

# ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA VEJIGA URINARIA EN LA HEMATURIA ENZOÓTICA BOVINA

## Ultrastructural Study of the Urinary Bladder in the Bovine Enzootic Haematuria

Alfredo Sánchez V.<sup>1</sup>, Dionel García B<sup>1</sup>, Cruz Ma. de Alvarado<sup>1</sup>, Manuel Villegas<sup>3</sup> y Ernesto Palacios Prú<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento Médico Quirúrgico, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apartado 15252 Maracaibo 4005-A, estado Zulia, Venezuela. <sup>2</sup>Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. <sup>3</sup>Asociación de Ganaderos de la Zona Alta de Mérida (AGZAM) Unión de Productores de Leche de Jají (UPLEJAJÍ) Mérida, Venezuela

### RESUMEN

Se analizaron muestras de vejiga urinaria de dos bovinos afectados con Hematuria Enzoótica Bovina, previo diagnóstico clínico y clínico patológico, empleando estudios de microscopía fotónica de alta resolución y microscopía electrónica. Las muestras fueron fijadas en una mezcla aldehídica de glutaraldehído al 3% y formaldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3, incluido en Eponate. En los cortes se pudo constatar la existencia de procesos equimóticos alternando con zonas ulceradas. En las células epiteliales, así como en las células de la lámina propia y de los capilares de ésta, se encontraron vacuolas densas en número variable; además de las hemorragias, se observaron lesiones vasculares que incluían histólisis del lecho vascular. Al microscopio electrónico se encontró, como hallazgo principal, la presencia de elementos virales correspondientes a citomegalovirus, por sus dimensiones y características ultraestructurales, así como el hecho de estar contenidas en microvesículas durante la virogénesis y, poseer configuración polihexagonal de 104 nm de diámetro promedio. Se discute en este trabajo que la hematuria pudiese ser consecuencia directa de las lesiones vasculares y hemorrágicas producidas por el virus, pudiendo el consumo del hehecho macho (*Pteridium aquilinum*) jugar un papel detonante de la acción viral.

**Palabras clave:** Ultraestructura, hematuria enzoótica, citomegalovirus, hehecho macho, bovinos.

### ABSTRACT

Samples of urinary bladder from two cattle affected by enzootic haematuria were studied, previous pathological and clinical di-

agnosis, by high resolution light microscopy and electron microscopy. One cubic millimeter fragments of the wall of the urinary bladder were fixed in a mixture of 3% glutaraldehyde and 3% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 6.3, and postfixed in 1% osmium tetroxide solution, prepared in the same buffer. In one  $\mu\text{m}$  sections, extensive areas of subepithelial haemorrhage alternating with ulcerative lesions were observed. Epithelial cells, as well as connective and endothelial cells of the lamina propria, revealed the presence of large vacuoles into the cytoplasm. The electron microscope enabled us to recognize numerous viral elements loading large vacuoles and mature virus being exocytosed by the epithelial cells. These virus have polyhexagonal shape with an average diameter of 104 nm. All these features led to the identification of this virus as cytomegalovirus. The massive viral reproduction caused the degeneration of endothelial cells resulting in subsequent hemorrhagic ulcerative process which explains the haematuria. The effect of the bovine consumption of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) concomitant to the cytomegalovirus infection in these cattle is discussed.

**Key words:** Ultrastructure, enzootic haematuria, cytomegalovirus, bracken fern, bovine

### INTRODUCCIÓN

La Hematuria Enzoótica Bovina (HEB), es una enfermedad distribuida en todo el mundo, aunque es localizada con regularidad en áreas templadas y tierras improductivas o poco cultivadas [2, 17], asociándose comúnmente con neoplasmas de la vejiga urinaria [7, 9, 12, 17, 19, 29, 31, 44], cuyo signo clínico más importante es una hematuria intermitente [43].

Los cambios histopatológicos se centran en la vejiga urinaria e incluyen hemorragias de la mucosa. Pudiéndose en-



contrar tumores pedunculados que hacen relieve y son friables, acompañándose de engrosamiento fibrótico con cicatrización y deformaciones de la pared de la vejiga. Varios tipos de tumores pueden estar presentes, originándose probablemente a partir del epitelio de transición y, presentando signos de malignidad, siendo común la metástasis a los ganglios y otros órganos. Gran variedad de tumores vasculares, fibrosos, epiteliales o de origen mixto han sido descritos, incluyendo carcinomas de las células de transición, adenocarcinomas, hemangiomas, hemangiosarcomas y fibromas [17, 37, 42].

La etiología de la enfermedad ha sido objeto de permanente debate por mucho tiempo, pero su ocurrencia parece guardar relación estrecha con la distribución geográfica del helecho [15, 30, 41]. Múltiples trabajos sobre alimentación del ganado bovino y animales de laboratorio, han logrado desarrollar neoplasmas de la vejiga urinaria, que resultaron indiferenciables de los encontrados en casos naturales [1, 17, 29, 34], lo cual corrobora aún más la hipótesis [3, 31, 33, 43, 45].

Se trata de una planta cosmopolita, perteneciente a la *Polypodiaceae* [25, 27], cuya dominancia se debe a su rápido crecimiento, lo que la particulariza como un alimento perenne para el ganado, especialmente en la época seca, cuando los pastos son escasos [1, 11, 25]. Sin embargo, la presencia de enemigos naturales del helecho, como insectos y roedores, comprometen su capacidad de desarrollo, ya que al romper las puntas, estas plantas mueren. De esta manera, el helecho puede haber desarrollado mecanismos metabólicos para concentrar defensas químicas cualitativas en estos tejidos frágiles, en especial carcinógenos [1, 2, 3, 38], mutágenos [3, 11, 17, 36] e inmunosupresores [1, 3, 9, 11, 19, 24, 45] que hacen de él una especie resistente y exitosa. La combinación de la alta viabilidad del helecho, los hábitos de alimentación de los bovinos y la alta concentración de los metabolitos tóxicos, especialmente en las plantas jóvenes, incrementan en forma considerable los riesgos de intoxicación de los bovinos [1, 2].

