

Diagnostic bovine Enzootic Hematuria Safety and Milk in Bolívar Province Ecuador

Ángela Calderón Tobar

Universidad Estatal de Bolívar
Av. Che Guevara S/N y Gabriel Secaira
Guaranda
Ecuador

Luz María Sánchez

Betty Mancebo

Evangelina Marrero Faz

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
Apartado 10, San José de las Lajas
Mayabeque
Cuba

Carlos Bulnes Goicochea

Universidad Agraria de La Habana
Facultad de Medicina Veterinaria
Autopista Nacional y Carretera de Tapaste
San José de las Lajas
Mayabeque
Cuba

Ximena Chiriboga

Universidad Central del Ecuador
Ciudadela Universitaria. Av. América
Quito
Ecuador

José Silva

Ministerio de Agricultura, Ganadería
Acuicultura y Pesca (MAGAP-G)
Guaranda
Ecuador

Abstract

Many chemical compounds present in toxic plants can seriously affect animal health and human health through the food chain. In Bolívar County, there were indications of scientifically supported referrals for clinical diagnosis animal veterinarian with "blood in urine" and grazing are as invaded by ferns, which raised the suspicion of Bovine Enzootic Hematuria (BEH), therefore was required to diagnose the entity and study the magnitude of the problem, both for the health of the cattle herd and in scope to the food chain to man, constituting the research problem. The study developed provides scientific results in a comprehensive way in Ecuador, on risk factors, clinical and pathological diagnosis of BEH and quantification of ptaquilósido in the plant and milk Bolívar Province, showing that chronic poisoning is caused by their peated administration of Pteridium arachnoideum (Kaulf.) Maxon invading grass lands between 60 and 100%, Showing that the hematuria and deaths are associated with his plant, with an odds ratio of 19.55 and 6.77 and prevalence of 8.7%.

Clinical outcomes denoted the presence of hematuria with a prevalence of 71.8% and chronic anemia in correspondence to the severity of the degree of hematuria. 53.5% of tumor lesions in urinary bladder and esophagus associated with BEH in Babahoyo slaughterhouse was determined. Ptaquillo side concentrations in the fronds of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf) Maxon found, from 107.7 µg /g to 8677.68 µg/g; in fresh milk ptaquillo side residual levels was detected in 89.29 % of the samples with concentrations up to 2641.13 µg /mL. The present study represents a scientific contribution and envisions the potential damage to the public health of this region.

Keywords: Bovine Enzootic Hematuria, toxicosis plants, neoplasms, *Pteridium arachnoideum*, ptaquiloside, residues in bovine milk, HPLC.

Introducción

La necesidad de alimentos de origen animal para satisfacer los requerimientos nutricionales del hombre, no solo demanda del incremento en cantidad y calidad nutritiva de estos a partir de una explotación comercial correcta de las especies animales involucradas, sino también se tenga presente en estas crianzas la ingestión de alimentos seguros, desprovistos de sustancias nocivas para los propios animales y consecuentemente para la salud humana. El interés creciente por el conocimiento de los tóxicos naturales, ha cobrado fuerza en la actualidad y constituye hoy en día, uno de los aspectos más relevantes de la toxicología veterinaria moderna. Existen plantas que al ser ingeridas de manera directa por los animales y el hombre, pueden comprometer seriamente la salud de estos, causando cuadros clínicos de intoxicaciones que no siempre se manifiestan de manera repentina (tóxicosis aguda), sino de una forma más solapada, produciendo daños a más largo plazo, causando cuadros clínicos de tóxicosis crónicas (Marrero, 2008; Marrero *et al.* 2010).

Por otra parte, muchos compuestos químicos que se encuentran presentes en las plantas pueden afectar la salud humana por su ingestión a través de la cadena alimentaria, al consumir productos procedentes de animales, carne, leche y huevos, por lo que resulta un aspecto de vital importancia a tener en cuenta en la calidad de estos alimentos (Alonso-Amelot y Avendaño, 2002; Rasmussen *et al.* 2012; Rasmussen *et al.* 2013). En este orden de ideas se ha reportado la invasión de helechos tóxicos correspondiente a la especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (bracken fern o simplemente bracken) que afecta negativamente la crianza animal vacuna en diferentes regiones ganaderas del mundo y en particular de América Latina (Gomes *et al.* 2012; Sharma *et al.* 2013; Rasmussen *et al.* 2013), de ahí que los animales que consumen la planta resultan intoxicados de forma aguda o crónica en dependencia de la exposición al tóxico. Dentro de las entidades clínicas tóxicas atribuidas a la ingestión de este helecho en animales de granja es la Hematuria Enzootica Bovina (HEB). Esta entidad ha sido definida como una enfermedad mortal de curso crónico que se acompaña de neoplasias malignas en la vejiga urinaria, la cual se debe al consumo reiterado de helechos de *P. aquilinum*, contenido del compuesto carcinogénico ptaquilósido, por parte de los rebaños vacunos expuestos al pasto contaminado con dicha planta (Riet-Correa *et al.* 2009).

La magnitud del problema de la gran distribución de la planta tóxica asociada a la HEB, en diferentes regiones del mundo, representa serias afectaciones al desarrollo de la ganadería vacuna y con alcance a los consumidores en la cadena alimentaria. Se señala que para prevenir las pérdidas económicas muchos campesinos envían a los animales con esta condición al sacrificio antes de que se produzca el rápido deterioro de estos. De ahí que la problemática existente es muy preocupante no solo en términos de la salud del rebaño, sino que detrás de ello están en riesgo los consumidores al ingerir los productos alimenticios, que forman parte de la dieta básica de la población, contaminados con el tóxico ptaquilósido. Estos antecedentes, más la presencia de bovinos con cuadros clínicos de “sangre en orina”, áreas de pastoreo invadidas por helechos, afectación de la producción en estas áreas, entre otros aspectos, hicieron sospechar con fuerza que la HEB está presente en estas zonas ganaderas, por lo que se requería diagnosticar la entidad y estudiar la magnitud del problema, como base para la toma de acciones que contribuyan a mitigar la gravedad del proceso, tanto para la salud del rebaño bovino como por su alcance a la cadena alimentaria al hombre, a partir de las concentraciones del ptaquilósido en la leche, que altera su inocuidad, por lo que esto constituyó el Problema de la Investigación.

Metodología

Ubicación geográfica donde se efectuó la investigación

La investigación se desarrolló en fincas ganaderas de pequeños productores ubicadas en los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar, Ecuador, durante los años 2010 a 2013.

La Provincia está situada en el Centro-Oeste del Ecuador. Limita al Norte con la Provincia de Cotopaxi, al Sur con la Provincia del Guayas, al Este con las Provincias de Tungurahua y Chimborazo y al Oeste con la Provincia de los Ríos. Es la Provincia más pequeña del Ecuador con una extensión total de 3559 Km². Posee la variedad de pisos climáticos existentes en la región interandina; es decir comenzando por el tropical monzón, pasando por el mesotérmico húmedo y semihúmedo, hasta el páramo de las altas mesetas andinas, comparten zonas con temperaturas frías a subtropicales que oscilan entre los 8 °C a 25 °C; altitud general desde los 300 m.s.n.m., hasta los 2668 m.s.n.m. La producción agropecuaria es la base económica de los Cantones de la provincia; en la ganadería sobresalen la bovina y la porcina, la primera tiene un menor volumen de producción y está orientada a la producción de ganado de carne y leche. (Gobierno provincial de Bolívar, 2015).

1.- Estudio epidemiológico

a. Encuestas

Para el estudio epidemiológico se realizó una encuesta a todos los miembros (n= 57) de las asociaciones ganaderas de los cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandia para el análisis de síntomas clínicos y muertes acompañado de hematuria en los bovinos (N=2267) con algunos posibles factores de riesgo asociados a la ingestión de helechos del Género *Pteridium*.

b. Identificación botánica y estimado del grado de la presencia de *Pteridium* spp en los pastos.

Se tomaron muestras de helechos de *Pteridium* spp., las que fueron herborizadas y llevadas al Herbario de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador y del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba para su identificación botánica. Para valorar el grado de la presencia de los helechos en los pastos de las fincas afectadas (n= 57), se empleó la escala establecida por Braun Blanquet (1979) agrupando por clases de acuerdo al porcentaje (%) de presencia de la especie en estudio.

2.- Estudio clínico

Para este estudio participaron 27 fincas, donde se realizó inspección clínica, muestreo de orina y sangre (n=74) equivalente al 13 % de la masa total (N=554) bovinos machos y hembras de diferentes edades, doble propósito, mestizos, predominando el cruce Brahman con Brown-Swiss. Se realizó muestreo general para la detección de enfermedad según metodología de Mateu y Casal, 2003 (con la finalidad de saber si la enfermedad existe o no en una población, independientemente si hay mucha o poca), se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \left[\frac{-(1-a)^{1/D}}{a} \right] \times \left[\frac{N-(D-1)/2}{a} \right]$$

Dónde: n= tamaño de la muestra

a= nivel de confianza (95 %)

D= número de animales enfermos en la población. (10 %)

N= tamaño de la población (2267)

La aplicación de esta fórmula presupone que en caso de estar presente la enfermedad en una población, ésta presentará una prevalencia mínima.

$$n = \left[\frac{-(1-0,95)^{0,044}}{0,044} \right] \times \left[\frac{2267-(226-1)/2}{0,044} \right] \quad n = 28$$

2. a. Inspección Clínica del rebaño

Se realizó inspección clínica general del rebaño para ver el estado de carne, presencia de hematuria, examen de las mucosas conjuntivales, toma de la temperatura rectal y actitud del animal.

2. b. Toma de muestras de orina

Para determinar sangre en la orina (hematuria), se utilizó la técnica de tiras reactivas, (Sánchez-Villalobos *et al*, 2006). Se realizó la recolección (10 mL) en tubos de vidrio con tapa rosca estériles a través de micción espontánea en las primeras horas de la mañana y se procesó *in situ* con tiras reactivas (COMBUR-TEST®, 10SL de Analyticon Biotechnologies, Alemania, distribuido en Ecuador por IMPROLAB S.A). Estas muestras fueron así mismo conservadas en frío (4 ° C) para realizar el examen microscópico del sedimento urinario por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y microscopio de luz con objetivo 40X, en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Estatal de Bolívar.

2. c. Toma de muestras de sangre

Para los análisis hematológicos se colectaron 5 mL de sangre de la vena coxígea los que se depositaron en tubos IDEXX VetTube™ (IDEXX LABORATORIES VetLAB® USA) conteniendo Etilen-Diamino-Tetra-Acetato de Sodio (EDTA) (1 mg/mL de sangre), previamente tapados y esterilizados. Para la determinación de hemoglobina, hematocrito, conteo total de eritrocitos, los índices hematimétricos o constantes corpusculares (VCM, CHCM) y conteo total de leucocitos, se utilizaron por cada parámetro 111 µL de sangre, realizándose las determinaciones en un analizador IDEXX VetAutoread™, (IDEXX LABORATORIES VetLab® USA), según los procedimientos del fabricante. También se realizó frotis sanguíneo para evidenciar la posible presencia de hemoparásitos: *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*. Todos los análisis fueron realizados en el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador.

3 Estudio anatomopatológico

Para este estudio se inspeccionaron la vejiga urinaria y el esófago de 228 animales faenados en el matadero de Babahoyo, donde tributaban los animales de la provincia Bolívar en los meses de julio y agosto de 2012. Para el examen macroscópico de vejiga, se tuvo en consideración su contenido (en el caso de las vejigas que no estaban vacías) y las características de la orina; así como, la apariencia morfológica de la mucosa vesical. En el caso del esófago, se extrajo el órgano considerando su porción anterior (desde la región orofaríngea hasta su inserción en el cardias), se hizo una incisión longitudinal y se procedió a la observación de la mucosa del mismo. Atendiendo a las características macroscópicas de las lesiones encontradas, se clasificaron en cuatro grupos:

Grupo I: Vejigas que presentaron alteraciones vasculares leves, (congestión difusa de la mucosa, edema y dispersos focos hemorrágicos de tipo petequiales o equimóticos), sin que se observaran lesiones de carácter tumoral.

Grupo II: Vejigas que presentaron alteraciones vasculares leves y/o severas, unido a cambios tisulares que indiquen lesión tumoral, caracterizadas por protuberancias de la mucosa, focales o difusas y aumento del grosor de la misma con incremento de la consistencia.

