive/2007/04/18/warabi-no-ohitashi.aspx>>. Acesso em: 23 dez. 2014.

WILSON, D.; DONALDSON, L. J.; SEPAL, O. Should we be frightened of bracken? A review of the evidence. **Journal of Epidemiology and Community Health**, London, v. 52, p. 812-817, 1998.

YAMADA, K.; OJIKI M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product Reports**, London, v. 24, p. 798–813, 2007.

YASUDA, Y.; KIHARA, T.; NISHIMURA, H. Embryotoxic effects of feeding bracken fern *Pteridium aquilinum* to pregnant mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 28 p. 264–268, 1974.

CAPÍTULO 2 - Avaliação clinicopatológica de vacas em lactação após ingestão de doses subtóxicas de *Pteridium aquilinum*

Artigo submetido à Revista Ciência Animal Brasileira

**AVALIAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA DE VACAS EM LACTAÇÃO
APÓS INGESTÃO DE DOSES SUBTÓXICAS DE *PTERIDIUM
AQUILINUM***

**Tania Maria Pereira Alvarenga, Anaise Emanuele Resende, Mary Suzan
Varaschin, Djeison Lutier Raymundo, Flademir Wouters & Josilene
Nascimento Seixas**

RESUMO

Pteridium aquilinum é uma planta tóxica de grande interesse pecuário, encontrada em praticamente todos os estados brasileiros. Tem efeito tóxico variável e dependente da quantidade e tempo de ingestão. Neste trabalho objetivou-se avaliar as possíveis manifestações clínicas e patológicas, alterações laboratoriais e a produção de leite de vacas que consumiram na dieta doses subtóxicas de samambaia. Duas vacas em lactação foram submetidas ao consumo de samambaia seca na dose de 2g/kg/dia e, posteriormente 6g/kg/dia (doses correspondentes à planta *in natura*). O estado geral das vacas, bem como fezes, urina e produção de leite foram avaliados diariamente; foram realizados periodicamente exame clínico, avaliação hematológica e urinálise. Na ocasião do abate foi realizada avaliação macroscópica dos órgãos e tecidos e colheita de amostras para análise histopatológica. A quantidade de planta ingerida pelas vacas correspondeu a 11,14% e 9,82% em relação ao peso corporal dos animais. A ausência de manifestações clínicas e de alterações hematológicas, urinárias e anatomohistopatológicas evidenciam que o consumo da planta nas doses fornecidas (2g/kg e 6g/kg de peso vivo/dia) durante o período estudado (29 e 36 dias) não foi suficiente para promover alterações clínicas ou patológicas detectáveis, nem sequer interferiram na produção de leite.

Palavras-chave: samambaia, intoxicação subclínica, bovino.

**CLINICOPATHOLOGICAL EVALUATION OF LACTATING COWS
AFTER INTAKE OF SUBTOXIC DOSES OF
*PTERIDIUM AQUILINUM***

ABSTRACT

Pteridium aquilinum is a toxic plant, of great interest for livestock, it is found in virtually all Brazilian states. It has a variable toxic effect and it depends on the amount and the time of ingestion. The aim of this study was to evaluate the possible clinical and pathological manifestations, laboratory abnormalities and milk production of cows that were fed with a diet of subtoxic doses of bracken fern. Two lactating cows were submitted to consumed dry bracken fern at a dose of 2g/kg/day and then 6g/kg/day (doses corresponding to the plant in natura). The general condition of the cows, as well as faeces, urine and milk production, were evaluated daily. Clinical examinations, hematological evaluation and urinalysis were carried out periodically. During slaughter was the macroscopic evaluation of the organs and tissues and the sampling for histopathological analysis were carried out. The amount of plant ingested by the cows were 11.14% and 9.82% related to the animal's weight. The absence of clinical manifestations and hematological, urinary and anatomic-pathological changes show that the consumption of plant in doses given (2 g/kg and 6g/kg body weight) during the study period (29 and 36 days) were not sufficient to promote detectable clinical- pathological changes, even interfered in the production of milk.

Keywords: bracken fern, subclinical poisoning, bovine.

1 INTRODUÇÃO

Pteridium aquilinum (“samambaia”, “samambaia do campo”, “pluma” ou “feto”) é uma planta tóxica de grande interesse pecuário, encontrada em praticamente todos os Estados brasileiros. É resistente às diversidades ambientais e invade as pastagens¹ com produção de grande quantidade de biomassa^{2,3,4,5}. Entre as substâncias tóxicas presentes na planta está o ptaquilosídeo, um agente carcinogênico encontrado em maiores concentrações no broto^{6,7}. Embora não seja palatável, em épocas de escassez de alimento, por vício ou como contaminante na silagem, a planta é consumida pelos bovinos, promovendo quadros clinicopatológicos variáveis, dependendo da quantidade ingerida e do tempo de ingestão¹. Diátese hemorrágica é a forma aguda da intoxicação^{1,8} e a ocorrência de neoplasias das vias digestivas superiores e na bexiga (esta última doença conhecida como hematúria enzoótica bovina) são as formas crônicas^{1,9}.

No presente estudo objetivou-se avaliar a produção diária de leite, o peso corporal e as possíveis manifestações clinicopatológicas em vacas que consumiram *P. aquilinum* em doses subtóxicas (2 e 6 g/kg/dia) por um período de 29 e 36 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e secagem da samambaia

Brotos e folhas jovens de samambaia (*P. aquilinum*) foram coletados manualmente em setembro de 2012, em uma propriedade rural no município de Ibituruna – MG, na qual havia grande quantidade de samambaia e histórico de bovinos que tiveram sinais clínicos compatíveis com os da intoxicação. No mesmo dia da coleta a planta foi levada para um galpão, onde foi seca à sombra por sete dias. Durante esse período o material foi revolvido uma vez por dia para se obter uma secagem homogênea. Após esse processo, a planta seca foi triturada e estocada em sacos de pano em ambiente fresco e ao abrigo da luz solar. Das partes coletadas foi retirada uma amostra para determinação do teor de umidade da samambaia antes e após a secagem.

2.2 Animais

O experimento foi conduzido no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFLA (processo nº 51/10). Foram utilizadas duas vacas, mantidas em propriedades livres da samambaia, sendo o bovino 1, mestiça, com idade aproximada de 5 anos, 416kg de peso vivo, no 4º mês de lactação e produção média de 5 litros de leite/dia, e o bovino 2, uma ½ sangue Girolanda, com idade aproximada de 4 anos, 440kg de peso, no 3º mês de lactação e produção média de 12 litros de leite/dia.

2.3 Manejo e dieta experimental

Os bovinos foram mantidos em um piquete com área de 200 m², cercado de tela, com capim (*Brachiaria* sp.), recebendo água e sal mineral *ad libitum*. Após

adaptação de sete dias (em que a samambaia seca já havia sido introduzida na dieta em quantidades menores), as vacas foram manejadas e alimentadas de forma semelhante à habitual das propriedades de origem, com silagem de milho e concentrado proteico, fornecidos duas vezes ao dia durante os períodos de ordenha (6h30min e 15h30min). A samambaia seca era fornecida misturada ao concentrado durante a 1ª ordenha, em quantidades e por períodos de ingestão variados. Foram administrados 2g/kg de peso vivo/dia durante 17 dias para o bovino 1 e 10 dias para o bovino 2, e posteriormente, 6g/kg de peso vivo/dia por 11 dias para ambos, sendo que o período total de ingestão da planta foi de 36 dias para o bovino 1 e 29 dias para o bovino 2.