Pese a lo expuesto, la etiología de la HEB no cuenta todavía con suficiente claridad, dando lugar al involucramiento de otros factores, por lo que ha sido sugerido un vínculo viral [7, 8, 20, 24, 26]. Diversas evidencias asocian la presencia de lesiones papilomatosas tanto a nivel de los pezones de las vacas afectadas, como del tracto digestivo superior (esófago), considerándose una posible causa-efecto, entre el papilomavirus bovino (PVB) y la presencia de las lesiones tumorales a nivel de vejiga urinaria [8, 9, 17, 18, 19, 20, 36]. También es posible que una infección latente del papilomavirus tipo 2 (PVB-2), sea activada ante la inmunosupresión provocada por el consumo del helecho macho, lo que sería un paso necesario, pero no suficiente, para el desarrollo de la carcinogénesis en el ganado bovino [8, 9, 18, 36].

Por otro lado, debe destacarse que no fue posible obtener evidencias hemerográficas que asocien la presencia de infecciones por citomegalovirus (CMV) con la HEB, por lo cual se considera al presente reporte, como el primero en asociar

dicho herpesvirus con la etiología de la enfermedad, ya que incluso, aún no se ha establecido el papel patógeno de este virus [22]. El CMV en el humano está asociado al contacto estrecho, a fluidos corpóreos y a transfusiones de sangre, aunque también puede transmitirse de madre a hijo, a través de la placenta o durante el parto. Posterior a la infección inicial, el virus mantiene un estado de latencia y sólo se manifiesta cuando el sistema inmune decae [4, 5, 6].

La infección por CMV se encuentra muy difundida en cobayos, produciendo una infección latente; en el porcino, se asocia a infecciones del riñón, testículo y pulmón. Así mismo, se ha informado su aislamiento en el ratón (*Múrido*) y en monos [22].

En virtud de las interrogantes planteadas, los objetivos de la presente investigación pretenden conocer las características histopatológicas de las lesiones localizadas en la vejiga urinaria de los bovinos afectados por la HEB y, determinar la presencia o no de la participación de agentes virales en la etiología de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se emplearon muestras de vejiga urinaria de dos vacas adultas de seis y ocho años de edad, de alto mestizaje Holstein, provenientes del municipio Campo Elías, Edo. Mérida, Venezuela. Dichos animales, previamente habían sido diagnosticados por evaluación y análisis clínicos patológicos (orina, sangre y médula ósea) con HEB, padecimiento que para el momento del sacrificio, comprometía su condición corporal, como consecuencia del estado crónico de la enfermedad. Los fragmentos fueron tomados de lesiones ulceradas de la pared vesical.

Las muestras se subdividieron en piezas de 1 mm que incluían áreas afectadas y tejido normal. Los fragmentos se fijaron *in situ*, previo a la extracción, con una mezcla de glutaldehído al 3% y formaldehído al 3% preparadas en tampón cacodilato 0,1 y pH 6,3. Luego de 12 horas de fijación, las muestras se posfijaron durante 24 horas en tetraóxido de osmio al 1%, preparado en igual tampón. Todo el proceso de fijación y postfijación se realizó a 4°C. Culminada la postfijación, los pequeños fragmentos fueron deshidratados en soluciones de concentración ascendente de alcohol etílico a 30, 40, 70, 80 y 100%, finalizándose la deshidratación en óxido de propileno puro.

La inclusión se realizó en la resina epoxídica Eponate. Una vez polimerizados los bloques de resina, se hicieron cortes de 1 µm de espesor para microscopía fotónica de alta resolución y cortes de 90 nm para su observación en un microscopio electrónico Hitachi H-7000.

Los cortes gruesos fueron coloreados con azul de toluidina al 1%, preparado en tetraborato de sodio y los cortes finos se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo, de acuerdo al procedimiento desarrollado en el laboratorio del Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela [28].

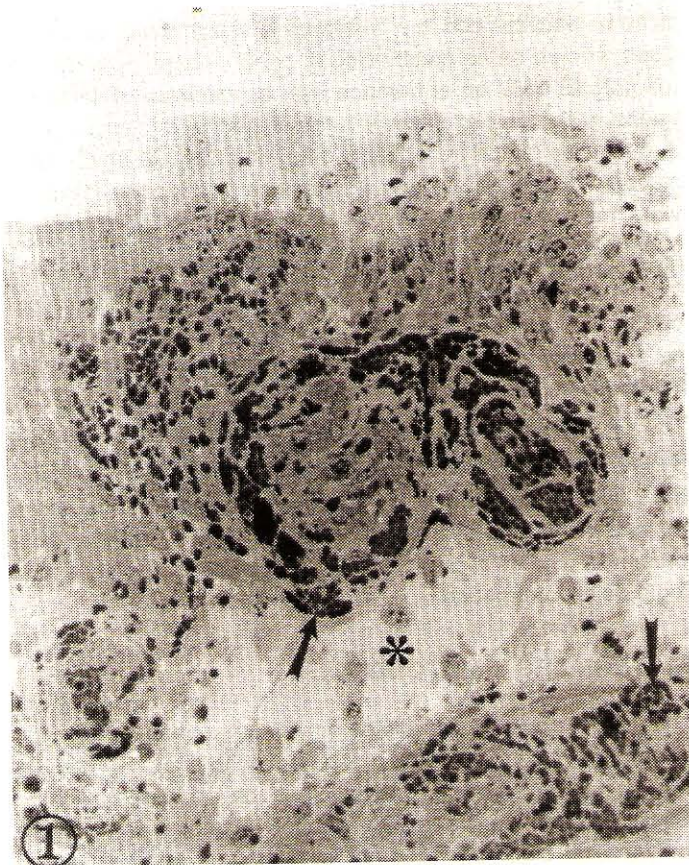


## RESULTADOS

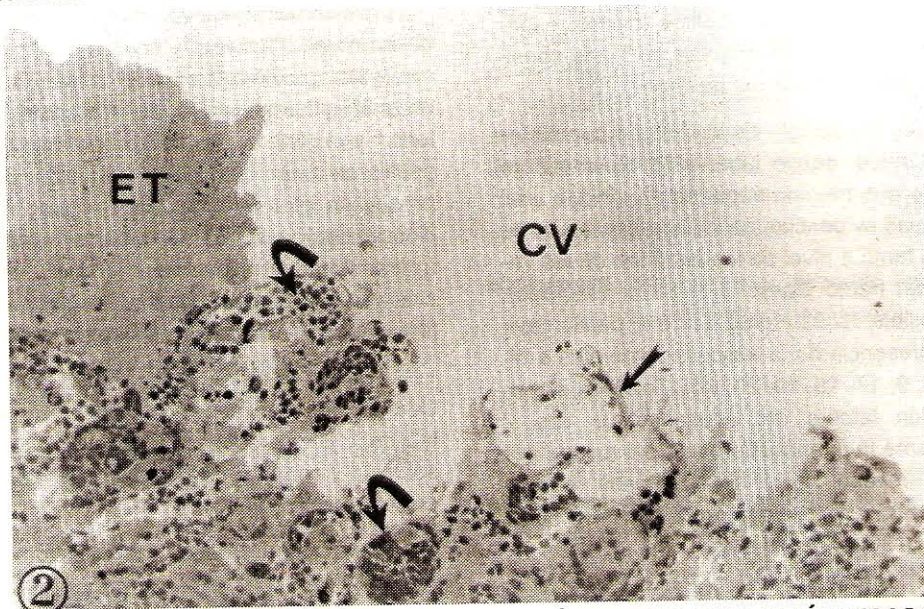
### Observaciones en microscopía fotónica