Grupo III: Alteraciones de la mucosa del esófago, dadas por la presencia de estructuras de aspecto papiliforme, ramificado o no, y se consideró la localización y el número de lesiones presentes.

Grupo IV: Se consideraron los animales que presentaron lesiones en la mucosa del esófago y en la vejiga urinaria, independientemente de la gravedad de las lesiones observadas. Para el estudio histopatológico se tomaron muestras del 25% de las lesiones presentes en la vejiga y en el esófago, las que se fijaron en solución de formol neutro tamponado al 10%, se procesaron por la técnica clásica de corte e inclusión en bloques de parafina y se colorearon con hematoxilina y eosina siguiendo los procedimientos establecidos por Winston *et al.*, 2010 para estos fines, en el Laboratorio Clínico Hormonal e Histopatológico (CORPOLAB) de Guaranda, Ecuador. Las observaciones se realizaron en un video microscopio modelo ME-2000 BILL, Serie No. 00BLEC1028 del laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad Estatal de Bolívar, donde se tomaron las imágenes correspondientes.

4.- Concentración de ptaquilósido en *Pteridium arachnoideum* y su residualidad en leche fresca de bovinos de las zonas ganaderas afectadas con hematuria.

4. a. Colección del material vegetal

El material vegetal se recolectó, en época de seca en los tres Cantones en estudio con presencia de HEB y alta contaminación de las zonas de pastoreo. Se muestrearon en horas de la mañana a tres niveles de altitud en cada Cantón: alta, media y baja, tanto frondes jóvenes como adultos, y llevados para su procesamiento al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Estatal de Bolívar y en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Para la determinación del peso seco y porcentaje de humedad de los frondes, se tomó 1 g de cada muestra y se procedió a la determinación mediante Balanza Infrarroja (Sartorius ag Gottingen, Germany).

4. a. 1. Aislamiento y purificación de pterosina B para su empleo como patrón.

Para la obtención de pterosina B patrón se procedió a la recolección de una muestra mixta de frondes jóvenes y adultos de una zona de elevada altitud: 2114 m.s.n.m en San Miguel. Los frondes frescos se cortaron en pedazos pequeños, 5 – 10 mm, con la ayuda de una tijera de corte.

Una muestra de 500 g se extrajo con 1 litro de agua a temperatura de 37 °C y agitación por 1 hora y posterior extracción en baño ultrasónico 45 minutos. Se filtró por gaza y posterior filtración por gravedad. El residuo se desechó y el sobrenadante se extrajo 2 veces con porciones de 100 mL de éter de petróleo. El éter se desechó. El extracto acuoso se alcalinizó con hidróxido de sodio 1 M hasta pH > 11, alrededor de 4.5 mL. Se calentó a 40°C durante 1 h. Posteriormente se acidificó con ácido clorhídrico 5 M hasta pH < 2. Se dejó reposar 10 minutos y posteriormente se extrajo con diclorometano 3 veces con porciones de 100 mL. Se colectó los extractos orgánicos y se llevó a sequedad a presión reducida.

El crudo de pterosina B impuro obtenido anteriormente se procedió a su purificación mediante cromatografía de columna a vacío, para ello el crudo se redisuelve en metanol: diclorometano 1:1 y, se absorbe en 1 g de silicagel 60 para cromatografía de columna (Kieselgel 60, 0.015 – 0.040 mm, Merck). Esta se coloca sobre una columna preparada con 20 g de silicagel 60 F, kieselgel 60 F, Merck. La columna se corre con hexano (100 mL); hexano: acetato de etilo 90:10 (300 ml); hexano: acetato de etilo 70:30 (200 mL); hexano: acetato de etilo 50:50 (200 mL); hexano: acetato de etilo 30:70 (100 mL) y finalmente 200 mL de acetato de etilo. La pterosina B se obtiene en la fracción de hexano: acetato de etilo 70:30, lo que fue verificado por cromatografía de Capa delgada, silica gel 60 F254, Merck, Germany, en el sistema de elución acetato de etilo: diclorometano 40:60 y detección a longitud de onda 254 nm. Observándose una mancha a Rf = 0.64.

4. b. Extracción y determinación del ptaquilósido mediante su conversión en pterosina B en las muestras de *Pteridium arachnoideum* mediante CLAR.

Las muestras de *Pteridium arachnoideum* de las zonas en estudio se procesaron según el método de Agnew y Lauren (1991) con algunas modificaciones. Las muestras secas se redisolieron en 1 mL de metanol, se colocaron en viales de CLAR autosampling. Las condiciones de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), fueron las siguientes: Equipo CLAR: ULTIMATE 3000 (DIONEX), Columna Dionex RP 18, 12.5 x 0.4 cm d.i., 40 µ, Temperatura ambiente; modo isocrático con metanol: Agua 65:35 como sistema de corrida, inyector de 20 µl; Velocidad de flujo= 1 mL/min, DETECCIÓN ultravioleta variable a = 260 nm, con un software Programa CROMELEON. Se corrió una curva patrón de pterosina B, obtenido anteriormente en las concentraciones 1; 0.9; 0.7; 0.5; 0.1; 0.07; 0.05 y 0.01 mg/ml. Esto comprende una curva para la determinación de la concentración en las muestras y para la determinación del límite de detección y cuantificación de la técnica.

Determinación del recobrado, límite de detección y cuantificación:

En el analito se añadió una cantidad conocida de pterosina B. Se siguió el proceso de extracción y cuantificación de manera similar a la descrita en el diagrama 2 y se determinó el porcentaje de recuperación de este parámetro según la fórmula:

$$\text{Concentración esperada} = \frac{\text{Cantidad muestra} + \text{Cantidad añadida}}{\text{Volumen de muestra} + \text{Volumen añadido}}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración observada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

Sensibilidad (límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ))

Se realizó una curva de calibración para el patrón de pterosina B en el rango en que se encuentra normalmente en las muestras (1 – 0,1 mg/mL). Se determina la pendiente (m) de ésta curva de calibración (Concentración vs A o tr) en este rango. Se realiza otra curva de calibración para concentraciones bajas del analito, inyectando cada punto de concentración por triplicado, determinando la ecuación de esta nueva recta (A= mx Conc. + b) y se extrapola la respuesta a concentración igual a cero (el área es igual al intercepto b), obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco Y_{bl}. Se determina la desviación estándar (S) para cada punto de la curva anterior, se calcula la recta correspondiente a Concentración (A) vs S, es decir la ecuación S= m(A) + b, y se extrapola la S a concentración igual a cero, obteniéndose el estimado S_{bl}, correspondiente a la desviación estándar del blanco. Se calcula el LD y el LQ para n' medidas individuales según:

$$\text{LD} = \frac{Y_{bl}}{m} + 3S_{bl} \quad \text{LQ} = \frac{Y_{bl}}{m} + 10S_{bl}$$

mm

4. c. Colección de muestras de leche

Las muestras de leche (100 mL) se colectaron en diferentes fincas ganaderas de cada Cantón en estudio, que presentaron invasión de *P arachnoideum* en los pastos, con y sin la presencia de signos clínicos evidentes de HEB.

Se muestreó el 15 % del total de la masa (N=554) de bovinos por cada finca (n=84). Se realizó la recolección de las muestras de forma individual, en frasco de vidrio color ámbar debidamente identificado, a través del ordeño manual en las primeras horas de la mañana. Estas muestras fueron conservadas en condiciones refrigeradas (sin pasteurizar) hasta su procesamiento en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Estatal de Bolívar y en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Las fincas muestreadas estaban ubicadas a una altitud de 2210 a 778 m.s.n.m.

4. c. 1. Desarrollo del método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para determinar los niveles de ptaquilósido en muestras de leche.

Se siguió el método analítico por CLAR siguiendo la metodología de Alonso-Amelot *et al* (1993) con algunas modificaciones. Una alícuota de 25 mL de cada muestra de leche fresca, fue tratada con 40 mL de metanol, con calentamiento a temperatura ambiente y agitación durante 30 min., lo que posibilita la precipitación de las proteínas. A continuación la suspensión se filtró y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Consecutivamente, el sobrenadante se trató con 25 mL de acetonitrilo para lograr la precipitación de lípidos, se centrifugó desechando el precipitado (lípidos y proteínas) y ulteriormente al sobrenadante se le añadió 1 g de cloruro de sodio. Se procedió a la extracción con diclorometano con la finalidad de eliminar las grasas. La fase acuosa fue tratada con hidróxido de sodio (0.003 N) hasta pH básico ≥ 11 , logrando la conversión a pterosina B. Se agitó a 36°C durante 2 horas. Se realizó una segunda extracción con diclorometano (3 veces x 15 mL), procediendo al secado del extracto orgánico a presión reducida a 40°C. Posteriormente se redisolvió en 1 mL de metanol calidad CLAR y se colocó en viales muestreadores y análisis por cromatografía líquida de alta resolución, en las condiciones cromatográficas ya descritas anteriormente. Se procesaron dos curvas patrón de pterosina B; la primera osciló en un rango de valores de 1- 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y la segunda entre 0.1-0.01 $\mu\text{g/mL}$, se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación entre el área y la concentración del analito, además de calcular la desviación estándar del blanco según Quatrocchi *et al*. 1992.

Determinación del recobrado, límite de detección y cuantificación

Se procesó una muestra de leche control negativo para determinar la especificidad/selectividad, a la que se le añadió una cantidad conocida de pterosina B (2 mg). Se analizaron tres réplicas por cada muestra de leche. Se siguió el proceso de extracción y cuantificación de manera similar a lo descrito anteriormente y se determinó el porcentaje de recuperación. El límite de detección y cuantificación se calculó según lo descrito en el epígrafe anterior.

5. Procesamiento estadístico de los resultados

Se emplearon las pruebas estadísticas de X^2 , comparación de medias por T de Student, Correlación. Se consideró el valor de $p < 0,05$ para definir las diferencias. Para evaluar el análisis cualitativo de la orina mediante tiras reactivas como método diagnóstico de la presencia de sangre en este material biológico, se utilizó el método de pruebas diagnósticas; para los parámetros hematológicos se calcularon los estadígrafos descriptivos y se compararon entre los diferentes grados de hematuria (tiras reactivas) mediante un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), comparándose las medias en los casos en que se encontraron diferencias estadísticas mediante la prueba de Bonferroni para un nivel de confianza del 95%, previa comprobación de la homogeneidad de varianza. En este procesamiento se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion ver. XV.I (Statistical Graphic Corp., USA) del 2006. Para evaluar los parámetros anatomopatológicos se realizó la comparación múltiple de proporciones con valor de $p < 0,05$ para establecer diferencias, mediante el empleo del programa estadístico EPIDAT 3.1.

Resultados Y Discusión

El resultado del análisis de las encuestas para el factor de riesgo entre la presencia del helecho *Pteridium* spp con lo reportado por los productores de la presencia de "sangre en la orina" (hematuria), fue significativo $p = 0,023$, con un Odds ratio = 19,55. IC (95%) = 1,65-401,95. Este estudio pone de manifiesto que existe 19,55 veces más posibilidad que se produzca la hematuria en los bovinos cuando hay presencia de helechos en los pastizales que cuando no los hay. Estos hallazgos orientan a pensar con más fuerza la existencia en estas zonas ganaderas de la entidad clínica reconocida como Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) la que se caracteriza por la ocurrencia de tumores de la vejiga urinaria acompañada de hematuria (Carvalho, 2006) causada por la ingestión crónica de *Pteridium* spp siendo la única planta que se reconoce que produzca cáncer en los animales de forma

natural.(Panter *et al.* 2007). Los resultados de las encuestas referentes a la relación existente entre las muertes de los bovinos con hematuria y la presencia de helechos, fue significativo $p= 0,031$ con un Odds ratio= 6,77,IC (95%)= 0,89-174,58, lo que expresa que existe 6,77 veces la posibilidad de ocurrencia de las muertes de los bovinos con hematuria cuando están expuestos a la presencia de helechos que cuando no lo están, sin embargo el Odds ratio resulta bajo. Esto tiene explicación en el sesgo de las respuestas de los productores los que declaran menos muertes del rebaño por esta causa, al enviar los animales afectados de hematuria al matadero antes de que el curso clínico de la intoxicación avance hacia la depauperación y posterior muerte. Dado que la intoxicación por el consumo de helecho *Pteridium* spp es causante directa de lesiones tumorales que evolucionan a la malignidad, el curso clínico de la HEB es fatal (cáncer de vejiga urinaria), por lo que es de esperar una alta mortalidad en los rebaños expuestos al consumo reiterado de la planta tóxica (Riet-Correa *et al.* 2009). De ahí la importancia de realizar estudios confirmativos en los mataderos, donde los productores tributan sus animales con hematuria antes que estos mueran inevitablemente, previendo no ser perjudicados en la economía y sustento familiar. Los resultados de prevalencia de bovinos con hematuria a partir de las encuestas fue de 8,7 % y los casos de muerte asociada a esta fue de 9,8 %, siendo similares a los obtenidos por otros autores trabajando en zonas andinas subtropicales de Bolivia, los que llegaron a un diagnóstico de la HEB con una prevalencia 7,8 y muertes asociados a la hematuria de 10, 6 % (Marrero *et al.* 2001).