2.4 Avaliação clinicopatológica

Diariamente foi feita avaliação da produção de leite, da condição física geral e aspecto da urina e das fezes. As vacas foram pesadas a cada dez dias para cálculo e ajuste da dose de samambaia. Foram realizados exame clínico, avaliação hematológica e urinálise no 2º dia do período de adaptação, no primeiro dia de ingestão das dietas experimentais e no último dia do experimento, que corresponderam aos dias 2, 8, 24 e 36 para o bovino 1 e aos dias 2, 8, 18 e 29 para o bovino 2. Foram avaliados os parâmetros de frequências cardíaca e respiratória, movimentos ruminais, temperatura corpórea e coloração das mucosas. A coleta de sangue para realização do hemograma foi realizada por meio de punção venosa, em tubos contendo EDTA e a amostra de urina foi obtida através de micção espontânea.

Ao final do experimento os animais foram encaminhados ao frigorífico para aproveitamento condicional, onde foram realizadas a avaliação macroscópica e a coleta de fragmentos de diversos órgãos/tecidos para análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em formol a 10% por 24 h, processados pelos métodos de rotina para histologia e as lâminas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE).

3 RESULTADOS

3.1 Rendimento e consumo da planta seca

Antes e após o processamento, a planta foi analisada quanto ao teor de umidade (método gravimétrico) para cálculo do rendimento e determinação da dosagem para formulação da dieta das vacas. A planta natural apresentou teor de umidade igual a 50% e, após secagem, 9,7%.

Somando-se a quantidade de samambaia seca consumida durante o período de adaptação (1,2 kg para cada vaca, durante sete dias) e o período experimental se obteve um total de 26,215 kg (bovino 1) e de 24,480 kg (bovino 2), que correspondeu a 47,344 kg e 44,211 kg de planta fresca, respectivamente.

3.2 Achados clinicopatológicos

Os animais não apresentaram quaisquer alterações nos parâmetros fisiológicos avaliados diariamente e a produção de leite se manteve estável durante todo o período experimental. Os valores hematológicos e de urinálise permaneceram dentro dos limites normais para a espécie. Na avaliação macroscópica realizada na linha de abate não foram evidenciadas alterações; e, nas amostras de fígado, rins, baço, pulmão, coração, linfonodos, compartimentos gástricos e intestinos não foram observadas alterações histológicas dignas de nota.

4 DISCUSSÃO

O rendimento da samambaia após o processo de secagem foi de 59,7%, resultado diferente do já relatado, em que é descrito um rendimento de 10%¹⁰; observou-se que a planta perdeu 40,3% de água, já que o teor de umidade da planta natural foi de 50% e da planta seca foi de 9,7%. Uma vez que o material obtido após secagem não ficou completamente desidratado, a dose administrada deve ser calculada com base na matéria seca. Logo, recomenda-se que seja realizada a análise de umidade da planta natural (integral) e após secagem, para o correto estabelecimento da dose diária nos casos de intoxicação experimental, em que se deseja correlacionar com a ingestão da planta fresca, em condições naturais. Os dados analíticos obtidos mostraram que 100g da planta natural correspondem a 50g de matéria seca; e que 100g da planta seca correspondem a 90,3g de matéria seca. Não foi encontrado na literatura outro trabalho em que a determinação de umidade da samambaia natural e após secagem tivesse sido analisada.

A quantidade de samambaia seca ingerida, correspondente à planta natural, durante o presente estudo foi de 11,14% e 9,82% em relação ao peso corporal dos bovinos 1 e 2, respectivamente. Não ocorreram quaisquer sinais clínicos ou patológicos de intoxicação, nem mesmo alteração na produção diária de leite. Sabe-se que a manifestação clínica da intoxicação por *P. aquilinum* é dependente da quantidade ingerida e do tempo de ingestão da planta; assim doses baixas promovem quadros clínicos de intoxicação após meses ou anos de consumo, induzindo a forma crônica e doses maiores ingeridas por dias ou semanas resultam na manifestação aguda da doença¹. Quadro de intoxicação aguda foi induzido em quatro bovinos fornecendo brotos de *P. aquilinum* triturados, em quantidade de 5 a 15 g/kg de peso e as manifestações clínicas iniciaram quando a quantidade da planta ingerida correspondeu a 59,3%, 63,3%,

47,4% e 47,5% do peso dos bovinos, que ocorreu entre 47 e 53 dias após o início da ingestão¹¹.

Os parâmetros hematológicos avaliados apresentaram-se dentro dos limites normais, embora leucopenia por neutropenia e trombocitopenia já tivessem sido evidenciados em bovinos alimentados com brotos de samambaia frescos nas doses de 5g a 15g/kg a partir de 30 dias de consumo¹¹. Os relatos em que foram detectadas alterações mais precoces nos exames de urina ocorreram somente a partir de 67 dias de consumo de samambaia seca (300 a 600g) e brotos frescos (400 a 1000 g)¹², não sendo, portanto, esperadas nos animais deste estudo.

Neste estudo não houve queda na produção de leite associada ao consumo de samambaia, que é um dos fatores que contribuem para as perdas econômicas em áreas infestadas por *P. aquilinum*. Anemia, emagrecimento e queda na produção de leite são sinais comuns nos casos de intoxicação crônica por *P. aquilinum*¹. Embora não tenham sido evidentes quaisquer alterações clinicopatológicas nos animais que consumiram essa planta tóxica, é importante lembrar que o leite de bovinos que consomem samambaia pode ser um veículo para a ingestão indireta de princípios carcinogênicos para humanos que, através da ingestão prolongada, podem vir a desenvolver neoplasias, assim como ocorre nos bovinos¹³.

Em regiões onde as pastagens são muito invadidas por samambaia, os prejuízos econômicos são significativos, principalmente na pecuária de leite, onde a hematuria enzoótica bovina é considerada um problema tão sério que leva alguns produtores ao abandono da atividade, situação que se agrava pela dificuldade do controle da planta nas pastagens¹⁴. No entanto, em diversas situações, os produtores aprendem a conviver com o problema e passam a considerar a doença, que às vezes é de caráter intermitente, como “normal” e por isso, consomem e comercializam o leite desses animais. É neste ponto que reside

o problema, pois envolve também a saúde humana. Entre tantos agentes mutagênicos e carcinogênicos a que os homens são expostos ao longo da vida, um produto aparentemente inofensivo, o leite, pode conter uma ou mais substâncias, que podem atuar como um agente iniciador ou promotor de uma proliferação tumoral.

5 CONCLUSÃO

A ausência de manifestações clínicas e de alterações hematológicas, urinárias e anatomohistopatológicas evidenciam que o consumo da planta nas doses fornecidas (2g/kg e 6g/kg de peso vivo/dia) durante o período estudado (29 e 36 dias) não foi suficiente para promover alterações clinicopatológicas detectáveis nos exames realizados, nem sequer interferiram na produção de leite.