En los cortes gruesos (1  $\mu$ m) se observó la existencia de diversos grados de alteraciones de la pared de la vejiga urinaria de las muestras. Se estudiaron un total de seis (6) muestras de pared vesical y en todas ellas se comprobó la existencia de úlceras, algunas de las cuales se encontraban en proceso de regeneración, que alternaban con zonas sanas. En todos los casos, los focos hemorrágicos iniciaban el fenómeno de la ulceración, FIG. 1. El tejido conjuntivo subepitelial de la lámina propia, en las zonas de hemorragia, contenía masas de glóbulos rojos extravasados, empaquetados con elementos celulares y con componentes no celulares de la lámina propia. En el tejido conjuntivo, alrededor o en vecindad a la masa de glóbulos rojos, se apreciaban discontinuidades o cavidades edemáticas. El epitelio de transición, inmediatamente por encima de las lesiones hemorrágicas mostró alteraciones en su histoarquitectura y las células epiteliales se apreciaban desarrregladas y algunas hasta desprendidas, FIG. 1.

En la zona de exposición de la lámina propia a la cavidad vesical, se apreció ruptura del epitelio de transición al aumentar la necrosis subepitelial. Este fenómeno consolidaba la formación de las cavidades ulcerosas de la pared, con la consecuente expulsión de sangre y de material de la lámina propia de la pared vesical. Así mismo, se observó que los fragmentos tisulares se desprendían conjuntamente con la sangre. En las zonas próximas a la úlcera así formada, se observaron regiones epiteliales que aún conservaban sus características normales, FIG. 2, ET.

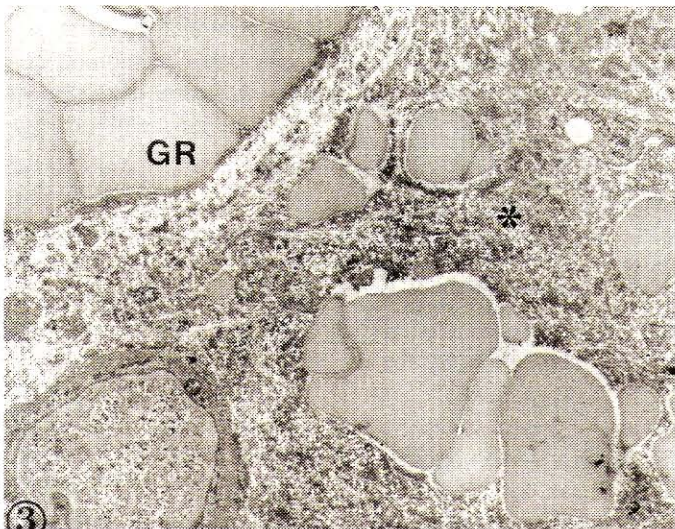


**FIGURA 1. SE APRECIA UN FOCO HEMORRÁGICO MÚLTIPLE (FLECHAS) UBICADO SUBEPITELIALMENTE. NÓTESE EL DESARREGLO DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO. ENTRE LAS MASAS HEMORRÁGICAS SE VE UNA CAVIDAD EDEMÁTICA (ASTERISCO). NÓTESE LA AUSENCIA DE ELEMENTOS DE INFILTRACIÓN INFLAMATORIA. X 360.**



**FIGURA 2. EN TODAS LAS MUESTRAS OBSERVADAS SE APRECIÓ LA PRESENCIA DE ÚLCERAS CON PÉRDIDAS DEL EPITELIO, COMO SE OBSERVA EN ESTA FOTOGRAFÍA. LAS FLECHAS CURVAS INDICAN MASAS DE GLÓBULOS ROJOS VIRTUÉNDOSE A LA CAVIDAD VESICAL (CV). LA FLECHA RECTA SEÑALA LOS RESTOS TISULARES DE LA LÁMINA PROPIA. EN CONTINUIDAD A LA ÚLCERA SE APRECIAN LOS BORDES DE EPITELIO DE TRANSICIÓN SANO (ET). X 360.**





**FIGURA 3. SEGMENTO DE LA LÁMINA PROPIA EN LA CUAL SE VEN GLÓBULOS ROJOS (GR) EXTRAVASADOS Y DEFORMADOS, EN GRUPOS DE DIVERSOS TAMAÑOS. EL ASTERISCO INDICA EL LECHO CONJUNTIVO EN FRANCO DETERIORO, A JUZGAR POR LA FRAGMENTACIÓN Y DESARREGLO DE LAS FIBRAS DE COLÁGENO. X 10.000.**

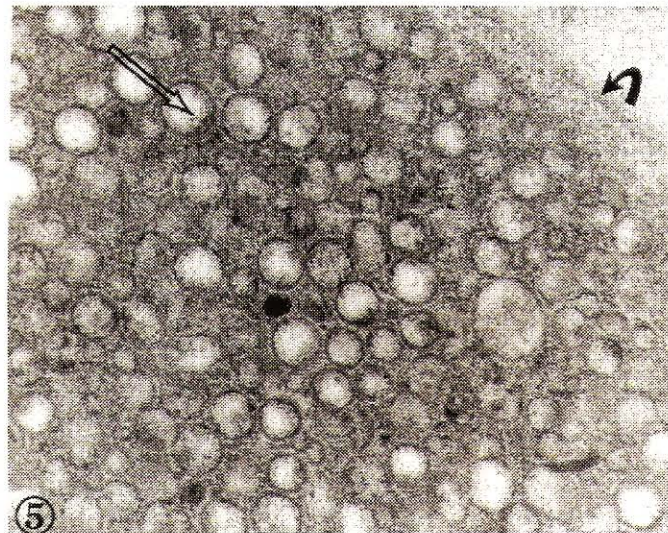


**FIGURA 4. EN ESTA IMAGEN, A MAYOR AUMENTO, SE PUEDE OBSERVAR MEGAVACUOLAS RODEADAS DE MEMBRANA, CONTENIENDO MICROVESÍCULAS, CLARAS Y OSCURAS. UNA MEGAVACUOLA (FLECHA CURVA), PRODUCE DEFORMACIÓN DEL NÚCLEO CELULAR (N), EL CUAL SE OBSERVA MÁS CLARO DE LO USUAL. X 10.000.**