Las muestras de helechos tomadas de zonas ganaderas afectadas con hematuria, se identificaron como *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (que antes era conocido como *Pteridium aquilinum* sub-especie *arachnoideum*). Así mismo se reconoce que en Ecuador existe solamente esta especie de *Pteridium*, según certificado de identificación botánica,emitido por el Dr. Hugo Navarrete Zambrano, Director del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (2011)y por la Ing. Iris Palenzuela Páez, investigadora del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Cuba. (2011) (Figuras 1 y 2).



Figuras 1 y 2. *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon., invadiendo zonas ganaderas en los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar- Ecuador.

La relación entre el grado de presencia de *Pteridium arachnoideum* en zonas ganaderas afectadas con hematuria es directamente proporcional, ya que se observa que existe linealidad entre ellos ($p= 0.0031$), a medida que es mayor la invasión de los pastos con los helechos, resulta mayor la cantidad de fincas ganaderas afectadas con hematuria (Figura 3).

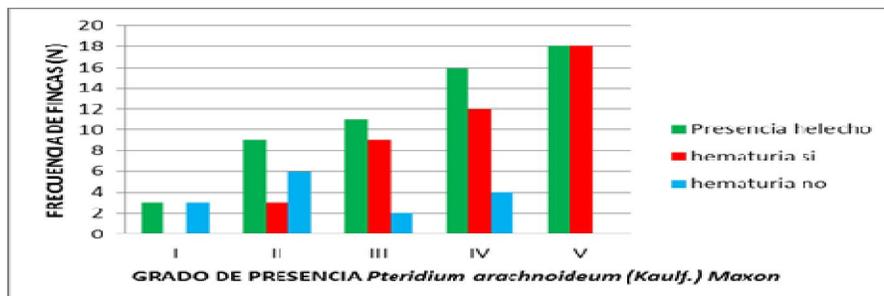


Figura 3. Frecuencia de fincas y grado de presencia de *P. arachnoideum* en zonas ganaderas afectadas con hematuria en los Cantones de San Miguel, Echeandía y Chimbo de la Provincia Bolívar- Ecuador. Tendencia lineal. $p<0,0031$.

El grado de presencia de los helechos en las áreas afectadas con hematuria fue determinado entre un 60 y 100 % lo que denota una alta invasividad de la planta *P. arachnoideum*, contentiva del tóxico ptaquilósido (Oliveira *et al.* 2007; Marrero *et al.* 2010), el cual es responsable de cuadros clínicos de Hematuria Enzoótica Bovina (Masuda *et al.* 2011). La inspección clínica general del rebaño, denotó que los animales se encontraban en condiciones favorables de carne, excepto aquellos que aún no habían sido enviados al matadero y permanecían en el rebaño por mucho tiempo (más de 12 meses) eliminando sangre en la orina (hematuria), denotando debilidad y caquexia, idénticos a los encontrados en la HEB por otros autores (Pamukcu *et al.* 1976; Marrero *et al.* 2004). Así mismo los animales afectados y no afectados se encontraban afebriles, con mucosas aparentes que iban de normo a hipo coloreadas, sin íctero, actitud y rumia aparentemente normales, similares a los descritos por (Aparecida da Silva *et al.* 2009), no observándose otros signos clínicos de interés diagnóstico. (Figura 4 A y B).

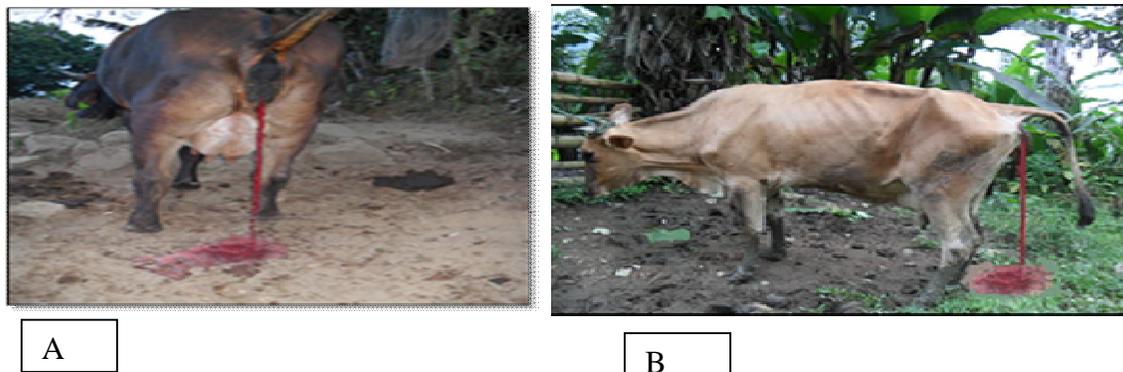


Figura 4 (A y B). Vacas con signos clínicos de hematuria, de corta evolución (A); de larga evolución (B).

Los resultados del diagnóstico de la hematuria en 74 bovinos procedentes de las zonas ganaderas de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar- Ecuador, utilizando tiras reactivas para determinar sangre en la orina, evidenciaron hematuria clínica en el 33,78 % de las muestras y hematuria subclínica (sangre oculta en la orina) en el 37,84 %. Este resultado fue corroborado con el examen microscópico del sedimento urinario.

El análisis estadístico de prueba diagnóstica por el método de las tiras reactivas empleado, mostró una sensibilidad diagnóstica del 98,11 %, lo que demuestra la capacidad de detectar los animales que verdaderamente están enfermos. Una especificidad de 95,24 % lo cual indica la probabilidad de que el diagnóstico clínico de la hematuria basado en la utilización de tiras reactivas posee la capacidad de detectar como animales sanos a aquellos que verdaderamente lo están (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Favela-Camacho *et al.* 2001; Peña *et al.* 2001 y Sánchez- Villalobos *et al.* 2006).

Tabla 1: Sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo y otros indicadores del diagnóstico de la hematuria basado en la utilización de las tiras reactivas

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia			IC (95%)
	Enfermos	Sanos	total	
Positivo	52	1	53	
Negativo	1	20	21	
Total	53	21	74	
Indicador			valor (%)	
Sensibilidad			98,11	93,51-100,00
Especificidad			95,24	83,75-100,00
Índice de validez		97,30		92,93-100,00
Valor predictivo positivo		98,11		93,51-100,00
Valor predictivo negativo		95,24		83,75-100,00
Prevalencia			71,62	60,67-82,57
Índice de Youden		0,93		0,84- 1,03
Razón de verosimilitud +		20,60		3,04-139,57
Razón de verosimilitud -		0,02		0,00-0,14

Estos resultados demuestran que el método de tiras reactivas y el examen microscópico del sedimento urinario, poseen similar valor diagnóstico para detectar la hematuria y constituyen una herramienta diagnóstica de suma importancia en la entidad objeto de estudio, lográndose detectar también casos subclínicos por lo que la entidad clínica alcanzó una prevalencia alta (71,62 %) en los tres Cantones, lo cual pone de manifiesto la gravedad del proceso tóxico sospechado, utilizando estos métodos. Con referencia a los resultados obtenidos en el hemograma de animales portadores y no portadores de hematuria, y comparándolos con los resultados de las tiras reactivas en el uroanálisis, se observó que los valores promedios de Hematocrito (Hcto), Hemoglobina (Hb) y Conteo Eritrocitario Total (CET) decrecieron en la misma medida en que se incrementó el grado de hematuria, siendo significativos entre ellos ($p < 0,05$) demostrándose una clara propensión hacia el desarrollo de anemia. (Tabla 2). Siendo similares a los obtenidos por otros autores en animales portadores de HEB (Sanches- Villalobos *et al* 2004; Singh, 2007; Aparecida da Silva *et al.* 2009). Siempre que sea posible deberá identificarse la causa de la anemia, porque el término anemia por sí solo no constituye un diagnóstico definitivo, la cual puede ser clasificada según el tamaño del volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) del eritrocito (Ducan y Prasse's, 2003).

Tabla 2. Relación entre el grado de hematuria, mediante tiras reactivas y los valores de la hemoglobina, el hematocrito y el conteo de eritrocitos totales de bovinos procedentes de los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar. (X \pm SD).

Grado de hematuria (cruces)	Hb (g/dL)	Hcto (L/L)	CET (1012L)
0 (negativo)	105,37 \pm 7,23a	0,32 \pm 0,02a	3,81 \pm 0,23a
1 (+)	95,84 \pm 5,17ab	0,29 \pm 0,01ab	3,50 \pm 0,15b
2 (++)	95,56 \pm 4,86ab	0,29 \pm 0,01b	3,48 \pm 0,16b
3 (+++)	88,32 \pm 5,35b	0,27 \pm 0,01b	3,28 \pm 0,14b
4 (++++)	77,61 \pm 11,06c	0,23 \pm 0,03c	3,00 \pm 0,31c

(a, b y c) Valores promedios con letras no comunes en el superíndice de la misma columna indican diferencias estadísticas. $p < 0,05$. (Bonferroni).

Abreviaciones: Hb = Concentración de Hemoglobina; Hcto= Hematocrito; CET= Contaje eritrocitario total.

En los resultados de VCM hubo diferencias ($p < 0,05$) entre los grados de hematuria, sin afectar los valores normales para la especie (Cuesta et al. 2007), no apreciándose ningún cambio significativo en el valor CHCM. Todo lo cual sugiere que los animales con grado 4 (++++) de hematuria presentaron anemia normocítica normocrómica (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre el grado de hematuria mediante tiras reactivas y los valores de las constantes corpusculares de bovinos procedentes de los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar. (X \pm SD).

Grado de hematuria (cruces)	VCM (10-15L)	CHCM (g/L)
0 (negativo)	85,50 \pm 1,62 a	322,60 \pm 5,40a
1 (+)	84,64 \pm 1,14a	322,54 \pm 8,23a
2 (++)	84,90 \pm 1,28a	322,57 \pm 5,21a
3 (+++)	83,37 \pm 1,60ab	322,52 \pm 6,12a
4 (++++)	80,83 \pm 2,82b	319,26 \pm 18,66a

(a y b) Valores promedios con letras no comunes en el superíndice de la misma columna indican diferencias estadísticas. $p < 0,05$. (Bonferroni). Abreviaciones: VCM= Volumen corpuscular medio; CHCM= Concentración de hemoglobina corpuscular media.

Los resultados ya descritos anteriormente, evidencian disminución en los niveles hematológicos (Hb, Hcto y CET), lo que demuestra la presencia de anemia producto a la pérdida de sangre persistente y crónica a través de la orina producto a neoplasias malignas en la vejiga por la ingestión reiterada de *P. aquilinum* (Gonzales *et al.* 2004), en nuestro caso por *Pteridum arachnoideum* (Kaul.)

Maxon que invaden las zonas ganaderas de estos Cantones; lo que también supone la existencia de un daño grave a nivel de la vejiga urinaria en estos animales que es la causa primaria que ocasiona el sangramiento crónico urinario, el que puede ser permanente o intermitente según se ha señalado por otros autores (Carvalho *et al.* 2006; Jubb *et al.* 2009). Por otra parte, los resultados de los leucocitos totales, evidenciaron una leve disminución en correspondencia con el grado de hematuria ($p < 0,05$), sin llegar a producir alteración en los valores normales para la especie (Cuesta, *et al.* 2007). La anemia podría explicarse por la pérdida de sangre en la orina, no obstante la depresión de algunos elementos del cuadro leucocitario podría tener más relación con la afectación de la médula ósea por parte del tóxico (Wosiacki *et al.* 2006), de ahí que en el cuadro de hematuria Enzootica Bovina además de las lesiones tumorales malignas está presente el daño a otros sitios de la economía del animal lo cual complica el curso clínico y severidad de la intoxicación. (Marrero *et al.* 2001; Carvalho *et al.* 2009). Un comportamiento similar del cuadro hemático se ha reportado por diferentes autores en Latinoamérica y el mundo (Mengi *et al.* 2001; Sánchez- Villalobos *et al.* 2004; Sánchez- Villalobos *et al.* 2006; Singh, 2007; Sanchez-Villalobos *et al.* 2010), lo cual pone de manifiesto la importancia de considerar el diagnóstico hematológico y de uroanálisis a la hora de abordar de forma integral el diagnóstico clínico de la HEB.