6 AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

1. Tokarnia CH, Brito MF, Barbosa JD, Peixoto PV, Döbereiner J. Plantas tóxicas do Brasil. 2nd. ed. Rio de Janeiro: Helianthus; 2012. 586p. Português.
2. Furlan FH., Mendes ERS, Ducatti KR, Gefferson C. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2014; 34(4): 343-348. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000400008&lng=en&nrm=iso>. Português.
3. Hojo-Souza NS, Carneiro CM, Santos RC. *Pteridium aquilinum*: O que sabemos e o que ainda falta saber. Bioscience Journal. 2010; 26(5): 798-808. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7239/5269>>. Português.
4. Rasmussen LH, Hansen HCB, Lauren D. Sortion, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. Chemosphere. 2005; 58: 823-835. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504007490>>. English.
5. Ribeiro SC, Botelho SA, Fontes MAL., Garcia PO. & Almeida HS. Regeneração natural em áreas desmatadas e dominadas por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. na Serra da Mantiqueira. Cerne. 2013; 19(1): 65-76. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-77602013000100009&lng=en&nrm=iso>. Português.
6. Riet-Correa F, Medeiros RMT. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2001; 21(1): 38-42. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2001000100008&lng=en&nrm=iso>. Português.
7. Santos RC, Brasileiro FG, Silva ME. Tumorigenicity of boiling water extract of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1992; 12(1): 72-76. English.
8. Souto MAM, Komers GD, Barros CSL, Rech RR, Piager JGM. Neoplasma de bexiga associada à hematúria enzoótica bovina. Ciência Rural. 2006; 36(5): 1647-1650. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000500050&lng=en&nrm=iso>. Português.
9. Falbo MK, Reis ACF, Balarin MRS., Bracarense APFRL, Araujo JPI, Okano W, Sandini IE. Itrações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. Semina: Ciências Agrárias. 2005; 26(4): 547-558.

- Disponível em: <
http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_26_4_19_15.pdf>. Português.
10. Martini-Santos BJ. 2010. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação experimental por *Pteridium arachnoideum* (Dennstatiaceae) em equinos. 71f. Seropédica, R.J. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Disponível em: <
<http://r1.ufrrj.br/wp/ppgm/dissertacoes-2/>>. Português.
11. Anjos BL, Irigoyen LF, Piazer JVM, Brun JS, Figuera RA, Barros CSL. Intoxicação experimental aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009; 29(9): 753-766. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000900013&lng=en&nrm=iso>. Português.
12. Pamukcu AM, Goksoy SK, Price JM. Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. Cancer research. 1967; 27(1): 917-924. Disponível em: <
http://cancerres.aacrjournals.org/content/27/5_Part_1/917.full.pdf>. English.
13. Ulian CMV, Baptista AAS, Ventura RFA, Sakate M. *Pteridium aquilinum* na alimentação humana: uma revisão. Acta Veterinaria Brasilica. 2010; 4(2): 64-69. Disponível em: <
<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/1603/4548>>. Português.
14. Galvão A, Brito MF, Aragão AP, Yamasaki EM, Peixoto PV, Tokarnia CH. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com hematúria enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012; 32(9): 887-902. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900013&lng=en&nrm=iso>. Português.

**CAPÍTULO 3 - Lesões pré-neoplásicas em ratos alimentados com queijo de
leite de vacas que consumiam *Pteridium arachnoideum***

**LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS EM RATOS ALIMENTADOS COM
QUEIJO DE LEITE DE VACAS QUE CONSUMIAM**

Pteridium arachnoideum

Tania Maria Pereira Alvarenga

Josilene Nascimento Seixas

Flademir Wouters

Paulo Vargas Peixoto

Mary Suzan Varaschin

Luiz Ronaldo Abreu

ABSTRACT

The carcinogenic effect of bracken fern (*P. arachnoideum*) has been proven through the induction of tumors in domestic animals and laboratory. Epidemiological studies in humans have also shown an association between exposure and ingestion of the plant with increased risk of developing tumors in the digestive tract. However, little is known about the toxic effects of dairy products made with milk from cows that consume the said plant. In this sense, the present study investigated the possible clinical and pathological changes in rats that receiving dietary cheese made with milk from cows fed with bracken fern. To collect the milk (and subsequent production of cheese) were used two cows, daily offered up protein concentrate (feed) plus bud and young leaves of dry fern, at a dose of 2g/kg/day (batch of milk 1), and posteriorly 6g/kg/day (batch of milk 2). After cheese production, 32 Wistar rats with 30 days were divided into four groups of eight animals, two control groups (A and B) and two experimental groups (C and D). Group A received only commercial diet (control diet); group B, diet plus 30% of cheese from cows which did not consume bracken fern (control diet with cheese); groups C and D, diet 30% of cheese produced from batch of milk 1 and diet 30% of cheese produced from batch of milk 2, respectively. At necropsy were not observed any macroscopic changes. Histopathological examination, however, revealed the development of preneoplastic lesions (hyperplasia/dysplasia) in the stomach, intestines and bladder of animals that received the experimental diets.

INDEX TERMS: Bracken fern. Carcinogenicity. Public health. Milk products.

RESUMO

O efeito carcinogênico da samambaia (*P. arachnoideum*) vem sendo comprovado através da indução de tumores em animais domésticos e de laboratório. Estudos epidemiológicos em humanos também têm demonstrado uma associação entre a exposição e a ingestão da planta com o aumento do risco de desenvolver tumores no trato digestório. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos tóxicos de produtos lácteos fabricados com leite de vacas que consomem a referida planta. Nesse sentido, no presente estudo investigaram-se as possíveis alterações clínico-patológicas em ratos que recebiam na dieta de queijo produzido com leite de vacas alimentadas com samambaia. Para a coleta do leite (e posterior produção de queijo) utilizaram-se duas vacas, que diariamente oferecia-se concentrado proteico (ração) acrescido de broto e folhas jovens de samambaia seca, na dose de 2g/kg/dia (lote de leite 1) e posteriormente, de 6g/Kg/dia (lote de leite 2). Após a produção de queijo, 32 ratos Wistar, com 30 dias, foram divididos em quatro grupos de oito animais, sendo dois grupos controle (A e B) e dois grupos experimentais (C e D). O grupo A recebeu apenas ração comercial (controle ração); o grupo B, ração acrescida de 30% de queijo proveniente de vacas que não consumiram samambaia (controle ração com queijo); os grupos C e D, ração acrescida de 30% de queijo produzido com leite do lote 1 e ração acrescida de 30% queijo produzido com leite do lote 2, respectivamente. À necropsia não foram observadas quaisquer alterações macroscópicas. O exame histopatológico, porém, revelou o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (hiperplasia/displasia) no estômago, intestinos e bexiga dos animais que receberam as dietas experimentais.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Samambaia. Carcinogenicidade. Saúde pública. Produtos lácteos.

1 INTRODUÇÃO

Pteridium arachnoideum (popularmente conhecida como “samambaia”, “samambaia do campo”, “pluma” ou “feto”) é uma planta tóxica, de ampla distribuição mundial que já foi registrada em muitos Estados brasileiros (TOKARNIA et al., 2012), preferencialmente em regiões montanhosas e em pastagens e áreas degradadas ou submetidas a queimadas (FURLAN et al., 2014). Considerada um problema ambiental (HOJO-SOUZA; CARNEIRO; SANTOS, 2010; RIBEIRO et al., 2013), a sua presença e desenvolvimento nas pastagens representa perigo tanto para a saúde dos animais como a dos homens.

Investigações a cerca da toxicidade do *P. arachnoideum*, foram revisadas por diversos autores (ALONSO-AMELOT; AVENDAÑO, 2002; FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002; GIL DA COSTA et al., 2012; HOJO-SOUZA; CARNEIRO; SANTOS, 2010; POTTER; BAIRD, 2000; TOURCHI-ROUDSARI, 2014; ULIAN et al., 2010; YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007), e indicam o ptaquilosídeo como o princípio tóxico mais importante da planta.

A ingestão da samambaia é capaz de promover intoxicações com quadros clínicos e patológicos variáveis, dependentes da espécie animal envolvida, da quantidade ingerida e do tempo de ingestão (TOKARNIA et al., 2012).