**Observaciones con el microscopio electrónico de transmisión (MET)**

Al MET las zonas afectadas mostraban glóbulos rojos empaquetados que adoptaban formas poliédricas debido al proceso de agregación. Las masas de glóbulos rojos variaban de tamaño y algunos podían verse aislados o en grupos de 2 a 3, FIG. 3. En estas regiones epiteliales se observó la presencia de células conjuntivas, fibrocitos y hasta células epiteliales desplazadas e inmersas en la masa de tejido conjuntivo. Contribuyendo a la conformación de las masas necróticas subepiteliales, se encontraban abundantes fibras de colágeno dispersas y orientadas en cualquier dirección del espacio y masas amorfas de material proteico, así como restos celulares. No se observó, en ninguna muestra, la presencia de infiltrados monocitarios ni de macrófagos.

Es de resaltar el hecho de que en numerosas células epiteliales, endoteliales y en fibrocitos, se encontraron grandes vacuolas, FIG. 4, que contenían en su interior elementos microvesiculares, algunos densos y otros claros. Estas megavacuolas alcanzaban proporciones tan grandes que deformaban el núcleo celular, FIG. 4. Estaban rodeadas por una membrana, al igual que las microvesículas, que también poseían una unidad de membrana continua y homogénea, FIG. 5. Las microvesículas eran de diversos tamaños, con un diámetro promedio de 182,29 nm y el contenido de las mismas también era variable, algunas tenían un material electrón denso adherido a la superficie interna de la membrana que las conformaban, FIG. 5, flecha recta, mientras otras poseían un material granu- loso, fino o grueso, en su interior.



**FIGURA 5. SEGMENTO DE UNA MEGAVACUOLA. LAS MICROVESÍCULAS CONTIENEN EN SU INTERIOR MATERIAL GRANULOSO, EN DIFERENTES GRADOS DE COMPACTACIÓN. LA FLECHA RECTA INDICA UNA ACUMULACIÓN DE MATERIAL ELECTRÓN DENSO EN FORMA DE SEMILUNA, QUE SE ADHIERE A LA MEMBRANA DE LA VESÍCULA. LA FLECHA CURVA SEÑALA LA MEMBRANA DE LA MEGAVACUOLA. X 64.000.**

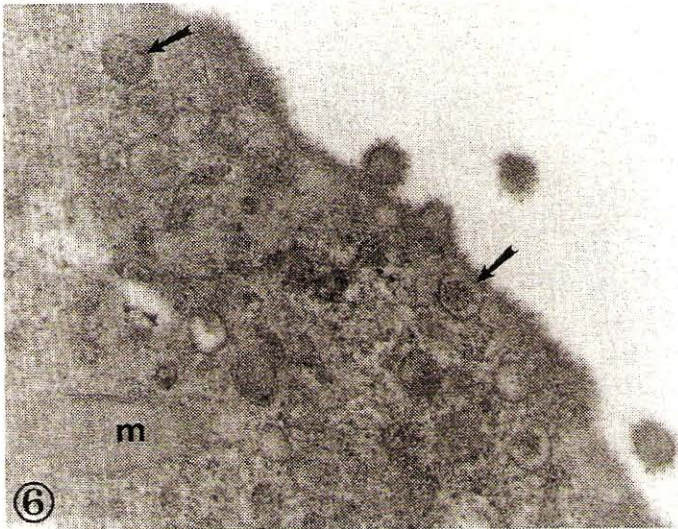
Las megavacuolas se observaron siempre en proximidad al núcleo celular, nunca se encontraron en las regiones citoplásmicas próximas a la superficie; mientras que si se detectaron microvesículas, no contenidas en megavacuolas, en las porciones ectocitoplásmicas de las células epiteliales, FIG. 6, así como dispersas en el citoplasma de células endoteliales y de fibrocitos, FIGS. 7 y 8.



Cuando las microvesículas se estudiaron a mayor aumento, se observó que un alto porcentaje de ellas presentaban en su interior una masa de configuración polihexagonal, con diámetro promedio de 104 nm, más electrón-densa que el resto de la estructura y muy semejante al cápside de algunos virus, FIGS. 7 y 8. Estas microvesículas, también contenían otras

membranas en su interior y partículas esferoidales en el centro, constituyéndose en vesículas con doble membrana que englobaban esferoides proteicos, FIG. 8, flecha recta. En las FIGS. 7 y 8, se nota claramente la unidad de membrana que rodeaba la estructura semejante a virus.