Las muestras de sangre examinadas para evidenciar hemoparásitos, arrojaron resultados negativos a Anaplasma marginale y Babesia bovis. No obstante se conoce que esta entidad cursa en forma de brotes, acompañada de fiebre y anemia hemolítica la que ocasiona orinas teñidas de color ámbar (Jubb *et al.* 2009), diferentes al proceso de la HEB. Por otra parte se acostumbra en estas zonas ganaderas a aplicar desparasitaciones contra las garrapatas. Otras enfermedades infectocontagiosas concomitantes que cursan con orinas rojizas, como la Leptospirosis, la Hemoglobinuria Basilar Bovina entre otras, no se consideró como causa de la entidad objeto de estudio en esta investigación al no corresponderse las mismas con el curso y características clínicas descritas para la HEB. Además es importante establecer el diagnóstico diferencial entre hematuria en el que se observa la formación del sedimento urinario, y la hemoglobinuria en la que no se forma el sedimento urinario (Marcal, 2002). Siendo la hematuria característico en la HEB (Blanco, 2012). En el estudio anatomopatológico de la vejiga urinaria y tractos anterior del esófago, demostraron que las lesiones asociadas a la HEB con diferentes tipos de tumores, fueron observadas en el 53,5% de los casos estudiados en el camal de Babahoyo (Tabla 4), lo que indica la alta frecuencia de presentación de las mismas, hubo diferencias $p < 0,05$ entre los grupos en correspondencia con los lugares de origen de los animales. Los Cantones con mayor grado de afectación fueron Chimbo y San Miguel donde estuvieron las afectaciones más graves de la mucosa vesical y el mayor porcentaje de lesiones mixtas (vejiga-esófago). Las alteraciones macro y microscópicas observadas en los animales estudiados en el camal por grupo fueron:

Grupo I: Las lesiones macroscópicas fueron fundamentalmente de tipo circulatorio y vascular, dadas por congestión marcada y discreto edema, hemorragias petequiales y equimóticas, engrosamiento y aspecto vacuolar de la mucosa vesical y tumefacción del órgano (Figura 5). Las lesiones microscópicas de carácter no neoplásicas que se encontraron en la mucosa de este grupo fueron: hiperplasia, vacuolización, balonamiento del epitelio transicional y ectasia capilar subepitelial, mientras que en el estroma, se observó edema de grado variable, hemorragias focales y difusas, trombosis, endoteliosis, degeneración hialina de la pared vascular, e infiltrados inflamatorios linfoplasmocitarios focales.

Tabla 4. Frecuencia de lesiones macroscópicas asociadas a la HEB encontradas en vejiga y esófago atendiendo a la procedencia de los animales de la Provincia Bolívar- Ecuador.

Cantón	Total de animales faenados	Frecuencia de lesiones macroscópicas encontradas %						Total de animales con lesiones
		vejiga			esófago	Esófago y vejiga		
		I	II	Total	III	IV	Total	
Caluma	32	5 (15,6)c	0	5 (15,6)c	1 (3,1)a	0	1 (3,1)b	6 (18,7)d
San Miguel	157	52 (33,1)b	11 (7, 12)a	63 (40,1)b	13 (8,28)a	6 (66,6)a	19 (33,3)a	82 (52,2)c
Chimbo	13	6 (46,1)b	3 (20,1)a	9 (69,2)a	2 (15,3)a	2 (22,2)b	4 (30,7)a	13 (100) a
Echeandía	9	7 (77,7)a	0	7 (77,7)a	0	0	0	7 (77) b
Chillánes	17	11 (64,7)a	0	11 (64,7)a	2 (11,7)a	1 (5,88)c	3 (17,6)ab	14 (82,3)b
Total	228	81 66,4%	14 11,5%	95 77,9%	18 14,7%	9 7,4%	27 22,1%	122 53,5%

(a,b,c y d) Letras desiguales por columna, difieren $p < 0,05$

Estos cambios anatomopatológicos han sido descritos por varios autores en la fase aguda de la enfermedad (Marin, R. y Marin, O, 2004 y González *et al.* 2004), sin embargo resulta de interés la presencia de alteraciones microscópicas de carácter neoplásico en 9 de las 81 vejigas comprendidas en este grupo (11,1%) que no tenía evidencias macroscópicas de apariencia tumoral, lo que justifica el criterio de que los procesos de este tipo, no siempre responden a patrones morfológicos típicos (Carvalho *et al.* 2009). Se ha demostrado en condiciones naturales y experimentales, que esto está asociado a varios factores que incluyen procesos tales como la localización de la planta, la edad de los animales, la duración de la ingestión y la actividad microsomal inducida por administración crónica de Pt, fenotiacina entre otros factores (Pamukcu *et al.* 1976; Oliveira *et al.* 2006; Ramos *et al.* 2012). Las alteraciones de tipo cancerosas encontradas, fueron las que se describen para los tumores de origen vascular (Hemangioma cavernoso y Hemangiosarcoma), así como otros tumores de origen epitelial (Carcinoma *in situ*) y de origen mesenquimatoso clasificados como leiomioma y mixosarcomas (González *et al.* 2004; Ramos *et al.* 2012). La frecuencia de aparición de estos tumores se muestra en la Tabla 5.



Figura 5. Grupo I. Aspecto macroscópico de la vejiga caracterizado por congestión marcada y discreto edema, hemorragias petequiales, engrosamiento y aspecto vacuolar de la mucosa vesical.

Otros autores, han utilizado el criterio de lesiones y manifestaciones tempranas de la enfermedad y han encontrado la presencia de estos y otros tumores en la vejiga de animales afectados por Hematuria Enzoótica, por lo que desde el punto de vista clínico de la enfermedad, esta clasificación morfológica resulta poco provechosa (Marin, R. y Marin, O, 2004; Sánchez-Villalobos *et al.* 2004).

Tabla 5. Frecuencia de tipos de neoplasias epiteliales y no epiteliales en vejiga y esófago de los bovinos examinados en el matadero de Babahoyo.

Tumores (Vejiga n=44) (Esófago n=42)	Órganos				Neoplasias por grupos			
	Vejiga	Proporc.	Esófago	Proporc.	I	II	III	IV
Neoplasias de origen vascular								
Hemangioma	15	0,17a	0	0,00	2	11	0	2
Hemangiosarcoma	18	0,21a	0	0,00	4	14	0	0
Otras neoplasias de origen mesenquimatoso								
Leiomoma	4	0,05b	0	0,00	1	3	0	0
Mixosarcoma	3	0,03b	0	0,00	1	2	0	0
Neoplasias de origen epitelial								
Papiloma	0	0,00b	27	0,31a	0	0	18	9
Carcinoma in situ	4	0,05b	9	0,10b	1	3	4	5
Carcinoma de células escamosas	0	0,00b	6	0,07bc	0	0	4	2
Total de neoplasias	44	----	42	----	9	33	26	18

(a,b y c) Letras desiguales por columna difieren $p < 0,05$

Grupo II. Macroscópicamente, se observaron áreas de aspecto nodular rojizas o hemorrágicas, simples o múltiples, que hacían discretos relieves en la superficie de la mucosa vesical alternando con zonas abultadas de consistencia fibrosa de color grisáceo, en los casos más severos, las formaciones nodulares, únicas o multicéntricas mostraban estructuras de color vinoso o blanco-grisáceo que se correspondían con lesiones ulcerativas crateriformes con exudado mucopurulento. Se observaron estructuras de aspecto pedunculado muy hemorrágicas que coincidían, en los casos en los que había repleción urinaria, con contenido de sangre viscosa y oscura (Figuras 6, 7 y 8).

Desde el punto de vista histológico, los cambios del urotelio vesical se caracterizaron por hiperplasia, vacuolización, demostrada por la presencia de marcados halos perinucleares, y áreas focales con cierto grado de atípia celular y cariomegalia así como otras alteraciones de aspecto displásico y anaplásico. (Figura 9). En ninguno de los casos se observó crecimiento infiltrante hacia el estroma; no obstante estos cambios pueden estar asociados a la presencia de tumores del tipo de Carcinoma in situ según lo referido por varios autores. (Borzacchiello *et al.* 2003; González *et al.* 2004; Robbins y Contran, 2005; Carvalho *et al.* 2006).

Las alteraciones vasculares presentes en este grupo, fueron similares a las descritas en el Grupo I pero con mayor grado de severidad y se caracterizaron por la presencia de nichos celulares formados por cordones tortuosos de células epiteloides y proliferación de células endoteliales fusiformes que dan origen a pequeñas estructuras vasculares similares a las descritas por (Pires Isabel *et al.* 2010).

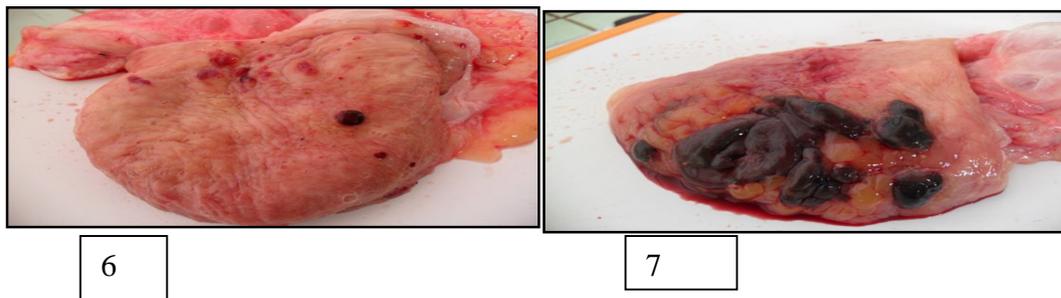


Figura 6. Grupo II. Aspecto macroscópico de la vejiga mostrando áreas de aspecto nodular rojizas o hemorrágicas, simples o múltiples, que hacían discretos relieves en la superficie de la mucosa vesical. Figura 7. Grupo II. Casos más severos, mostrando formaciones nodulares, únicas o multicéntricas de color vinoso y aspecto tumoral con lesiones ulcerativas crateriformes con exudados mucopurulentos.

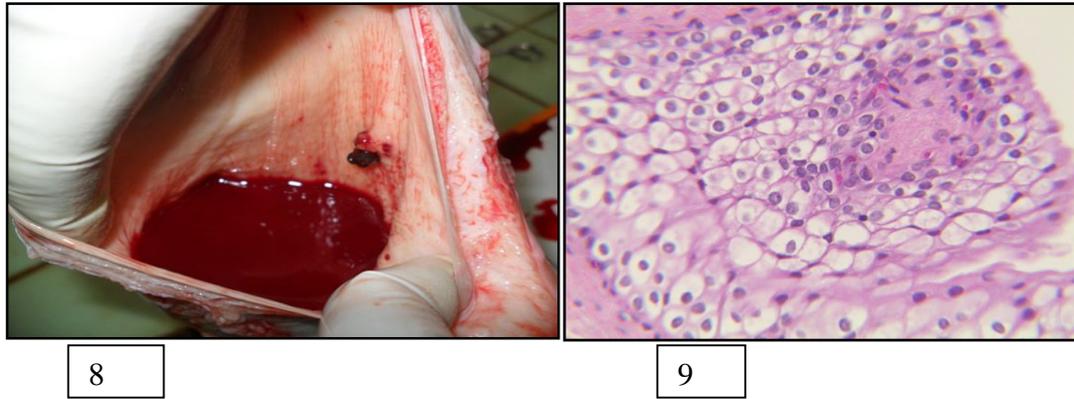


Figura 8. Estructuras de aspecto pedunculado muy hemorrágicas que coincidían, en los casos en los que había repleción urinaria, con contenido de sangre viscosa y oscura.