Considerando os estudos científicos existentes e a lista de agentes cancerígenos da Agência Internacional para a Investigação do Câncer (IARC) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), recentemente no Brasil, através da Portaria Interministerial nº 9, de 7 de outubro de 2014 foi publicada a Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (LINACH) (BRASIL, 2014). Essa lista que será atualizada semestralmente e servirá como referência para formulação de políticas públicas traz a samambaia entre os agentes possivelmente carcinogênicos

para humanos (grupo 2B), com base em evidências epidemiológicas e experimentais de carcinogenicidade e outros dados relevantes.

O leite de vaca proveniente de animais que pastejam em áreas invadidas por samambaia tem sido apontado como um fator de risco para algumas neoplasias em humanos (ALONSO-AMELOT et al., 1996, 1998, 2001; FRANCESCO et al., 2011; RASMUSEM, 2003; RASMUSEM; HANSEN; LAUREN, 2005; VILLALOBOS-SALAZAR; MENESES; PASHOV, 1990), sobretudo para indivíduos que consomem o leite na própria localidade de produção, sem diluição prévia no tanque de recolha ou sem processamento industrial. Uma preocupação adicional está no fato de que mesmo após o processo de pasteurização ou fervura do leite, embora ocorra uma diminuição de 50 a 75% da concentração de ptaquilosídeo, não se pode afirmar que este alimento se torne seguro para consumo (VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1999).

O potencial carcinogênico da planta foi testado através da administração por via oral (planta fresca, planta desidratada, água de fervura do broto, extrato aquoso da planta, leite cru e em pó proveniente de vacas doentes), intravenosa (dose baixa de ptaquilosídeo), e intraperitoneal com ptaquilosídeo (Quadro 1).

Quadro 1 Relação de estudos sobre a ação carcinogênica da samambaia (*P. aquilinum*) em ratos e camundongos

Referência	Animal	Via	Fonte	Dose	Duração	Resultado
Evans e Manson (1965)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i>	1/3 da dieta	64 dias	Adenocarcinoma de íleo.
Price e Pamukcu (1968)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i>	1/3 da dieta	8 meses	Adenocarcinoma de intestino.
Pamukcu e Price 1969	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i>	1/3 da dieta	29 semanas	Tumores intestinais e neoplasia de bexiga.
Hirono et al. (1970)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (seca)	33% da dieta	4 meses	Pólipos adenomatosos e sarcoma de íleo.
Hirono et al. (1972)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> após fervura e natural	NE ¹	4 e 9 meses	Adenoma e sarcoma de íleo com incidência menor no grupo <i>P. aquilinum</i> tratada.
Yasuda, Kihara e Nishimura (1974)	Camundongos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (seca)	33% da dieta	NE	Anomalia de costela, fusão incompleta do esterno e falta de ossificação nos embriões de grávidas.
Pamukcu, Erturk e Yalçiner (1978)	Camundongos	Oral	Leite (fresco e pó) de vacas ingerindo 1g de <i>P. aquilinum</i> /kg de PV/dia	Leite fresco 65 e 75 ml /dia e leite em pó 15 a 20g/rato/dia	+ de 10 meses	Tumor intestinal, renal, pélvico e vesical, isolados ou em combinação.
Hirono, Hosaka e Kuhara (1982)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (broto seco)	33% da dieta	4 meses	Tumor de íleo.
Hirono et al. (1983)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (broto seco)	33% da dieta	8 meses	Tumor de mama.
Hirono et al. (1984)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (broto)	30% da dieta	180 e 260 dias	Nódulos hiperplásicos no fígado.
Santos et al. (1986)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (broto seco)	33% da dieta	9 semanas	Neoplasia íleo.
Hirono et al. (1987)	RATOS	Oral	Ptaquilosídeo purificado	0,027g/ 0,08% da dieta	210 dias	Tumor de íleo e bexiga.
Santos et al. (1987)	Ratos	Oral	<i>P. aquilinum</i> (broto seco)	5% da dieta	70 semanas	Adenocarcinomas, sarcomas e adenomas no íleo.

¹ Trabalho original não consultado

Continuação...

Villalobos-Salazar, Meneses e Pashov (1990)	Camundongos	Oral	1. <i>P. aquilinum</i> (broto) 2. Leite de vacas alimentadas com <i>P. aquilinum</i>	I - 33% da dieta II - NR ¹	52 semanas	Adenocarcinoma mamário e adenoma pulmonar (1 e 2).
Santos et al. (1992)	Ratos	Oral	Água de fervura. (<i>P. aquilinum</i>)	<i>ad libitum</i>	54 dias	Tumor vesical e de íleo.
Shahin et al. (1998)	Ratos	Venosa	Ptaquilosídeo ativado (NaOH)	3mg / semana	10 semanas	Adutos de DNA e tumores de glândula mamária e íleo. Aumento no nível de monócitos e concomitante aumento do nível de TNF α .
Cruz et al. (2005)	Ratos	Oral	Extrato aquoso de broto <i>P. aquilinum</i>	<i>ad libitum</i>	15 meses	Degeneração hipóptica renal, necrose e atrofia vilosidade intestinal, neoformação polipoide e adenocarcinoma.
Freitas et al. (2002)	Ratos	Oral	1. <i>P. aquilinum</i> (broto seco) 2. Água de cocção da <i>P. aquilinum</i> como única fonte	1. 10% na ração 2. <i>ad libitum</i>	15 a 24 meses	Hiperplasia, adenoma, adenocarcinoma e carcinoma de íleo e bexiga; papiloma de bexiga (em ambos os grupos).
Egert et al. (2011)	Ratos	Oral	Leite cru vaca com Hematúria	NR	60 e 90 dias	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário discreto no duodeno, hiperplasia do GALT, projeções papiliformes na mucosa e um carcinoma de células escamosas.
Gil da Costa et al. (2012)	Camundongos	Intraperitoneal	Ptaquilosídeo isolado da planta dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) pH 5,7,4	0,5mg	15 semanas	Baixo grau de displasia urotelial (60%) e alto grau de displasia urotelial zonal (20%).

¹ Não relatado

Considerando que em diversos municípios do estado de Minas Gerais, como em todo Brasil, há pastos severamente invadidos por samambaia (ASSIS, 2008), que a ingestão espontânea ou condicionada por carência de forragem, por parte de bovinos, é muito comum em todo o país e também que a fabricação e o consumo de queijo produzido com leite cru é uma realidade nacional, mesmo nestas áreas, neste trabalho teve-se como objetivo inicial verificar, para ratos, o potencial tóxico do queijo produzido com leite de vacas que consomem quantidades significativas de *P. arachnoideum*.

Assim, investiga-se pela primeira vez se dietas experimentais elaboradas com queijo de leite de vacas saudáveis - mas que consumiam quantidades pequenas e conhecidas de samambaia (na tentativa de concentrar possíveis substâncias tóxicas) são capazes de promover em ratos algum tipo de alteração clínico-patológica, em médio prazo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos Setores de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e de Leite e Produtos Lácteos do Departamento de Ciência dos Alimentos, com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFLA (processo nº 51/10). Para a coleta do leite utilizaram-se duas vacas; diariamente era oferecido concentrado proteico (ração) acrescido de broto e folhas jovens de samambaia seca, na dose de 2g/kg/dia (lote de leite 1) e posteriormente, de 6g/Kg/dia (lote de leite 2). Mantidas em piquete com *Brachiaria* spp, com água e sal mineral *ad libitum* recebiam também volumoso (silagem de milho). O queijo foi produzido com leite cru (a partir dos lotes 1 e 2, separadamente) através de coagulação enzimática e após maturação de 10 dias em câmara fria foi ralado e congelado. Para o preparo das dietas o queijo foi descongelado em temperatura ambiente, e logo depois, misturado à ração comercial triturada, na proporção de 300g de queijo para 700g de ração. A mistura foi homogeneizada utilizando-se uma peneira de *mech* fina e água (na proporção de 400 ml/kg da mistura), peletizada manualmente e congelada.