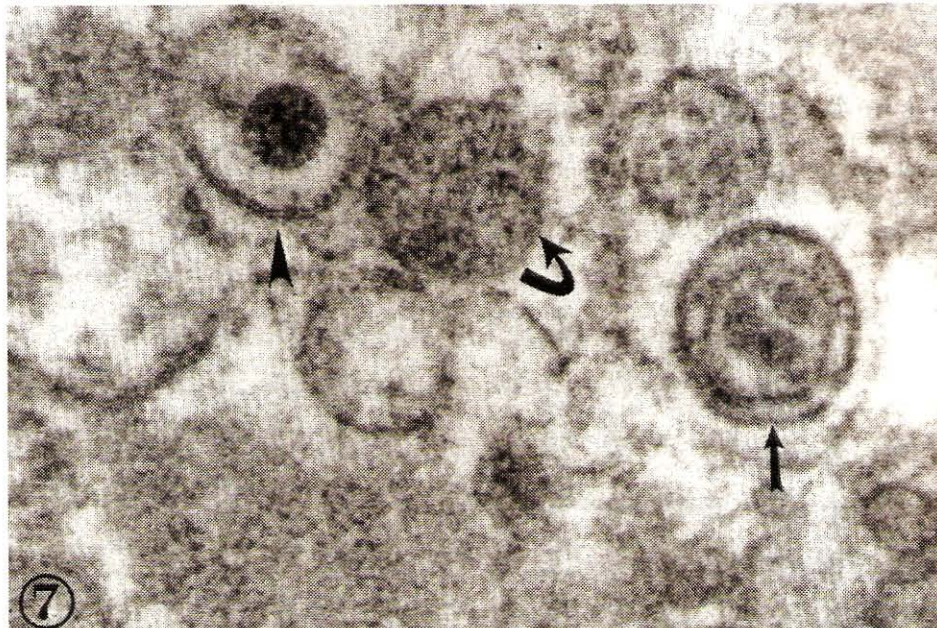
Las células epiteliales perdían sus características normales, tales como las cisternas elípticas subsuperficiales, que sirven a los efectos de los cambios plásticos durante el llenado y vaciado vesical, FIG. 9. Por el contrario, aparecían en la superficie de las células epiteliales o urocitos, extensiones digitiformes cortas y recubiertas de un material filamentosso erecto de 9 nm en promedio, que le daba un aspecto espinoso a estas proyecciones citoplasmáticas; en el interior de estas extensiones se observó un material parecido al contenido en las microvesículas semejantes a virus. Otro aspecto interesante a destacar es, que estas proyecciones se podían observar también desprendidas de la célula, adoptando formas esferoidales, apreciándose en su interior, la misma organización polihexagonal del material electrón-denso que apreciamos en las microvesículas semejantes a virus, FIG. 10, flechas.



**FIGURA 6. EN LA PORCIÓN MÁS EXTERNA DEL CITOPLASMA DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA VEJIGA, SE OBSERVA LA DESAPARICIÓN DE LAS VESÍCULAS ELÍPTICAS NORMALES EN ESTAS CÉLULAS Y LA PRESENCIA DE MICROVESÍCULAS CON ESTRUCTURAS SEMEJANTES A VIRUS (FLECHAS) EN SU INTERIOR. NÓTESE LA PRESENCIA DE VESÍCULAS SEMEJANTES EMERGIENDO EXOCÍTICAMENTE. M, MITOCONDRIA, X 40.000.**

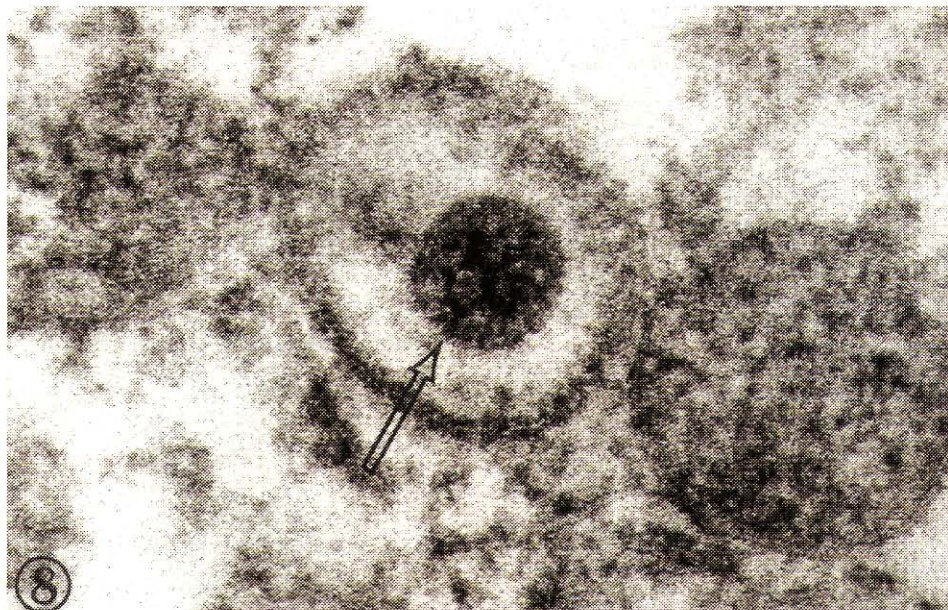
## DISCUSIÓN

Los resultados encontrados sugieren que la hematuria presente en los animales estudiados, es producida por un fenómeno de ulceración múltiple de la pared vesical. Estos procesos ulcerativos tienen inicio en fenómenos producidos en el espesor de la pared, en la lámina propia, y concluyen en la erosión, de adentro hacia fuera, del epitelio de transición de la vejiga urinaria. Cuando se configura el cuadro ulcerativo se

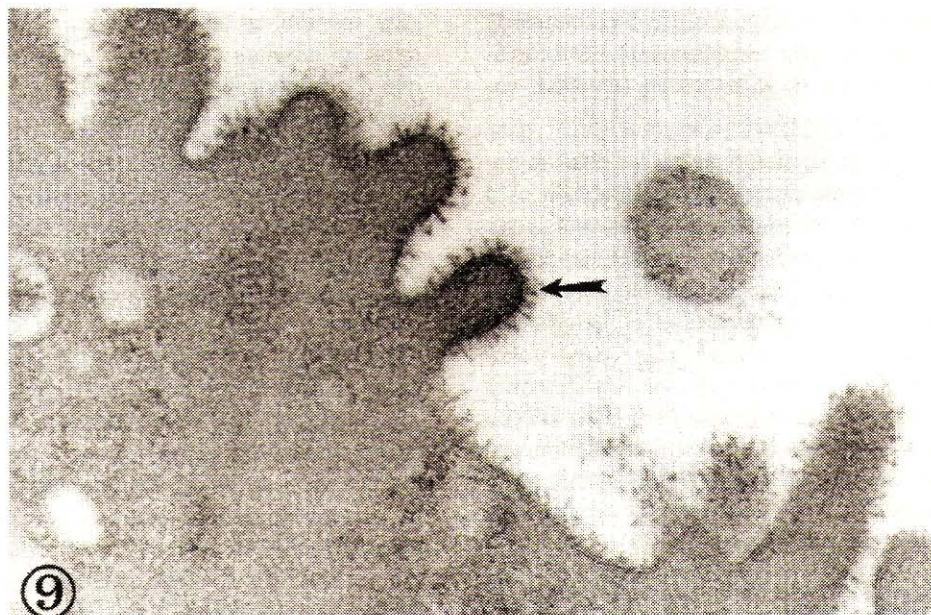


**FIGURA 7. EN ESTA IMAGEN, A MAYOR AUMENTO, PODEMOS APRECIAR LA DIVERSIDAD DE ESTRUCTURAS DE LA PROGENIE VIRAL, CONTENIDAS EN LAS MICROVESÍCULAS. ALGUNAS TIENEN DOBLE MEMBRANA, COMO LA INDICADA CON LA FLECHA RECTA, OTRAS CONTIENEN MATERIAL GRANULOSO Y MICROFILAMENTOSO (FLECHA CURVA) Y OTRAS EL CÁPSIDE VIRAL (CABEZA DE FLECHA). X 130.000.**