Figura 9. Imagen histológica del Carcinoma in situ en la mucosa vesical. Note los cambios del urotelio vesical caracterizados por hiperplasia, presencia de marcados halos perinucleares, y áreas focales con cierto grado de atípia celular y cariomegalia. HyE 400x.

Los cambios vasculares consistían fundamentalmente en estructuras conformadas por vasos sanguíneos en proliferación con espacios vasculares dilatados llenos de sangre y delimitados por una pared de células endoteliales engrosadas con márgenes demarcados pero no encapsulados, generalmente de aspecto cavernoso, en los casos más severos se observaron en estos espacios, células neoplásicas de forma y tamaño variados con núcleos redondeados u ovoides, hipercromáticos y con figuras de mitosis, (Figura 10), lo que según el esquema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) citado por (Epstein *et al.* 2004), se corresponden con tumores de origen vascular clasificados como hemangiomas y hemangiosarcomas.

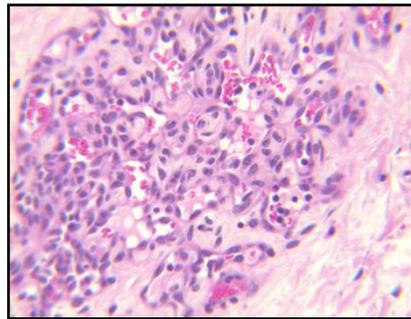


Figura 10. Imagen histológica de un tumor de origen vascular mostrando vasos sanguíneos en proliferación, de aspecto cavernoso, células endoteliales engrosadas y células neoplásicas de forma y tamaño variados con núcleos redondeados u ovoides, hipercromáticos y con figuras de mitosis. HyE 400x.

Estas fueron las formas tumorales de mayor frecuencia de presentación en este estudio lo que coincide con lo descrito por (González *et al.* 2004; Roperto *et al.* 2010 y Sharma *et al.* 2013) para los tumores mesenquimatosos de la vejiga en esta enfermedad. En ocasiones se observaron masas celulares sólidas de proliferación vascular no bien delimitadas cuyo patrón celular es muy similar al que se describe para el Hemangiosarcoma epiteloide o hemangioendotelioma que recientemente ha sido reconocido como parte componente del cuadro anteriormente descrito en coincidencia con (Meuten *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2006; Warren y Summers, 2007; Carvalho *et al.* 2008 y Carvalho *et al.* 2009), criterio que debe ser considerado dentro del diagnóstico diferencial en este complejo proceso. En algunos de los casos estudiados (5) hubo infiltrado difuso a predominio de polimorfonucleares neutrófilos y ulceración del borde de la lesión. Otras alteraciones del estroma presentes, sugieren la presencia de tumores clasificados como leiomiomas y mixosarcomas en coincidencia con lo que describen los autores (Vargas *et al.* 2003; González *et al.* 2004 y Ramos *et al.* 2012). La frecuencia de presentación de estas alteraciones, se presentan en la Tabla 5.

Grupo III. Las lesiones macroscópicas, se confinaron al tercio anterior del esófago y se caracterizaron por la presencia de estructuras digitiformes ramificadas 7/18 (38,8%) o por pequeñas protuberancias de tipo papiliformes bien circunscriptas que hacían pequeños relieves en la superficie del órgano, 11/18 (61,1%), únicas o múltiples. (Figura 11). Las neoplasias halladas en el esófago de los bovinos afectados fueron Papiloma verrucoso, Carcinoma *in situ* y Carcinoma de células escamosas, los que han sido descritos por diferentes autores (Marrero *et al.* 2001; Marin, R. y Marin, O, 2004 y Layke y López, 2006) en bovinos afectados con HEB.

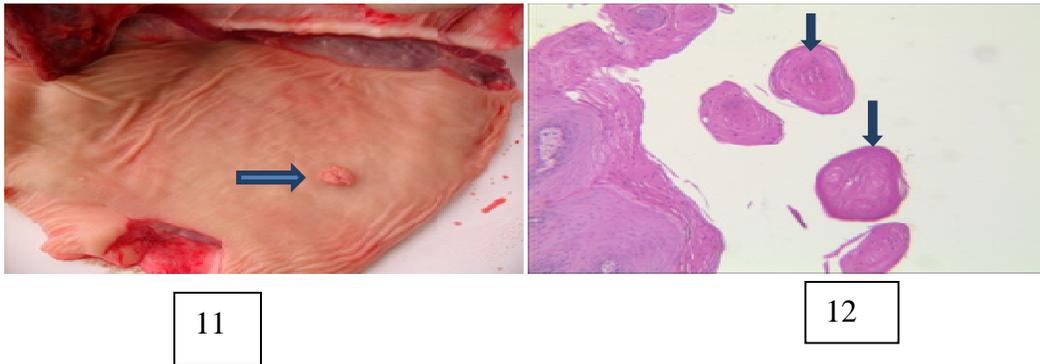


Figura 11 Grupo III. Presencia de estructuras digitiformes ramificadas o pequeñas protuberancias de tipo papiliformes bien circunscriptas que hacían pequeños relieves en la superficie del órgano. Figura 12 Patrón tumoral de este tipo de cáncer de origen epitelial, presentando masas de células escamosas epidermoides con las características formaciones a modo de perlas epiteliales. HyE. 125%.

Según Morris *et al.* (2010), La mayoría de los tumores del esófago son malignos, existe una proporción muy pequeña (menos del 10%) son leiomiomas (tumor benigno del músculo liso) o tumores del estroma gastrointestinal que no fueron observados en nuestro trabajo, ya que estas estructuras del sistema gastro intestinal (SGI), no fueron investigadas, estos autores señalan que los tumores malignos son en general los adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y en ocasiones, carcinomas de células pequeñas. En las muestras de esófago revisadas en nuestro estudio, solo se observaron lesiones de tipo papilomatosas caracterizadas por hiperplasia del epitelio, acantosis y proyecciones papilares de la lámina propia cubiertas por epitelio escamoso que se desarrollan en diversos sitios del tejido sin cambios citológicos notables, en otros casos, se observó claramente la producción de queratina por el tumor, bien diferenciado, con epitelio escamoso acantótico (Kuniko *et al.* 2006). El patrón tumoral de este tipo de cáncer, presenta masas de células escamosas epidermoides con las características formaciones a modo de perlas epiteliales (Figura 12), en concordancia con lo que señalan varios autores (Marrero *et al.* 2001 y Jubb *et al.* 2009) en bovinos afectados con HEB.

En el caso del carcinoma *in situ*, las imágenes histológicas de este tipo de tumor, se correspondieron con las lesiones anteriormente descritas aunque en el esófago hubo proliferación celular en forma de proyecciones hacia la submucosa con la presencia de cambios nucleares exuberantes, abundantes figuras de mitosis y cierta atipia citológica de las células del estrato basal. La frecuencia de presentación de estos tumores se muestra en la (Tabla 5). Se cree que las verrugas del tracto alimentario que implican al esófago, al preestomago y a la cavidad oral, están relacionadas con el Papilomavirus bovino tipo 3 (BPV-3) y especialmente con el BPV-4 (Roperto *et al.* 2010 y Sharma *et al.* 2013). También es posible la transformación maligna de las lesiones del tracto alimentario inducidas por el BPV-4 en carcinomas y constituye un riesgo mucho mayor cuando carcinógenos como Pt en los frondes de los helechos, integran la mayor parte de la dieta. BPV 4 y BPV 2, se asocian, con tumores vesicales y con la presencia de papilomas en el esófago, rumen, retículo y en el intestino delgado. Nuestros resultados coinciden con los descritos por (Meuten, 2002 y Díaz *et al.* 2012) que establece la especificidad de localización de estos tumores en la parte anterior del aparato digestivo provocando papilomas orales que puede volverse maligno en animales adultos alimentados con helecho.

Grupo IV. Las lesiones de la mucosa esofágica que se observaron, son las descritas en los grupos anteriores, La presentación de tumores en el tracto digestivo de los animales estudiados en el camal, se han asociado a la HEB (Borzacchiello *et al.* 2003; Pinto *et al.* 2004; Borzacchiello *et al.* 2006 y Pinto, 2010); sin embargo, resulta contradictorio que el 50% de los tumores esofágicos observados en este grupo, aparecieran en animales sin lesiones evidentes en la vejiga de Hematuria Enzoótica y que en los casos donde coinciden con alteraciones vasculares de la mucosa vesical, estas no son las que se describen para la forma crónica de evolución de la enfermedad como plantean varios autores (Marrero *et al.* 2001 y Wosiacki *et al.* 2006), en dos de esos casos, se presentaron alteraciones microscópicas de carácter tumoral en la vejiga asociados a neoplasias de origen vascular, esto implica entonces una interpretación moderada de la relación de estas alteraciones con la Hematuria Enzoótica Bovina dada las características de las lesiones (papilomas únicos o múltiples sin llegar a afectar directamente a la región orofaríngea), no obstante está bien documentado el hecho de que esta entidad ha sido asociada al virus del papiloma bovino latente (BPV 4), (Wosiacki *et al.* 2006; Singh, 2007; Pathania *et al.* 2012 y Díaz *et al.* 2012) por la interrelación que puede existir entre la acción de sustancias mutagénicas y de carcinógenos activos presentes en *P. aquilinum*, como es el ptaquilósido, que están asociados a la transformación maligna del Papilomavirus bovino tipo 4 (BPV4) y al efecto inmunosupresor adicional que provoca esta transformación (Campo, 2006 y Diniz *et al.* 2009).

En total, se diagnosticaron 86 casos de tumores epiteliales y no epiteliales, que se presentaron en el caso de la vejiga de forma mixta, combinándose tumores de diferentes orígenes blastodérmicos, mientras que en el esófago, solo se observaron tumores de origen epitelial. Hubo mayor frecuencia de presentación de tumores vasculares (Hemangioma y hemangiosarcoma, $p < 0,05$) en la vejiga y de papilomas ($p < 0,05$) en el esófago con relación al resto de las neoplasias diagnosticadas durante el estudio. Las neoplasias de origen mesenquimatoso o epitelial observadas en la vejiga, siempre se evidenciaron en presencia de los tumores vasculares descritos. Los tumores de origen epitelial presentes en este estudio, particularmente el Carcinoma *in situ*, afectaron indistintamente a la mucosa vesical y la del esófago. Se observó mayor frecuencia de tumores de diferentes orígenes blastodérmicos y malignidad de los mismos en la vejiga que en el esófago, en este órgano hubo un predominio de presentación de papilomas, estos resultados, aun cuando no se observaron carcinomas de la región orofaríngea, coinciden con los descritos por varios autores (Marrero *et al.* 2001; Borzacchiello *et al.* 2003 y Ramos *et al.* 2012). La frecuencia de presentación de tumores de origen epitelial, fue superior ($p < 0,05$) a los de origen vascular dado por la alta reiteración de papilomas en la mucosa esofágica, en los grupos III y IV. (Tabla 6).

Tabla 6: Frecuencia de presentación de tumores por grupos atendiendo a su origen blastodérmico.

Tumores (origen)	Grupos				Total
	I	II	III	IV	
Vascular	6	25	0	2	33(0,38)b
Mesenquimatoso ¹	2	5	0	0	7(0,08)c
Epitelial	1	3	26	16	46(0,54)a
Totales	9	33	26	18	86

¹ Muscular y mixomatoso

Letras desiguales difieren por columna $p < 0,05$

La frecuencia de aparición de hemangiomas y hemangiosarcomas coinciden con los resultados obtenidos por (Gonzales, 2003), no obstante es preciso continuar profundizando en la clasificación histopatológica de estos tumores a partir de los criterios expresados por varios autores que se refieren al patrón de crecimiento vascular, la tendencia de solidificación del tumor y la reactividad celular endotelial. En el estudio toxicológico, el compuesto tóxico ptaquilósido, obtenido en su forma estable de Pterosina B a partir de muestras de helechos *Pteridium arachnoideum* de las zonas ganaderas afectadas con hematuria en la Provincia Bolívar, por el método de extracción y purificación llevados a cabo, alcanzó un grado de pureza del 90 % lo que se estimó por Cromatografía de Capa Delgada y por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Figura 13.