Foram utilizados no ensaio biológico, 32 ratos Wistar, com 30 dias, provenientes da colônia de produção do Biotério do DMV, UFLA, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais, sendo dois grupos controle (A e B) e dois grupos experimentais (C e D). De acordo com a dieta e sexo, os grupos foram alojados em gaiolas, sendo cada um composto de quatro fêmeas (identificadas com o nº 1) e quatro machos (identificados com o nº 2).

Para comparação e validação dos resultados foram utilizadas quatro diferentes dietas na alimentação dos ratos. O grupo A recebeu apenas ração comercial da marca Nuvilab CR-1 (controle ração); o grupo B, ração comercial acrescida de 30% de queijo proveniente de vacas que não consumiram samambaia (controle ração com queijo); os grupos C e D, ração acrescida de

30% de queijo produzido com leite do lote 1 (2g/kg/dia) e ração acrescida de 30% queijo produzido com leite do lote 2 (6g/kg/dia) respectivamente. Nenhum agente iniciador da carcinogênese foi utilizado no presente estudo.

Os ratos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, forradas com cama de maravalha, trocada duas vezes por semana, com água potável e ração *ad libitum*, fornecida diariamente no período da manhã. No ambiente foi mantida a temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e ciclo de luz claro-escuro 12/12horas. O peso corporal dos animais foi registrado semanalmente e o consumo alimentar diário foi obtido através de pesagem da dieta antes e após a disponibilização para os animais.

O experimento teve duração de 25 semanas (176 dias) quando, após jejum de 12 horas, os ratos foram anestesiados com uma dose de 40 mg/Kg de pentobarbital sódico por via intraperitoneal, e eutanasiados em guilhotina.

Todos os ratos foram necropsiados imediatamente após a morte. Fragmentos de diversos órgãos (estômago, intestinos, bexiga, fígado e medula óssea) foram coletados, fixados com formaldeído 10% por 24 h, quando foram processados pelos métodos de rotina para obtenção de blocos de parafina. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE) e nessas avaliou-se qualitativamente todos os órgãos a fim de identificar quaisquer alterações patológicas.

3 RESULTADOS

O consumo das dietas, por cada grupo (de quatro ratos), foi verificado e registrado como a média de ingestão diária durante os 176 dias do ensaio como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 Consumo médio diário (gramas) da dieta disponibilizada e estimativa dos teores de ptaquilosídeo consumido

Grupos	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
Consumo médio	64,97	85,54	96,29	131,15	97,50	139,00	95,74	131,43
Desvio padrão	12,33	11,82	16,65	21,45	18,59	22,59	19,83	21,45
Teores de PTA (μg) ¹	0	0	0	0	5.000	7.130	13.014	17.864

A= ração comercial, B= ração queijo controle, C= ração queijo lote1, D= ração queijo lote 2.

1= Fêmeas; 2= Machos

PTA= ptaquilosídeo

Observou-se que a adição do queijo, de acordo com a dieta proposta, foi bem aceita pelos ratos e não interferiu no crescimento normal dos animais. A Figura 1 demonstra o acompanhamento semanal do ganho de peso dos animais durante o período experimental.

¹ Estima-se que os teores de ptaquilosídeo presente na ração dos grupos C e D (elaborados com o leite das vacas que ingeriram 2 e 6 g/kg/dia de samambaia) sejam de 205.195 μg e 543.649 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ração preparada, respectivamente. Considerando que cada animal do grupo C teria consumido em média 24,37 g/dia (fêmea) e 34,75 g/dia (macho) e do grupo D teria consumido em média 23,94 g/dia (fêmea) e 32,86 g/dia (macho), a ingestão diária média de ptaquilosídeo corresponderia no máximo a 5.000, 7.130, 13.014 e 17.864 μg .

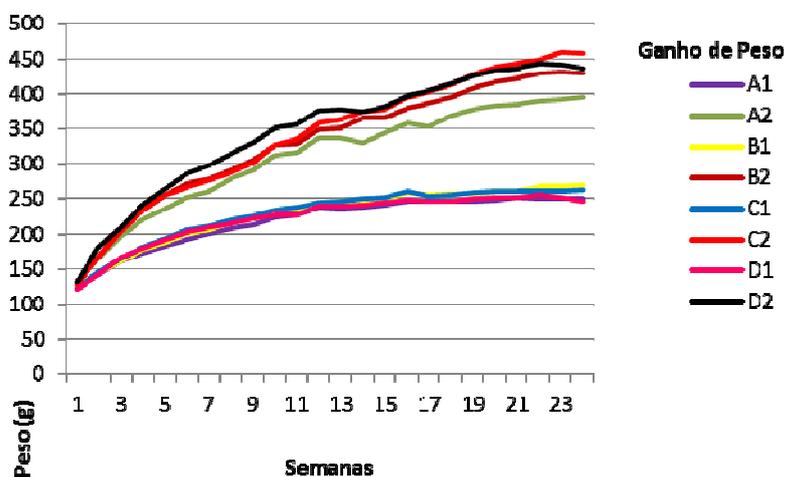


Figura 1 Ganho de peso dos ratos Wistar durante o período de consumo da dieta experimental

Na avaliação sistemática dos órgãos dos ratos deste estudo não se observou quaisquer alterações macroscópicas. Na análise histopatológica (Tabela 2) de estômago, intestinos e bexiga de todos os grupos experimentais observaram-se alterações de proliferação e diferenciação celular (Figuras 2-4), exceto nos grupos controle (A e B). Nos demais órgãos não foram observadas quaisquer alterações significativas.

Tabela 2 Lesões histopatológicas observadas nos ratos que receberam as dietas experimentais

LESÕES	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
ESTÔMAGO								
Hiperplasia epitelial (camada basal, escamosa ou granulosa)	-	-	-	-	-	1	2	4
Cariomegalia	-	-	-	-	-	1	2	4
Perda da organização das células epiteliais na membrana basal	-	-	-	-	-	1	2	4
INTESTINO								
Hiperplasia de criptas	-	-	-	-	1	-	-	-
Rarefação do tecido linfoide	-	-	-	-	-	-	4	4
Evidenciação do tecido fibro-vascular da lâmina própria	-	-	-	-	1	-	4	4
BEXIGA								
Hiperplasia da mucosa	-	-	-	-	1	-	2	2
Anisocariose e/ou cariomegalia	-	-	-	-	-	-	-	2
Células bi ou multinucleada	-	-	-	-	1	1	2	1
Nucléolos evidentes	-	-	-	-	1	1	-	1
Evidenciação do tecido fibro-vascular da lâmina própria	-	-	-	-	-	-	2	-

A= ração comercial, B= ração queijo controle, C= ração queijo lote1, D= ração queijo lote 2.
1= Fêmeas; 2= Machos.