**FIGURA 8. SEGMENTO MUY AUMENTADO DE LA FIGURA ANTERIOR, CORRESPONDIENTE A UNA CÉLULA ENDOTELIAL DE LA LÁMINA PROPIA DE LA VEJIGA, EN LA CUAL SE APRECIA CLARAMENTE UN VIRUS RODEADO POR UNA UNIDAD DE MEMBRANA CONTUNUA. NÓTESE EL ARREGLO DEL CÁPSIDE (FLECHA). LA MICROVESÍCULA DE LA DERECHA CONTIENE MATERIAL GRANULOSO Y MICROFILAMENTOSO. X 200.000.**



**FIGURA 9. EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS EPITELIALES SE APRECIA LA EXOCITOSIS DE LAS MICROVESÍCULAS VIRALES RODEADAS DE ESPÍCULAS DENSAS (FLECHA), COMO ES CARACTERÍSTICO DE ESTOS VIRUS. X 80.000.**

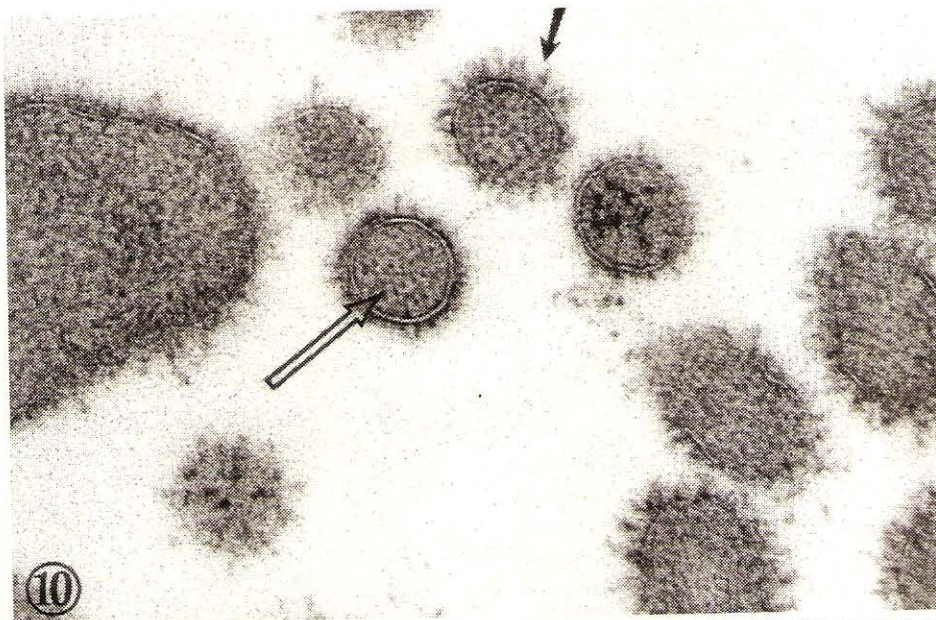
desprenden, desde la úlcera, glóbulos rojos y restos de la lámina propia, además de fragmentos del epitelio que recubren la zona afectada.

Resulta evidente que estas hemorragias, que concluyen en necrosis focal y múltiple, se transforman en un proceso hemorrágico agudo, el cual a su vez, al no permitir la regeneración de las zonas afectadas se transforma en un proceso crónico que no produce la muerte del animal, pero que deteriora su salud. Cuando el proceso es masivo, es obvio que puede

terminar en la muerte del mismo. El punto de partida de la hemorragia está en la ruptura de la integridad de los capilares y probablemente, de otros elementos vasculares de menor calibre que irrigan la lámina propia de la vejiga.

Dichas aseveraciones se corresponden en gran parte, con los pocos elementos de la patogenia de la enfermedad, ya que hasta ahora no se ha logrado establecer la forma de desarrollarse las lesiones. Los hallazgos encontrados coinciden en forma parcial con los descritos por varios autores consultados





**FIGURA 10. EN EL ESPACIO URINARIO SE ENCUENTRAN, EN PROXIMIDAD DEL EPITELIO, VIRUS CON MEMBRANAS RECUBIERTAS DE ESPÍCULAS O PROYECCIONES DENSAS DE 9 NM DE LONGITUD APROXIMADAMENTE (FLECHA CORTA). EN EL INTERIOR SE VE LA ORGANIZACIÓN ISOMÉTRICA DEL VIRUS (FLECHA LARGA). X 128.000.**

[33, 37, 42, 43, 44], sin embargo, no fueron observadas lesiones pedunculadas en relieves, ni tampoco cambios celulares característicos de malignidad, evidenciándose las ulceraciones, cicatrización y deformidad de la pared de la vejiga, comúnmente descritas.

La razón probable de la aparición de las lesiones endoteliales detectadas, sería la presencia de una infección viral importante en varios tipos de células de la pared vesical, incluyendo las vasculares. El virus presente fue caracterizado por sus dimensiones y demás características morfológicas, como perteneciente a la familia de los *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesvirinae* o grupo de los Citomegalovirus. Doane y Anderson, sostienen al respecto: "Estos virus son isométricos y de 120-200 nm de tamaño, tienen una masa central de ADNds de  $80-15 \times 10^6$  MW, en forma de espira cilíndrica condensada. Tienen además un cápside de 100-110 nm, con simetría isocáedrica, conteniendo hasta 160 capsómeros" [13], lo cual coincide con las características encontradas.

Se ha descrito también, que el virus está rodeado por un segmento de material proteico globular o granuloso que envuelve al cápside [4, 13, 22], lo cual coincide con las características del virus encontrado, y que además, el virus está envuelto por una membrana o bicapa que tiene proyecciones densas de 8-10 nm [4, 13], como las evidenciadas en el presente reporte, FIGS. 9 y 10. Estas membranas externas son provistas, probablemente, por las citomembranas de las células invadidas, tanto nucleares como citoplasmáticas, y la propia membrana plasmática.