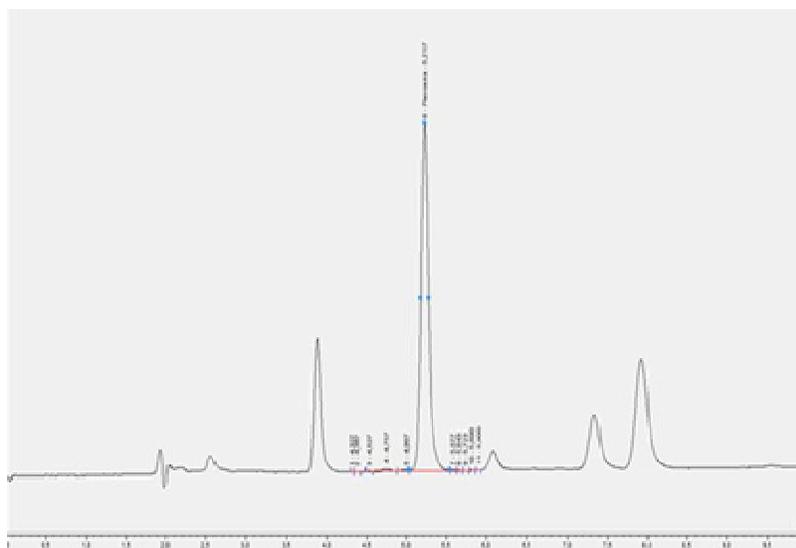


Figura 13. Perfil cromatográfico de la sustancia de referencia Pterosina B en CLAR

La Figura 13 representa el cromatograma de la sustancia patrón (pterosina B), donde se aprecia la presencia del ptaquilósido (pterosina B) en una elevada concentración, mostrando la especificidad analítica del método con la presencia de un pico mayoritario correspondiente al compuesto analizado a $t_r = 5,217$ minutos (tiempo de retención). En el cromatograma se observa la presencia de sustancias interferentes o impurezas en baja concentración. Estos resultados confirman los reportados por otros autores quienes obtuvieron rangos de purezas semejantes, utilizando métodos de extracción y purificación mediante procesamiento cromatográfico, similares al empleado en este trabajo (Rasmussen *et al.* 2003, 2008). Los resultados de la determinación de la concentración del tóxico Pt mediante su metabolito estable pterosina B en muestras de frondes jóvenes y adultos (*Pteridium arachnoideum*), el método de CLAR propuesto presentó un límite de detección de $1.95 \mu\text{g/g}$ y un límite de cuantificación de $2.47 \mu\text{g/g}$, lo que demuestra su sensibilidad en la determinación del ptaquilósido en las muestras analizadas. El recobrado del método tuvo un valor de 95,5 %. El valor de concentración del ptaquilósido en la muestra fue corregido dividiendo por el factor de recobrado.

Los límites de detección y cuantificación en la determinación de ptaquilósido en los frondes de *Pteridium arachnoideum* obtenidos son superiores a los reportados por (Agnew y Lauren, 1991 y Rasmussen *et al.* 2008), quienes encontraron límites de detección de $5 \mu\text{g/g}$, lo que puede asociarse con la mejor capacidad analítica del método de CLAR empleado y condiciones cromatográficas, que favorecen la resolución, la sensibilidad y el recobrado del método alcanzado (95,5%). Estos resultados superiores pueden estar relacionados a la aplicación de modificaciones en el método de extracción, lo que incluye la extracción en baño ultrasónico, que permite mayor contacto del solvente con la superficie de la matriz favoreciendo el proceso de extracción del principio tóxico en análisis (Capelo- Martínez, 2009). En el análisis de la cuantificación del tóxico en el material vegetal, se pudo observar que la concentración promedio de ptaquilósido en frondes frescos jóvenes y adultos de *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon no difieren ($p = 0,83$).

De igual manera la concentración promedio de ptaquilósido en frondes secos jóvenes y adultos, tampoco difieren ($p = 0,73$). Al contrario en la misma planta si existe diferencias ($p = 0,004$) en la concentración del ptaquilósido en los frondes jóvenes entre frescos ($588,58 \mu\text{g/g}$) y secos ($2140,01 \mu\text{g/g}$) y en los frondes adultos entre frescos ($558,18 \mu\text{g/g}$) y secos ($1827,93 \mu\text{g/g}$). En el análisis de correlación entre la concentración de ptaquilósido en los frondes y la altitud, los resultados evidenciaron que no existió correlación entre la altitud (m.s.n.m) de los diferentes Cantones estudiados y la concentración del ptaquilósido en el helecho *Pteridium arachnoideum* de plantas jóvenes ($< 30\text{cm}$) y adultas ($\geq 1\text{ m}$). Esto es, que a cualquier altitud (798 a 2114 m.s.n.m) la concentración del ptaquilósido se comportó de forma similar en los tres Cantones, con una altitud promedio general de 1469 m.s.n.m y una concentración promedio de ptaquilósido $573,38 \mu\text{g/g}$ en frondes frescos jóvenes y adultos ($p = 0,72$); y de $1983,97 \mu\text{g/g}$ en frondes secos jóvenes y adultos ($p = 0,51$).

A pesar de no existir correlación entre ellos, se pudo apreciar que en el Cantón Chimbo existió una mayor concentración promedio de ptaquilósido tanto en estado fresco de frondes jóvenes y adultos con 659,97 $\mu\text{g/g}$ y en seco de frondes jóvenes y adultos con 3255,71 $\mu\text{g/g}$, a una altura promedio de 1546 m.s.n.m. siendo la máxima concentración de ptaquilósido encontrada en este estudio en los frondes jóvenes frescos con 1232,23 $\mu\text{g/g}$ y los secos de 8677,68 $\mu\text{g/g}$, y la mínima concentración de Pt hallada fue en el Cantón Echeandía en frondes adultos frescos y secos con 107,7 y 376,57 $\mu\text{g/g}$ respectivamente a una altitud de 798 m.s.n.m.

Estudios del contenido de Ptaquilósido en diferentes especies y variedades de *Pteridium* de Australia, Sub América y Europa han demostrado la correlación entre el contenido de Pt, el estado de crecimiento y variables geográficas tales como la altitud (Villalobos- Salazar *et al.* 2000), latitud (Smith *et al.* 1994) y exposición a la luz (Rasmussen *et al.* 2003c). Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio de la determinación del compuesto carcinogénico en la especie *Pteridium arachnoideum* en la Provincia Bolívar, no demuestran estas correlaciones, en cuanto al aumento de su concentración con la altitud y en el estado joven y adulto de la planta en cada una de las regiones estudiadas, concordando nuestros resultados con Rasmussen *et al.* (2008), quien en un estudio para examinar la variación de Pt en helechos a nivel de fincas, regional y nacional de toda Nueva Zelanda, determinó que no hay correlación entre el contenido de Pt en la planta y parámetros ecológicos medidos en las fincas, regional y nacional, por lo que datos de muestreos individuales pueden tender a apoyar las correlaciones con la latitud y/o altitud, considerándose estas tendencias débiles y que no cuentan con el apoyo de otros datos realizados, por lo que se requiere realizar más estudios para describir las potenciales correlaciones entre parámetros ambientales. Los resultados de la residualidad del compuesto tóxico ptaquilósido mediante su metabolito estable Pterosina B en muestras de leche fresca de diversas fincas procedentes de los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar afectados con HEB, el método de CLAR propuesto presentó un límite de detección de 1.95 $\mu\text{g/mL}$ y un límite de cuantificación de 2.47 $\mu\text{g/mL}$, lo que demuestra su sensibilidad en la determinación de ptaquilósido de *Pteridium arachnoideum* en las muestras de leche analizadas. El recobrado del método tuvo un valor de 89 %. El valor de concentración de ptaquilósido en la muestra fue corregido dividiendo por el factor de recobrado. La metodología empleada mostró un adecuado porcentaje de recobrado, que coincide con los reportes de Alonso- Amelot *et al.* (1993).

Las concentraciones de residualidad de ptaquilósido ($\mu\text{g/mL}$) en leche fresca halladas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) reflejan niveles altos en los tres Cantones en estudio, observándose en el Cantón Chimbo una concentración de Pt de 2641,13 $\mu\text{g/mL}$, en los Cantones de Echeandía y San Miguel con concentraciones de 2130,12 $\mu\text{g/mL}$ y 2219,67 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, detectándose la residualidad del tóxico en la leche en el 89,29 % del total de las muestras analizadas. Los niveles promedios estuvieron entre 797,73 $\mu\text{g/ml}$ y 1788,26 $\mu\text{g/ml}$. Es importante destacar que la residualidad del tóxico en la leche de bovinos con y sin signos aparentes de HEB, se encontró en todas las fincas analizada de los tres Cantones y a diferentes altitudes (2210 m.s.n.m a los 778 m.s.n.m). (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles de residualidad de ptaquilósido ($\mu\text{g/mL}$) en muestras de leche fresca de los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la Provincia Bolívar- Ecuador.
p= 0,001(X \pm DS).

Cantones	Muestras de leche fresca	Contenido. Ptaquilósido corregido con factor de recobrado 0,89 ($\mu\text{g/mL}$) en leche fresca	Valor promedio de Ptaquilósido ($\mu\text{g/mL}$) en leche fresca	Desviación Estandar	Muestras de leche no detectadas	% de muestras de leche con residualidad del tóxico
Chimbo	25	2641,13	1788,26 a	882,60	1 4%	96 %
Echeandía	30	2130,12	797,73b	671,01	3 10%	90 %
San Miguel	29	2219,67	805, 42b	640,34	5 17,24%	82,76%
General	84	2641,13	1130,47	852,58	9 10,71%	89,29%

(a, b) valores promedios con letras no comunes en el superíndice de la misma columna indican diferencias estadísticas. $p = < 0,05$.

A pesar de que el método resultó idóneo para determinar los elevados niveles de residualidad del elemento tóxico, en la actualidad se ha descrito un novedoso método de determinación de ptaquilósido por CG/Masas con el empleo de bromo – pterosina B como estándar externo, lo que posibilita que aumente la sensibilidad del método para detectar niveles de ptaquilósido en el orden de ppb (parte por billón, pg/g), en muestras de leche de vaca y de otros animales como ovinos, caprinos y equinos (Bonadies *et al.* 2011).

Un aspecto de extrema importancia que hay que considerar; es el asociado a la eliminación de ptaquilósido presente en la leche de las vacas intoxicadas (Alonso-Amelot, 1997), sobre todo en la forma subclínica, donde no se aprecia aun signos clínicos; este hecho pone en riesgo a los consumidores de contraer cáncer gástrico. (Alonso Amelot *et al.* 2000; Alonso Amelot y Avendaño, 2002; Alvarado, 2003). Así como varios estudios confirman la presencia de ptaquilósido en leche proveniente de animales expuestos al consumo de esta planta (Alonso-Amelot *et al.* 1998; Bonadies *et al.* 2011; Pissarelli *et al.* 2012). Para valorar el potencial riesgo a la Salud Humana que implica el consumo de leche con residualidad del tóxico Pt en los Cantones estudiados, en la Figura 14 se refleja que este producto de primera necesidad y alto valor biológico no es inocuo para los consumidores, ya que al consumir 0,5 L/día de leche fresca, estaría ingiriendo el compuesto tóxico ptaquilósido como promedio de 894,13 mg/0,5 L/día de leche fresca en el Cantón Chimbo. Se considera al Pt como el causante de tumores en los animales de granja y también en los humanos (Campos *et al.* 2008; Trendafilova *et al.* 2012; Rasmussen *et al.* 2012; Rasmussen *et al.* 2013). Este compuesto Pt fue descubierto por primera vez en un estudio experimental, en la leche de una vaca alimentada con frondes de helecho fresco (6kg/día), equivalente a 216 mg/día de Pt puro y hallando una cantidad de 0.11 mg/L en la leche fresca (Alonso-Amelot *et al.* 1993). Así mismo en otro estudio encontraron en la leche entre 2 y 10 mg de este potente carcinógeno (Alonso-Amelot, 1999).