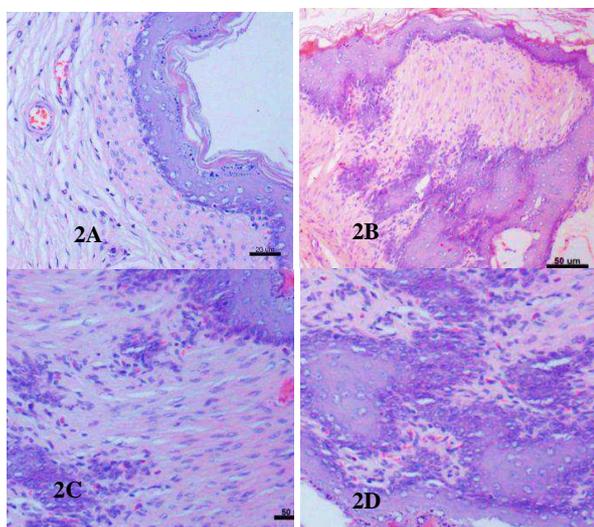


Figura 2 Estômago (porção não-glandular): 2A) Estômago normal (HE, obj. 20x); 2B) Hiperplasia acentuada com projeções epiteliais para a submucosa (HE, obj. 10x); 2C) Células da camada basal agrupadas na submucosa, sem continuidade com o epitélio de revestimento (HE, obj. 10x); 2D) Notar a desorganização do epitélio proliferado (HE, obj. 20x).

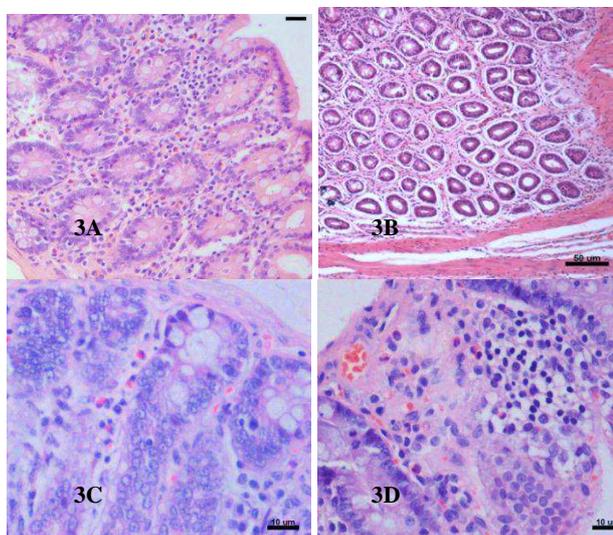


Figura 3 Intestino: 3A) Intestino normal; 3B) Maior evidência do tecido fibro-vascular da lâmina própria e rarefação do tecido linfoide (HE, obj. 20x); 3C) Criptas com maior celularidade (HE, obj. 10x); 3D) Células linfoides picnóticas (HE, obj. 40x).

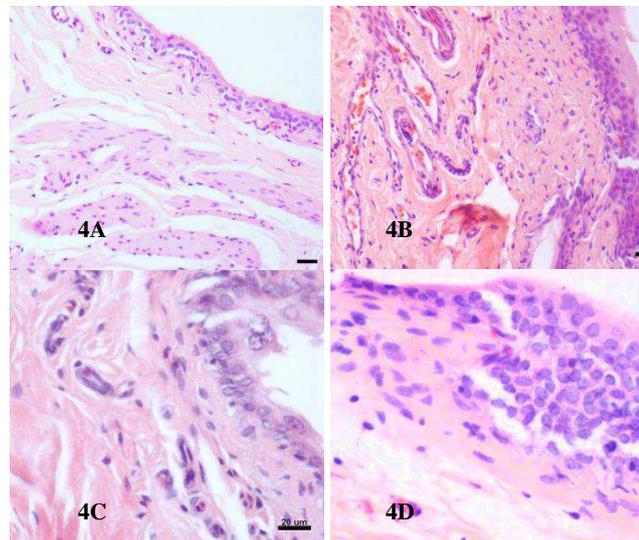


Figura 4 Bexiga: **4A)** Bexiga normal (HE, obj. 10x); **4B)** Hiperplasia da mucosa e maior evidência do tecido fibro-vascular da lâmina própria (HE, obj. 20x); **4C)** Mucosa com moderada anisocariose, com células trinucleadas (HE, obj. 40x); **4D)** Hiperplasia focal moderada (HE, obj. 40x)

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, assim como feito por Egert et al. (2011), para investigar a ação carcinogênica do queijo não foi utilizado nenhum agente iniciador. Já em muitos estudos experimentais agentes iniciadores da carcinogênese (HIRONO; HOSAKA; KUHARA, 1982) ou compostos tóxicos purificados (VILLALOBOS-SALAZAR; MENESES; PASHOV, 1990) vêm sendo utilizados.

Neste estudo houve a substituição de apenas 30% da dieta convencional, utilizando queijo de vacas saudáveis e que consumiam pequena quantidade de samambaia, que é uma realidade observada em muitos locais. Alonso-Amelot e Avendaño (2002) já alertavam para algumas situações de risco, especialmente em alguns países da América Latina, onde acredita-se que em pequenas explorações de bovinos leiteiros e com baixa tecnologia, um copo de leite poderia conter entre 0,7 a 1,2 mg de ptaquilosídeo. A produção de queijo é basicamente um processo de concentração de parte dos componentes sólidos do leite, principalmente proteína e gordura, enquanto os sólidos solúveis são removidos no soro que representa aproximadamente 85 a 90% do volume total do leite (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). Uma vez que o ptaquilosídeo, um glicosídeo norsesquiterpeno ($C_{20}H_{20}O_8$), é solúvel em água (RASMUSSEM; HANSEN; LAUREN, 2005), não se sabe se ele pode ter sido total ou parcialmente perdido no soro e qual sua concentração na massa do queijo, que apresentou teor de umidade de 57%. Vale lembrar ainda que o ptaquilosídeo é um composto instável em solução aquosa na presença de ácido, base ou calor, degrada-se muito rapidamente em pterossina B – que é mais estável (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007).

Apesar de a temperatura usada durante o preparo do queijo não ter ultrapassado os 35°C, no processo de fabricação há acidificação do leite, sendo possível a conversão do ptaquilosídeo em pterossina B, que é um composto mais apolar e, portanto, com maior afinidade pela gordura, que é mais concentrada no queijo em relação ao leite.

Nenhuma lesão foi detectada à avaliação macroscópica dos órgãos dos ratos deste estudo. Acredita-se que além do tempo de ingestão praticado, o nível de toxicidade da ração elaborada para este ensaio foram fatores limitantes para o aparecimento de lesões visíveis macroscopicamente. De acordo com Fenwick (1988), em animais de laboratório a carcinogênese promovida pela samambaia é modulada pela dose, processamento da amostra e tempo de exposição. Nos experimentos em que o leite de vacas que consumiam/consumiram samambaia foi utilizado na alimentação de animais de laboratório observou-se a formação de tumores estomacais (EGERT et al., 2011), intestinais, renais e/ou vesicais (PAMUKCU; ERTURK; YALÇINER, 1978), pulmonares e/ou mamários (VILLALOBOS-SALAZAR; MENESES; PASHOV, 1990). No entanto, apenas no trabalho realizado por Pamukcu, Erturk e Yalçiner (1978) relatou-se que foi possível a observação macroscópica de nódulos múltiplos, principalmente no íleo, de 5 a 15 mm de diâmetro e na bexiga como formações pedunculares ou não.