El grupo de la familia de los herpes tiene la propiedad de acumularse en grandes vacuolas [4, 13, 22], como en el caso estudiado, FIG. 4, y en el interior de estas vacuolas se en-

cuentran virus en diferentes estadios de maduración [13]. De igual manera, se ha determinado [4, 21, 22] que elementos virales en distintas fases de la progenie, se encuentran cercanos a la superficie celular y son expulsados recubiertos por la membrana celular; estos hallazgos también fueron evidenciados, FIGS. 9 y 10.

En razón de la infección por CMV demostrada y, que diversas referencias sostienen que tales virus se mantienen en estado de latencia, ocasionando sólo manifestaciones clínicas cuando el sistema inmunológico se ve disminuido en su función [10, 16, 21] y, que por otro lado está suficientemente documentada la estrecha relación del helecho macho (*Pteridium aquilinum*) con la aparición de la HEB [2, 32, 37, 39, 40, 45], se sugiere que en el municipio Campo Elías, pudiese estar presentado la enfermedad como consecuencia de la combinación de estos dos agentes etiológicos. De tal manera, que los inmunodepresores y carcinógenos presentes en el helecho, estarían actuando como agentes primarios, provocando entre otras, una disminución de la línea defensiva de los bovinos, facilitando así la acción viral y la presencia de la enfermedad.

En el mismo orden de ideas, se puede señalar que, a pesar de no lograrse evidencias de la posible intervención de los papilomavirus bovinos (PVB), como agente causal de la enfermedad en las muestras de vejiga urinaria estudiadas, la alta incidencia (40%) de papilomatosis cutánea clínica demostrada a nivel de la glándula mamaria, sumada a la posible latencia descrita para el PVB-2 y su posible activación en presencia de los inmunodepresores del helecho [8, 9, 18, 19, 20, 23, 24, 36], deja abierta un área razonable que debe ser estudiada.



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La masiva invasión viral por CMV se considera responsable de las lesiones encontradas en la vejiga urinaria de los animales estudiados con HEB, sugiriendo que una posible acción inmunosupresora ocasionada por el consumo del helecho macho (*Pteridium aquilinum*), pudiese servir de detonante a la acción viral.

El proceso patológico comienza por afectar la integridad capilar que conduce a las hemorragias subepiteliales, concluyendo en la ruptura, por necrosis y ulceración, de la pared vesical.

Se muestra la eliminación de los CMV a través de la orina, durante el proceso de multiplicación viral; estos virus son vertidos a los campos de pastoreo por esa vía, donde el mismo animal puede ser re infectado, así como otros animales del rebaño, pudiéndose propagar la infección a otras especies.

Son necesarios e indispensables nuevas investigaciones que permitan la redefinición de los agentes etiológicos involucrados en la HEB.

## AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento al personal técnico del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes por su asistencia en el estudio, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia y, al Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes por el financiamiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONSO, M.E.; PÉREZ, M.; CALCAGNO, M.P.; JAIMES, E.R. Quantification of Pterosins A and B, The Main Carcinogen of *Pteridium aquilinum* (L.Kuhn), by High Pressure Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**. 3:160-164. 1992a.
- [2] ALONSO, M.E.; PÉREZ, M.; CALCAGNO, M.P.; JAIMES, E.R.; CASTILLO, U. Ontogenic Variation of Biologically active Metabolites of *Pte. aquilinum* (L.Kuhn), Pterosins A and B, and Ptaquiloside in a Bracken Population of the tropical Andes. **Journal of Chemical Ecology**. 18, (8): 1405-1420. 1992b.
- [3] ALONSO, M.E.; RODULFO, S.; JAIMES, E.R. Comparative Dynamics of Ptaquiloside and Pterosin B in the Two Varieties (caudatum and aracchnoideum) of Neotropical Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* L.Kuhn). **Biochemical Systematics and Ecology**. 23(7-8): 709-716. 1995.
- [4] BIA, F.J. Cytomegalovirus infection in Guinea Pigs. Persistent viruria, blood transmission and viral interference. **J. Infect. Dis.** 140: 914-920. 1979.
- [5] BIA, F.J. Vaccination for the prevention of maternal and fetal infection with *Guinea pig* cytomegalovirus. **J. Infect. Dis.** 142: 732-738. 1980.
- [6] BIA, F.J. Effects of vaccination of cytomegalovirus-associated interstitial pneumonia in strain 2 *Guinea Pigs*. **J. Infect. Dis.** 145: 742-747. 1982.
- [7] BROBST, D.F.; OLSON, C. Neoplastic and proliferative lesions of bovine urinary bladder. **Cancer Research**. 25: 12. 1965.
- [8] CAMPO, M.S.; JARRETT, W.F.H.; KAMBO, P.K.; BARRON, R.; O'NEIL, B.W.; SMITH, K.T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**. 52, 24: 6898 -6904. 1992.
- [9] CAMPO, M.S.; JARRETT, W.F.H.; O'NEIL, W.; BARRON, R.J. Latent papillomavirus infection in cattle. **Research in Veterinary Science**. Vol. 56(2): 151-157. 1994.
- [10] COOK, J.E. Salivary-gland virus disease of Guinea Pigs. **Journal of the National Cancer Institute**. 20: 905-909. 1958.
- [11] COOPER, G.A. Defense Strategies in Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* L.Kuhn. **Modern Botany Garden**. 77: 281-286. 1990.
- [12] COSTA D.J.F.; FERREIRA L.M.; CABRAL, A.; CONCEIÇÃO, M.; AFONSO, F.; CORREIA, J. Anatomopathological and clinical aspects of Enzootic Haematuria in cattle. **Rev. Portuguesa de Cs. Veterinarias**. 90, 515: 132-137. 1995
- [13] DOANE, F.W.; ANDERSON, N. Electron microscopy in diagnostic virology. A practical guide and atlas. **Cambridge University Press**. New York: 1-178. 1987
- [14] FAN, L.C.R.; MOREIRA, E.; SCHONS, J.A.B.; POST, H. Haematological findings of enzootic haematuria in cattle. Achados hematológicos da hematuria enzootica em bovinos. **Cienc Rurais**, Universidad Federal de Santa Maria. Portugal. 9(3): 343-347. 1979.
- [15] GOETZE, R. Bracken fern associated with bovine haematuria. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**. 50: 57-61. 1942.
- [16] GRIFFITH, B.P. Brain and visceral involvement during congenital cytomegalovirus infection of *Guinea Pigs*. **Pediatr. Res**. 16: 455-459. 1982.
- [17] HOPKINS, N.C.G. Aetiology of Enzootic Haematuria. **Veterinary Record**. 118: 715-717. 1986.
- [18] JACKSON, M.; CAMPO, S.M.; GRAUKONER, J.M. Cooperation Between Papillomavirus and Chemical Cofactors in Oncogenesis. **Critical Reviews in Oncogenesis**. 4: 277- 291. 1993.