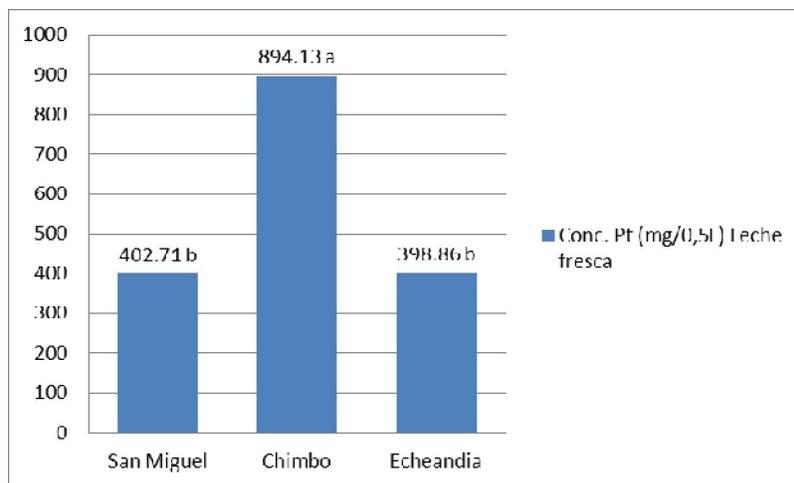


Figura 14. Concentración promedio de ptaquilósido (mg/0,5 L de leche fresca). Potencial riesgo a la Salud Humana en los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía.
P = 0.007. (X ±DE). T Student.

Nuestros resultados demuestran niveles muy elevados en solo 0,5 L de leche fresca, que pudiera ser por el consumo de *P arachnoideum* que los animales hacen de forma natural y *ad libitum*, desconociéndose las cantidades (kg/día) reales de su consumo, lo que revela el alto riesgo de contraer cáncer gástrico en la población de la Provincia Bolívar a través de la cadena alimentaria por consumir leche y sus derivados de animales intoxicados por esta planta. La leche de bovinos que pastan en potreros invadidos por *Pteridium aquilinum* debe ser considerada como un posible factor etiológico del cáncer gástrico en los humanos (Alonso-Amelot *et al.* 1993). Por otra parte, muchos compuestos químicos que se encuentran presentes en las plantas dañinas pueden afectar la salud humana no solo por el consumo directo del vegetal sino a través de la cadena alimentaria al consumir leche y otros productos procedentes de animales intoxicados (Rasmussen, 2003; De Luca *et al.* 2012). El Comité Británico de Toxicidad de Químicos en Alimentos, Productos de Consumo y el Ambiente (COT), ha declarado al ptaquilósido como un agente carcinógeno potencial para los humanos a todos los niveles de ingestión (COT, 2008). Varios estudios han documentado sus efectos genotóxicos como mutagénico y clastogénico del Pt que actúa como agente alquilante de la molécula de ADN (Recouso *et al.* 2003; Almeida Santos *et al.* 2006; Ferguson y Philpott, 2008; Pereira *et al.* 2009; Gil da Costa *et al.* 2012; Gómez *et al.* 2012). También estudios recientes describen el efecto clastogénico, aneugénico e inductor de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos a dosis de 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gil da Costa *et al.* 2012a). Todos estos antecedentes manifiestan el riesgo potencial que tiene el consumo de leche con niveles residuales del tóxico (Pt), en la Salud Humana de la Provincia Bolívar, carcinogénico natural que produce cáncer gástrico, demostrado por varios autores (Smith *et al.* 2000; Vetter, 2009; Fletcher *et al.* 2011; Gil da Costa *et al.* 2012a; Vinayak and Guy, 2015).

Conclusiones

Se demostró la presencia de la Hematuria Enzoótica Bovina, en las zonas ganaderas de la Provincia Bolívar, Ecuador, evidenciado por los indicadores epidemiológico, clínico, anatomopatológico y toxicológico de forma integradora, confirmándose que la entidad es causada por la ingestión reiterada de *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon, puntualizándose las características particulares de ésta intoxicación en esa zona geográfica y su efecto negativo en la inocuidad de la leche, lo que constituye un riesgo potencial para la salud humana.

Bibliografía

- Agnew, MP and Lauren, DR. (1991). Determination of ptaquiloside in Bracken fern (*Pteridium esculentum*). J Chromatogr 538:462–468.
- Almeida Santos, MF., Dorea, JG. and Luna, H. (2006). Bracken-fern extracts can be clastogenic or aneugenic depending on the tissue cell assay. Food Chem Toxicol. 44(11):1845-1848.
- Alonso-Amelot, ME., Castillo, U. and Jongh, FD. (1993). Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. Lait. 73:323-32.
- Alonso-Amelot, ME. (1997). The link between Bracken fern and stomach cancer: milk. Nutrition 13, 694-696.
- Alonso-Amelot, ME., Castillo, U., Smith, BL., Lauren, DR. (1998). Excretion through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment, Lait 78; 413–423.
- Alonso-Amelot, ME. (1999). Bracken fern, animal and human health. Rev Fac Agron. 16:528-41.
- Alonso-Amelot, ME., Castillo, UF., Avendaño, M., Smith, BL and Lauren, DR. (2000). Milk as a vehicle for the transfer of ptaquiloside: a Bracken carcinogen. In: Taylor, J.A. and Smith, R.T., (Eds.) Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control. Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999, pp. 86-90. Aberystwyth: International Bracken Group. United Kingdom.
- Alonso-Amelot, ME and Avendaño, M. (2002). Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. Curr Med Chem. 9(6): 675-686.
- Alvarado, DM. (2003). Evolución de algunos aspectos epidemiológicos y ecológicos del cáncer gástrico en Costa Rica. Rev. Costa Ric. Salud Pública. 12:21.
- Aparecida da Silva, M., Scardua, CM., Dorea, MD., Carvalho, NL., Martins, IVF. and Donatele, DM. (2009). Prevalence of bovine enzootic haematuria in dairy cattle in the Caparaó microregion, southern Espírito Santo, between 2007 and 2008. Ciencia Rural, Santa Maria 39:1847–1850.
- Bonadies, FG., Berardi, R., Nicoletti, R., Saverio, RF., Francesco, DG., Romano, M., Santoro, A., Raso, C., Tagarelli, A., Roperto, F., Russo, V. and Sante, R. (2011). A new very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen, in the milk of farm animals, Food Chem. 124(2): 660–665.
- Borzacchiello, G., Ambrosio, V., Roperto, S., Poggiali, F., Tsimonakis, E., Venuti, A., Campo, M.S. and Roperto, F. (2003) Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. Journal of Comparative Pathology 128, 203-206.
- Borzacchiello, G., Russo, V., Gentile, F., Roperto, S., Venuti A, Nitsch L, Campo, MS, Roperto S. (2006). Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor [beta] receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumors. Oncogene 25:1251–1260.
- Blanco, MF. (2012). Valores analíticos de ganado vacuno en régimen extensivo expuesto al consumo de helechos. Research Notes. 916. <http://www.sciencedirect.com/science?>
- Braun, Blankuet. (1979). Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales. H. Blume Ediciones. Madrid. 820 pp.
- Campo, MS. (2006). Bovine Papillomavirus: Old System, New Lessons? In: Papillomavirus Research: from Natural History to Vaccine and Beyond. Caister Academic Press, Wyonndham, 1-31.
- Campos, PM., Pereira, LO., Bicalho, LS., Dorea, JG., Pocas, FMJ. and Santos, MF. (2008). Interacción de bracken-fern extract with vitamina C in human submandibular gland and oral epithelium cell lines. Mutation Research/Genetic Toxicology and environmental Mutagenesis. 653 (2):158-163.
- Capelo, Martínez. (2009). Ultrasound in chemistry: Analytical Applications. Published online. Print ISBN: 9783527319343. Copyright©2009 wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527623501>.
- Carvalho, T., Pinto, C. and Peleteiro, MC. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. J Comp Pathol 134:336–346.

- Carvalho, T., Elias, AP., Nunes, T., Peleteiro, MC. and Dias S. (2008). Chemo-angiogenic profile of bovine urinary bladder tumors distinguishes urothelial carcinomas from hemangiosarcomas. *Vet Immunol Immunopathol.* 121(3-4):344-58.
- Carvalho, T., Naydan, D., Nunes, T., Pinto, C. and Peleteiro, M. (2009). Immunohistochemical evaluation of vascular urinary bladder tumors from cows with enzootic hematuria. *Veterinary Pathology Online.* 46(2): 211-221.
- Committee on the Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, COT. (2008). Statement on the Risk to Consumers of Eating Foods Derived from Animals that Have Eaten Bracken, Food Standards Agency, London. pp. 20–21.
- Cuesta, M., Montejo, E., Duvergel, J. (2007). *Medicina Interna Veterinaria. Tomos I y II.* La Habana: Editorial Félix Varela. Ministerio de Educación Superior. ISBN 978-959-07-0497-0 Tomo I. ISBN 978-959-07-0498-7 Tomo II. 978-959-07-0549-6. Obra completa.
- De Luca, TH., Zewdie, S A., Zackrisson, O., Healey, J R. and Jones, D L. (2012). Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. kuhn) promotes an open nitrogen cycle in heathland soils. *Plant and Soil.*
- Díaz, JDC., Mariana, DC., Ignacchiti, Patrícia GG., Giuriato, Louisiane. de C., Nuñez, E., Olavo, dos S. y Pereira, J. (2012): Detecção do papilomavírus bovino tipo 2 em bexigas de bovinos com Hematúria Enzoótica pela técnica de reação em cadeia de polimerase no sul do espírito santo, brasil* *Rev. Bras. Med. Vet.,* 34(2):146-151.
- Diniz, N., Melo, TC., Santos, JF., Mori, E., Brandão, PE., Richtzenhain, LJ., Freitas, AC., Beçak, W., Carvalho, RF. and Stocco, RC. (2009). Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil *Genetics and Molecular Research* 8 (4): 1474-1480.
- Duncan and Prasse's. (2003). *Manual de prácticas de Patología Clínica Veterinaria.* Cuarta edic. Lona State Press. pg. 30-35.
- Epstein, JL., Amin, MB. And Reuter, VR. (2004). *Bladder biopsy interpretation.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp 11–34.
- Favela-Camacho, JR., Autrán, M. and Sotomayor, M. (2001) Haematuria: Evaluación de 134 pacientes. *Rev. Mex. Urol.* 61(1):11-15.
- Ferguson, LR. And Philpott, M. (2008). Nutrition and mutagenesis. *Rev. Annu Rev Nutr.* 28: 313-329.
- Fletcher, MT., Reichmann, KG., Brock, I J., McKenzie, R A. and Blaney, B J. (2011). Residue potential of norsesquiterpene glycosides in tissues of cattle fed Austral bracken (*Pteridium esculentum*). *J Agric Food Chem.* 59(15): 8518-8523.
- Gil da Costa, RM., Bastos, MMSM., Oliveira, PA and Lopes, C. (2012). Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials.* 203-204: 1-12.
- Gil da Costa, RM., Coelho, P., Sousa, R., Bastos, MM., Porto, B., Teixeira, JP., Malheiro, I. and Lopes, C. (2012a). Multiple genotoxic activities of ptaquiloside in human lymphocytes: aneuploidy, clastogenesis and induction of sister chromatid exchange. *Mutat Res.* 747(1): 77-81.
- Gobierno Provincial de Bolívar: Situación Geográfica. [en línea] <http://ww.gobiernodebolivar.gob.ec/> 2015. [Consultado: 09/10/2015].
- González, C E. (2003). Frecuencia y caracterización anatomo - histopatológica de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria, en Oxapampa – Pasco. Tesis para optar por el Título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
- González, CE., Chavera, A., Perales, R., Falcón, N. and Evaristo, R. (2004). Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de Oxapampa, Pasco. *Rev. investig. vet. Perú.* 15(1): 25-36.
- Gomez, J., Magalhães, A., Michel, V., Amado, IF., Aranha, P., Ovesen, RG., Hansen, HC., Gärtner, FB., Reis, CA. and Touati, E. (2012). *Pteridium aquilinum* and its ptaquiloside toxin induce DNA damage response in gastric epithelial cells, a link with gastric carcinogenesis. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology.* 126(1): 60-71.
- Jubb, KVF., Kennedy, PC and Palmer, C. (2009). *Pathology of Domestic Animals. Volumen II.* Edited by M. Grant Maxie. Fifth edition. Chapter 4 Urinary System and hematopoietic system: 504:521. 568:570 pp.