As alterações histológicas observadas em alguns órgãos dos animais deste estudo são compatíveis com uma resposta proliferativa que muitas vezes está correlacionada a injúrias químicas e podem ocorrer em uma fase precoce da carcinogênese. O grupo D, especialmente os machos (D2) foram os mais acometidos, o que pode estar correlacionado a uma maior ingestão diária média de ração (32,86 g/dia), a qual foi elaborada com o queijo produzido com leite do lote 2, oriundo das vacas com ingestão de uma maior quantidade de samambaia seca (6g/kg/dia).

Na porção não glandular do estômago foram observadas proliferação de células da camada basal, espinhosa e/ou granulosa, núcleos grandes e perda de continuidade da lâmina basal em 75% (6/8) dos ratos do grupo D, que ingeriram ração feita com queijo cujo leite era oriundo das vacas que consumiam uma maior dose de samambaia na dieta. A ausência de inflamação, erosão e/ou ulceração associada à hiperplasia indica tratar-se do desenvolvimento precoce de uma

neoplasia (FRANTZ et al., 1991). A perda da organização das células epiteliais na membrana basal mais evidente também no grupo D (6/8 ratos) é indicativa de alteração nesta estrutura. Em neoplasias de diversas origens, a perda da membrana basal tem sido observada em áreas com perda de diferenciação celular e indicam que nessas regiões haverá progressiva invasão neoplásica no estroma adjacente. Isso é possível porque além de funcionar como uma importante barreira estrutural, a membrana basal atua como limite para a invasão neoplásica e ainda participa da sinalização no processo da angiogênese, tendo diversas moléculas (fatores de crescimento e citocinas) liberadas e ativadas apenas quando ocorre sua dissolução (SOUZA et al., 2007).

Apesar da duração prolongada (25 semanas) do presente estudo, não foram evidenciadas neoplasias. Ao contrário, no experimento realizado por Egert et al. (2011), a administração por gavagem de leite *in natura*, proveniente de vacas com HEB, resultou no desenvolvimento de projeções papiliformes na mucosa do estômago e de um carcinoma de células escamosas *in situ* após um período de 90 dias, em um de oito ratos do grupo experimental. Esses resultados causam estranheza, especialmente devido ao curto tempo de exposição e à baixa incidência observada. Dessa forma, deve-se considerar também a possibilidade de tratar-se de uma neoplasia espontânea, que apesar de rara em ratos, pode ocorrer na bexiga (FRITH et al., 1995), intestino (ALTMAN; GOODMAN, 1979) e estômago (FRANTZ et al., 1991). Além disso, sabe-se que muitas vacas doentes nem sempre estão consumindo a planta no momento em que manifestam a doença (PINTO, 2010) e que o ptaquilosídeo ingerido pode ter sido eliminado em até 5 dias de cessado o consumo da planta (ALONSO-AMELOT et al., 1998).

No intestino, a hiperplasia de criptas associada à proliferação do estroma fibro-vascular também são alterações significativas que podem demonstrar uma fase precoce da carcinogênese. Sabe-se que a atividade coordenada das células epiteliais com o estroma é fundamental no crescimento e diferenciação em situações

fisiológicas e patológicas, inclusive no câncer (DONDOJACOUR; CUNHA, 1991). Os fibroblastos estromais sofrem mudanças quantitativas e morfológicas durante a progressão tumoral (HOWLETT; BISSEL, 1993; SCHURCH; SEEMAYER; LAGACE, 1981) e desempenham função central na interação tumor x estroma (RONNOV-JESSEN; PETERSEN; BISSELL, 1996), sendo portanto modificações compatíveis com a resposta do organismo à presença de um agente tóxico ingerido.

A inflamação é considerada um constituinte importante do microambiente tumoral, devida liberação de mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas, bem como células da imunidade inata e adaptativa, em nosso estudo observou-se rarefação do tecido linfóide associado ao intestino. É possível que assim como observado por Latorre et al. (2011) tenha ocorrido uma diminuição da resposta imune celular secundária ao efeito tóxico de *P. arachnoideum*. Em seu estudo com camundongos, os pesquisadores observaram diminuição da resposta de hipersensibilidade tardia nos grupos tratados com 10 e 30 g/kg de samambaia, redução da citotoxicidade das células NK, redução da polpa branca do baço, diminuição da camada celular do timo e desorganização dos folículos linfóides nos linfonodos mesentéricos e placas de Peyer dos camundongos tratados com a dose de 30 g/kg de samambaia e diminuição na celularidade da medula óssea em todos os grupos tratados com a samambaia, por 14 dias.

Na bexiga de alguns animais do presente estudo algumas alterações indicativas de maior proliferação celular foram observadas, em especial a hiperplasia. Apesar da bexiga de ratos ser utilizada em estudos com uma variedade de carcinógenos (FRITH et al., 1995), o desenvolvimento de neoplasias demanda um certo tempo de exposição ao(s) composto(s) tóxico(s) presente(s) na urina. Durante esse processo, as alterações morfológicas iniciais são de hiperplasia simples, que progridem para hiperplasia nodular ou papilar e por fim, neoplasia (COHEN, 2002). Em ratos, a hiperplasia (focal ou difusa, caracterizada por um urotélio com três ou mais camadas) raramente ocorre como lesão espontânea, mas é

uma resposta comum após exposição a agentes carcinogênicos ou devido a cistites ou cálculos (FRITH et al., 1995). Assim, é possível considerar as alterações observadas na bexiga como lesões pré-neoplásicas, secundárias ao consumo das dietas utilizadas.

Apesar de indicarem uma resposta regenerativa do urotélio à injúria, provocada pelo contato com algum composto tóxico, não houve tempo para que a neoplasia se desenvolvesse. Em experimentos com duração mais prolongada, como nos de Pamukcu, Erturk e Yalçiner (1978), estes verificaram neoplasias únicas ou múltiplas em diversos órgãos (inclusive na bexiga), apesar de utilizarem na dieta de ratos, leite proveniente de vacas que consumiram apenas 1 g de samambaia/Kg/dia.

Desenvolveram tumores, nove entre 34 animais do grupo 1 (que recebeu aproximadamente 65 a 75 ml/dia/animal de leite fresco, por 47 a 141 semanas) e 11 de 56 animais do grupo 2 (que recebeu dieta adicionada de cerca de 7,5 g/dia/animal de leite em pó - sendo que em 1 litro de leite obteve-se 90g de leite em pó, por 31 a 117 semanas). Na bexiga descreveram-se papiloma, carcinoma de células transicionais e carcinoma de células escamosas; no intestino, fibroadenoma, adenocarcinoma, fibrossarcoma, hemangiossarcoma e fibrohemangiossarcoma; e rins, carcinoma de células transicionais.

Acredita-se que a ingestão de alguma(s) substância(s) tóxica(s) presentes no queijo em estudo seja o fator responsável pelo desenvolvimento das alterações de proliferação celular observadas, independentemente de sua (s) concentração (ões). Apesar de não terem sido testados os níveis de ptaquilosídeo no leite e/ou queijo utilizados na elaboração da dieta dos ratos, sabe-se que mesmo em doses baixas, o princípio tóxico promove imunossupressão (LATORRE et al., 2011; PEREIRA, 2006; RASMUSSEN, 2003), além de induzir anormalidades cromossômicas em linfócitos circulantes (RECOUSO et al., 2003), e atuar como um agente cancerígeno, mutagênico, clastogênico e teratogênico (TOURCHIROUDSARI, 2014).

5 CONCLUSÕES

As lesões observadas no estômago, bexiga e intestinos dos animais submetidos ao protocolo experimental sugerem que o consumo indireto do agente tóxico da samambaia, possivelmente presente no queijo, produzido com leite de vacas que a consumiram, constituem uma fase precoce da carcinogênese (iniciação).