- [19] JARRETT, W.F.H.; O'NEIL, P.E.; GRIMSHAW, W.T.R.; SELMAN, I.E.; MCINTYRE, W.I.M. High Incidence area of Cattle Cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. **Nature**. 274: 215-217. 1978.
- [20] KAMINJOLO, J.S.; MUGERA, J.M.; ROSTEL, A.F. Latent virus infection and enzootic haematuria in cattle. (Abstract). **Zentralblatt für Veterinärmedizin**. B19: 629-633. 1972.
- [21] KUMAR, M.L.; PROKAU, S.L. Experimental primary cytomegalovirus infection in pregnancy: Timing and Fetal outcome. **Am. J. Obstetr. Gynecol.** 145: 56-60. 1983.
- [22] Mohanty, S.B.; Dutta, S.K. **Virología Veterinaria**. Editorial Interamericana. Mexico.: 113-124. 1983.
- [23] MUSCA, M.; BALE, G.; KADAR, L.; GERGARIU, S. Blood biochemistry in cow with Enzootic Haematuria. **Revista Romana de Medicina Veterinaria**. 5(1): 11-20. 1995.
- [24] OLSON, C.; PAMAKCU, A.M.; BROBST, D.F. Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumors. **Cancer Research**. 25: 840-849. 1965.
- [25] ORTEGA, F. El Género Pteridium en Venezuela: Taxonomía y Distribución geográfica. **Biollania**. 7: 47-56. 1990.
- [26] PACHAURI, S.P.; SHARMA, V.K.; JOSHI, H.C. Assay of fractions of bracken fern for carcinogenic activity. **Indian Journal of Animal Science**. 1: 898-901. 1981.
- [27] PACHECO, J.J.; PÉREZ, L. **Malezas de Venezuela**. Editorial Central. Maracay.: 262-264. 1989.
- [28] PALACIOS -PRÜ, E.L.; PALACIOS, L.; MENDOZA, R.V. Synaptogenetic mechanism during chick cerebellar development. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**. 1: 145-167. 1981.
- [29] PAMACKU, A.M.; PRICE, J.M.; BRYAN, G.T. Naturally occurring and bracken fern induced bovine urinary bladder tumors. **Veterinary Pathology**. 13: 110-122. 1976.
- [30] PENBERTHY, J. Vegetable poisoning simulating anthrax in cattle. **Journal Comparative Pathology**. 6: 266-275. 1893.
- [31] QUEZADA, M.; POQUET, N.; HEBEL, P.; LETELIER, N. Haematuria associated with a urinary bladder in cattle. **Agro Ciencia**. 8(1): 49-52. 1992.
- [32] RAO, D.S.T.; JOSHI, H.C.; KUMAR, M. Biochemical findings in bracken fern in calves. **Internacional Journal of Animal Sciences**. 3: 33-38. 1988.
- [33] RAO, D.S.T.; JOSHI, H.C.; KUMAR, M.; SING, G.K. Pathological studies on Bracken Fern (*Pteris aquilina*) induced haematuria in calves and rats. **Indian Journal of Animal Sciences**. 60(6): 654-656. 1990.
- [34] ROSENBERGER, G. Nature, manifestations, causa and control of chronic enzootic haematuria in cattle. (Abstract). **Wien Tierärztlich Wochenschrift**. 52: 215-218. 1965.
- [35] SEIFI, H.; NOWROUZIAN, I.; ZAKARIAN, B. Risk factors associated with bovine urinary bladder tumors in Iran. **Preventive Veterinary Medicine**. 22: 55- 60. 1995.
- [36] SIEGSMUND, B.M.; WAYS, A.; AMTMANN, E. Activation of Latent Papillomavirus Genomes by Chronic Mechanical Irritation. **Journal of General Virology**. 72: 2787-2789. 1991.
- [37] SINGH, R.P.; JOSHI, H.C.; KUMAR, M. Experimental bracken fern toxicity in calves - changes in blood and urine. **Indian Journal of Veterinary Medicine**. 7: 96-100. 1987.
- [38] SMITH, B.L.; LAUREN, D.R.; EMBLING, A.P.; AGNEW, M.P. Ptaquiloside in Australia and New Zealand ferns as a cause of neoplasia. **AIAS Ocasional Publication**. 40: 241-246. 1990.
- [39] SMITH, B.L.; SEAWRIGHT, A.A.; NG, J.C.; HERTLE, A.T.; THOMSON, J.A.; BOSTOCK, P.D. Concentration of Ptaquiloside, a major carcinogen in Bracken Fern (*Pteridium* spp.) from Eastern Australia and from a Cultivated Worldwide Collection Held in Sidney, Australia. **Natural Toxins**. 2(6), 347- 353. 1994.
- [40] SMITH, B.L.; SEAWRIGHT, A.A. Bracken Fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health a brief report. **Natural Toxins**. 3(1): 1-5. 1995.
- [41] STORRAR, D.N. Cases of vegetable poisoning in cattle. **Journal Comparative Pathology**. 6: 276-279. 1893.
- [42] TRIPATHI, S.C.; JOSHI, H.C.; KUMAR, M. Blood chemical changes in experimental Bracken Fern induced Haematuria in Calves. **Indian Journal of Animal Sciences**. 59(7): 835-837. 1988.
- [43] TRIPATHI, S.C.; JOSHI, H.C.; KUMAR, M.; SHARMA, S.N. Pathological observations on experimental bracken fern toxicity in calves. **International Journal of Animal Sciences**. 5: 221-224. 1990.
- [44] XU, L.R.; WANG, Y.D.; WEN, L.J.; HE, K.R.; MA, W.L.; YOU, S.Z.; YANG, K.X. Poisoning and enzootic haematuria in cattle. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**. 15: 211-215. 1984.
- [45] XU, L.R. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. **Res. Vet. Sci.** London: Bristish Veterinary Association. 53(1): 116-121. 1992.