- Kuniko, Takeshita., Shin-ichi, Murata., Shoji, Mitsufuji., Naoki, Wakabayashi., Keisho, Kataoka., Yasunari, Tsuchihashi and Takeshi, Okanoue. (2006). Clinico-pathological Characteristics of Esophageal Squamous Papillomas in Japanese Patients—With Comparison of Findings from Western Countries. *Acta Histochem Cytochem.* March 2; 39(1): 23–30.
- Layke, JC And Lopez, PP. (2006). Esophageal cancer: a review and update. *American family physician* 73 (12): pp. 2187-94.
- Marcal, WS. (2002). Aspectos clínicos Epidemiológicos de Toxides da Samambaia em bovinos. *Cien. Vet. Tróp.* 5(2):61-69.
- Marin, RE. Y Marin, O. (2004). Características anatomopatológicas de la vejiga urinaria de animales afectados con Hematuria Enzoótica Bovina en Jujuy. *Revista de Medicina Veterinaria.* Vol. 85. No 6; 240-45.
- Marrero, Faz E., Bulnes, C., Sánchez, LM., Palenzuela, I., Stuart, R., Romero, J. y Jacobs F. (2001). *Pteridium aquilinum* (Bracken Fern). Toxicity in Cattle in the Humid Chaco of Tarija, Bolivia. In: *Clinical Reports. Veterinary and Human Toxicology.* 43:156-158.
- Marrero, Faz E., Bulnes, C., Sánchez, LM., Palenzuela, I., Stuart, R., Jacobs, F. and Romero, J. (2004). Chronic Toxicity in cattle due to *Pteridium aquilinum* (Bracken Fern) in Tarija Department, Bolivia. An Interdisciplinary Investigation. In: *Toxic plants and other Natural toxicants*, CABI Publishing UK, Chapter 37; 248-252.
- Marrero, Faz E. (2008). Plantas Tropicales Medicinales y Tóxicas: Efectos Farmacológicos Experimentales & Toxicosis en Animales. Tesis en Opción al Título de Doctor en Ciencias, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de la Habana, Ministerio de Educación Superior, Cuba.
- Marrero, Faz E., Alfonso, HA., Fuentes, FV., Tablada, PR., Sánchez, PLM., Palenzuela, PI. y Bulnes, GC. (2010). *Plantas Tóxicas del Trópico.* 3ra Edición, Ed. San Luis, Cuba.
- Masuda, EK., Kommers, GD., Martins, TB., Barros, CS. And Piazer, JV. (2011). Morphological factors as indicators of malignancy of squamous cell carcinomas in cattle exposed naturally to bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *J Comp Pathol.* 144(1): 48-54.
- Mateu, E y Casal, J. (2003). Tamaño de la muestra. *Rev. Epidem. Med. Prev.* 1:8-14.
- Meuten, DJ. (2002). Tumors in Domestic Animals. Chapter 8, Tumors of the Alimentary Tract K. W. Head, R. W. Else, and R. R. Dubielzig Fourth Edition Donald J. Meuten, Editor. Iowa State Press.
- Meuten, DJ., Everitt, J. and Inskip, W. (2004). Urinary bladder tumors. In: *WHO histological classification of tumors of the urinary system of domestic animals*, ed. Schulman FY, 2nd series, vol. 11, pp. 26–37. Armed Forces Institute of Pathology Washington, DC.
- Mengi, AK., Nauriyal, DC., Sing, R. and Dhand, NK.. (2001). Hematological and Biochemical observation on the Blood of cattle suffering from Chronic Bovine Haematuria. *Indian Vet. J.* 78: 994-996.
- Morris, W E., Venzano, JA., Craig, María Isabel., Diodati, AJ., Funes, D.; Elizondo, Ana.; Mercado, Elsa., Capellino, F., Delgado, F., Blanco-Viera, J. (2010). Upper alimentary tract papillomas in calves related to papillomavirus infection. *Can Vet J* ;51:877–880.
- Navarrete, S H. (2011). Certificado de Identificación Botánica. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Director del Herbario QCA.
- Oliveira, PA., Colaco, A., de la Cruz, LF and Lopez, C. (2006). Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Exp Oncol.* 28(1):2-11.
- Oliveira, PA., Colac, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., de la Cruz, PLF. And Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis, *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79 (2007) 593–616.
- Palenzuela, P. I. (2011). Certificado de Identificación Botánica. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- Pamukcu, A M., Price, J M and Bryan, G T. (1976). Naturally Occurring and Bracken-Fern-Induced Bovine Urinary Bladder Tumors: Clinical and Morphological Characteristics. *Vet Pathol.* 13: 110-122.
- Panter, KE., Gardner, DR., Lee, ST., Pfister, JA., Ralphs, MH., Stegelmeier, BL and James, LF. (2007). Important poisonous plants of the Unites States. In. R.C. Gupta (Ed.) *Veterinary Toxicology: Basis and Clinical Principles*, Academic Press, New York.
- Pathania, S., Dhama, K., Saikumar, G., Shahi, S and Somvanshi, R. (2012). Detection and quantification of bovine papilloma virus type 2 (BPV-2) by real-time PCR in urine and urinary bladder lesions in enzootic bovine haematuria (EBH)-affected cows. *Transbound Emerg Dis* 59:79–84.
- Peña, FL., Rodriguez, BA., Blanco, MJ., Perez, AD., Gonzales, FM., Sanchez, MM., Pizarro, DM., Mazzucchelli, JF., Sanchez, MB., Castaño, RM. y Rodriguez, SM. (2001). Hallazgos Clínicos y anatomopatológicos de

- la Hematuria Enzoótica Bovina en una explotación Avileña-Negra Ibérica. VII Congreso Internacional de Medicina Bovina. Oviedo, 29 y 30 de junio y 01 de julio. España. 34-41.
- Pereira, LO., Bicalho, Campos, PLM., de Sousa, TM., Bao, SN., de Fatima Menezes, ASM and Fonseca, MJ. (2009). DNA damage and apoptosis induced by *Pteridium aquilinum* aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3. *J Oral Pathol Med.* 38(5):441-447.
- Pinto, C., Janeiro, T., Geraldes, M., Machado, J., Lauren, DR., Smith, BL and Robinson, RC. (2004). Bovine enzootic haematuria on São Miguel Island, Chapter 84. In: Acamovic T, Stewart CS, Pennycott TW (eds) *Poisonous plants and related toxins*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 564-574.
- Pinto, CA. (2010). Hematuria enzoótica bovina: contribuição para o seu estudo etiopatogénico, PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Lisbon, Portugal.
- Pires, Isabel., Silva, F., Felisbina, L., Queiroga, Paula., Rodrigues, R., Henriques, C., Pinto, A., Lópes, C. (2010). Epithelioidhemangiosarcomas of the bovine urinary bladder: a histologic, immunohistochemical, and ultrastructural examination of four tumors.
- Pissarelli, CPYC; Naya, M; Calcagno, M and Alonso-Amelot, ME. (2012). Influence of Bracken Fern (*Pteridium caudatum* L. Maxon) Pre-treatment on Extraction Yield of Illudane Glycosides and Pterosins. *Phytochem Anal.* *Phytochem Anal.* Nov 20. doi: 10.1002/pca.2409.
- Quattrocchi, OA., Abelaira, S y Laba, RF. (1992). *Introducción al HPLC Aplicación y Práctica*. Buenos Aires: Artes Gráficas. pp 302 -28.
- Ramos, Mariella. G., Chavera, A., Tabacchi, LN., Huamán, H., Sandoval, UN. y Rodríguez, JG. (2012). Lesiones anatómo-patológicas en cuyes intoxicados experimentalmente con *Pteridium aquilinum* como modelo animal para bovinos con hematuria vesical enzoótica bovina *Rev Inv Vet Perú*; 23 (2): 201-208.
- Rasmussen, LH. (2003). Ptaquiloside- an environmental Hazard?. Occurrence and fate of a bracken (*Pteridium* sp) toxin in terrestrial environments. Tesis conducted under the Ph.D.- Programme for Natural Sciences at the Royal Veterinary and Agricultural University.
- Rasmussen, LH., Lauren, DR. and Hansen, HCB. (2003). Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium* sp.) constituent, in the soil environment. *Chemosphere*. Submitted.
- Rasmussen, LH., Jensen, LS and Hansen, HCB. (2003b). Distribution of the carcinogenic terpene ptaquilósido in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *J Chem Ecol* 29:771-778.
- Rasmussen, LH., Lauren, D., Smith, B. and Hansen, HCB. (2008). Variation in ptaquiloside content In bracken (*Pteridium esculentum* (Forst. f) Cockayne) in New Zealand. *N Z Vet J.* 56(6): 304-309.
- Rasmussen, L H., Schmidt, B and Sheffield, E. (2012). Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere.* 10.092.
- Rasmussen, L H., Schmidt, B and Sheffield, E. (2013). Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere.* 90(10): 2539-2541.
- Recouso, RC., Stocco, SRC., Freitas, R., Santos, RC., de Freitas, AC., Brunner, O., Becak, W. and Lindsey, CJ. (2003). Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. *Rev. Vet Comp Oncol.* 1(1):22-29.
- Riet-Correa., Medeiros, R., Pfister, J., Schild, AL and Dantas, AF. (2009). Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian Livestock. Ed. Sociedades Vicente Pallotti, Pasto, Brazil.
- Robbins, S. y Contran (2005) *Patología Estructural y Funcional*. Septima edc. Capítulo 22 Vías urinarias inferiores. 1044:1051.
- Roperto, S., Borzacchiello, G., Brun, R., Leonardi, L., Maiolino, P., Martano, M., Paciello, O., Papparella, S., Restucci, B., Russo, V., Salvatore, G., Urraro, C. and Roperto, F. (2010). A Review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder. *Journal of the Comparative Pathology.* 142:95-108.
- Sánchez-Villalobos, A., Arraga, CM., García, BD., Pino, RD., Villarroel, NR y Boscán, OJC. (2004). Observaciones clínico patológicas en vacas con Hematuria Enzoótica Bovina *Rev Científica. FCV-LUZ* 14(4) 317-323.
- Sánchez-Villalobos, A., Arraga, CM., Villarroel-Neri, R., Pino, RD., Garcia, BD., Sanchez-Cómbita, G. (2006). Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de Hematuria Enzoótica Bovina. *Rev. Científica. FCV-LUZ.* Vol. 16(6):604-612.

- Sánchez-Villalobos, A., Alvarado, C., Bracho, D., Ramírez, D., Neri, R y Ocando, J. (2010). Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *Revista Científica*. 14 (4).
- Sharma, R., Bhat, TK. and Sharma, OP. (2013). The environmental and human effects of ptaquiloside-induced enzootic bovine hematuria: a tumorous disease of cattle. *Rev Environ Contam Toxicol*. 224: 53-95.
- Singh, V. (2007). Etio-pathological studies on bovine papillomatosis and enzootic bovine haematuria with special reference to combined effects of BPV and fern in hamsters. M.V.Sc. Thesis submitted to Deemed University, IVRI, Izatnagar-243 122, UP, India.
- Smith, BL., Seawright, AA., Ng, JC., Hertle, AT., Thomson, JA and Bostock, PD. (1994). Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in Bracken fern (*Pteridium* spp.), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia. *Natural Toxins* 2, 347-353.
- Smith, BL., Lauren, DR. and Prakash, AS. (2000). Bracken fern (*Pteridium*): toxicity in animal and human health. In: Taylor, J.A. and Smith, R.T., (Eds.) *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control*. Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999, pp. 76-85. Aberystwyth: International Bracken Group. United Kingdom.
- Tendrafilova, A., Peev, L., Antonova, D., Tashev, A., Todorov, T and Dilov, P. (2012). Determination of ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn from central rhodopes (Bulgaria). *Rev. Comptes Rendus de L' Academie Bulgare des Sciences*. 65(9):1193-1198.
- Vargas Peixoto, P., Franca, TD., Barros, CSL., Hubinger-Tokarnia, C. (2003). Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras*. Vol 23 No 2. Rio de Janeiro April/June.
- Vetter, J. (2009). A biological hazard of our age: bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]-a review. *Acta Vet Hung*. 57(1): 183-196.
- Villalobos-Salazar, J., Hernandez, H., Salazar, G and Meneses, A. (2000). Influence of maturation stage and altitude on the levels of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in Costa Rica. In: Proceedings of the IV International Bracken Conference, Manchester. 20- 23.
- Warren, AL. and Summers, BA. (2007). Epithelioid variant of hemangioma and hemangiosarcoma in the dog, horse, and cow. *Vet Pathol* 44:15-24.
- Wosiacki, SR., Claus, MP.; Alfieri, AF. and Alfieri, AA. (2006). Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101:635-638.
- Winston EM, Venzano AJ, Craig MI, Diodati JA, Funes D, Elizondo A. (2010). Upper Alimentary Tract papillomas in calves related to papillomavirus infection. *Can Vet J*. 51:877-880.