Através da evidenciação de proliferações celulares, reconhecidas como lesões pré-neoplásicas é possível predizer os riscos aos quais a população humana também pode estar sendo submetida. Dessa maneira, apesar de haver inúmeras variáveis e diversos agentes carcinogênicos aos quais os homens são expostos durante a vida, o consumo de leite e seus derivados, oriundos de vacas sadias, mantidas em pastos com samambaia (mesmo consumida eventualmente ou em pequenas quantidades), representa um fator de risco no desenvolvimento de alterações na proliferação celular.

A quantificação do teor de ptaquilosídeo na planta e no leite utilizados neste estudo, bem como a busca de um protocolo para determinação do teor desta substância no soro e queijo vêm sendo estudados no intuito de estabelecer as reais concentrações desse princípio.

6 AGRADECIMENTOS

Fapemig e UFLA.

REFERENCIAS

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDANO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: review of the evidence. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 9, n. 6, p. 675-686, 2002.

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

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

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Excretion through milk, of ptaquiloside in Bracken-fed cows. A quantitative assessment. **Lait**, Les Ullis, n.78, p. 413-423, 1998.

ALONSO-AMELOT, M. E. Helecho macho, salud animal y salud humana. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, n. 16, p. 528-541, 1999.

ASSIS, F. C. **A família dennstaedtiaceae pic. Serm. Senu lato (polypodiopsida) no estado de Minas Gerais, Brasil**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ATTYA, M. et al. A new facile Synthesis of D 4 -Pterosin B and D 4 - Bromopterosin, Deuterated Analogues of Ptaquiloside. **Molecules**, Basel, n. 17, p. 5795-5802, 2012.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria Interministerial nº 9, de 7 de outubro de 2014. Publica a Lista Nacional de Agentes Cancerígenos para Humanos (LINACH), como referência para formulação de políticas públicas. **Diário Oficial [da] União**, seção 1, nº 194, p. 142, 8 de outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/autenticidade.htm.código00012014100800142>>. Acesso em: 16 out. 2014.

COHEN, S. M. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 30, n. 6, p. 663–671, 2002.

EGERT, L. et al. Alterações do trato gastrointestinal de ratos submetidos à dieta com leite de vacas intoxicadas por *pteridium arachnoideum*. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 15., e CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1., 2011, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EVZ/UFG, 2011. 1 CD ROM.

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

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*)-Toxic effects and to constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, n. 46, p. 147-173, 1988.

FRANÇA, T. N.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 85-96, 2002.

FRANCESCO, B. et al. A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. **Food Chemistry**, Barking, v. 124 p. 660–665, 2011.

FRANTZ, J. D. et al. Proliferative lesions of the non-glandular and glandular stomach in rats. In: STREETT, C. S. (Ed.). **Guides for toxicologic pathology**. Washington: STP/ARP/AFIP, 1991. p. 1–20.

FRITH, C. H. et al. Proliferative lesions of the lower urinary tract in rats, URG-2. In: STREETT, C. S. (Ed.). **Guides for toxicologic pathology**. Washington: STP/ARP/AFIP, 1995. p. 1–13.

FURLAN, F. H. et al. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2014.

GIL COSTA, R. M. et al. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal of hazardous Materials**, Amsterdam, v. 1, n. 12, p. 203-204, 2012.

HIRONO, I.; HOSAKA, S.; KUHARA, K. Enhancement by bracken of induction of tumours of upper alimentary tract by N-propyl-N-Nitrosourethane, Br. **Journal of Cancer**, Baltimore, v. 46, p. 423-427, 1982.

HOJO-SOUZA, N. S.; CARNEIRO, C. M.; SANTOS, R. C. *Pteridium aquilinum*: o que sabemos e o que ainda falta saber. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 5, p. 798-808, set./out. 2010.

HOWLETT, A. R.; BISSELL, M. J. The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. **Epithelial Cell Biology**, Boston, v. 2, p. 79- 89, 1993.

LATORRE, A. O. et al. Selenium reverses *Pteridium aquilinum*-induced immunotoxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, n. 49, p. 464-470, 2011.

PAMUCKU, A. M.; ERTURK, E.; YALÇINER, S. Carcinogenic and mutagenic activities of milk From cows fed Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, p. 1556-1560, 1978.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 367/368, n. 64, p. 19-25, mar./jun. 2009.

PEREIRA, L. O. **Apoptose induzida por extrato aquoso de *Pteridium aquilinum* em células da glândula submandibular humana (HSG) e de epitélio bucal (OSCC-3)**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas de Brasília, Brasília, 2006.

PINTO, C. A. **Hematuria enzoótica bovina: contribuição para o seu estudo etiopatogênico**. 2010. 206 p. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Universidade técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2010.

POTTER, D. M.; BAIRD, M. S. Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. **British Journal of Câncer**, Edinburgh, v. 83, n. 7, p. 914–920, 2000.

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

RASMUSSEN, L. H. et al. Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. **Chemosphere**, Oxford, v. 51, p. 117–127, 2003.

RASMUSSEN, L. H.; HANSEN, H. C. B.; LAUREN, D. Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium* sp.) constituent, in the soil environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 58, p. 823-835, 2005.

RASMUSSEN, L. H. **Ptaquiloside an environmental hazard? Occurrence and fate of a Bracken (*Pteridium* sp.) toxin in terrestrial environments**. 2003. 124 p. Thesis (Ph.D) - The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 2003.

RECOUSO, R. C. et al. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. **Veterinary and Comparative Oncology**, Hoboken, v. 1, n. 1, p. 22–29, 2003.

RIBEIRO, S. C. et al. Regeneração natural em áreas desmatadas e dominadas por por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. na serra da Mantiqueira. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 65-76, jan./mar. 2013.

RONNOV-JESSEM, L.; PETERSEN, O. W.; BISSELL, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 76, p. 69-125, 1996.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T. A.; LAGACE, R. Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas. A combined immunological, light and electron microscopic study. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, Berlin, v. 391, p. 125-139, 1981.

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**, Orlando, v. 244, p. 192-197, 1998.

SOUZA, L. F. P. et al. Expressão da laminina na membrana basal em carcinoma escamocelular oral. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 6, p. 768-774, 2007.

TOKARNIA, C. H. et al. **Plantas tóxicas do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 586 p.

TOURCHI-ROUDSARI, M. Multiple effects of bracken fern under in vivo and in vitro conditions. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. Bangkok, v. 15, n. 18, p. 7505-7513, 2014.

ULIAN, C. M. V. et al. *Pteridium aquilinum* na alimentação humana: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 2, p. 64-69, 2010.

VILLALOBOS-SALAZAR, J. et al. Factors which may affect ptaquiloside levels in milk; effects of altitude, bracken fern growth stage, and milk processing. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Ed.). **Bracken fern: toxicity, biology and control**. Aberystwyth: International Bracken, 1999. p. 68-73.

VILLALOBOS-SALAZAR, J.; MENESES, A.; PASHOV, B. Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on bracken fern. In: THOMPSON, L. A.; SMITH, R. T. (Ed.). **Bracken biology and management. AIAS Occasional Publication**, Melbourn, v. 40, p. 247-251, 1990.

YAMADA, K.; OJIKAWA, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product Reports**, London, v. 24, p. 798–813, 2007.

YASUDA, Y.; KIHARA, T.; NISHIMURA, H. Embryotoxic effects of feeding bracken fern *Pteridium aquilinum* to pregnant mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 28 p. 264–268, 1974.