

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DIAGNÓSTICO DE HEMATURIA ENZOÓTICA BOVINA EN
GANADO DE AGOSTADERO EN EL NORTE DEL ESTADO DE
DURANGO**

TESIS

POR

YARENI ARACELI LÓPEZ PACHECO

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila

Enero 2010

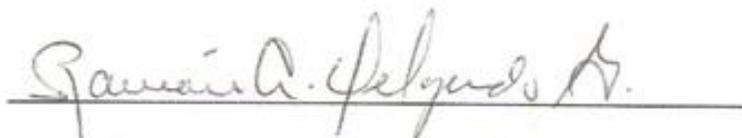
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL.

Tesis

**DIAGNÓSTICO DE HEMATURIA ENZOÓTICA BOVINA EN
GANADO DE AGOSTADERO EN EL NORTE DEL ESTADO DE
DURANGO**

Aprobada por el comité particular de revisión

ASESOR PRINCIPAL



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



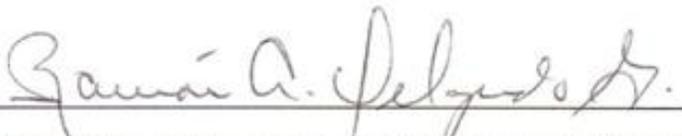
MC. JOSÉ LUÍS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS



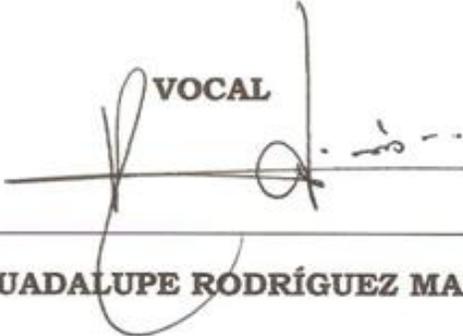
**DIAGNÓSTICO DE HEMATURIA ENZOÓTICA BOVINA EN GANADO DE
AGOSTADERO EN EL NORTE DEL ESTADO DE DURANGO**

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para obtener el título de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

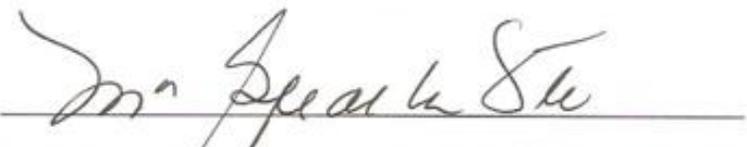
PRESIDENTE:



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTINEZ

VOCAL


MC. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE


MC. JUAN JOSÉ MUÑOZ VARELA

DEDICATORIA

A mis abuelitos: que se fueron al cielo

Y ahora bailan entre nubes

.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás:

Gracias por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes. GRACIAS por darme la maravillosa familia que tengo tanto López como Pacheco. Siempre serán mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa. Gracias por su esfuerzo, se convirtió en su triunfo y el mío, los amo.

A mis hermanos Israel y Andrea:

Por ser la mejor compañía y expresión de amor debajo del mismo techo.

A mis tíos, tías, abuela y primos:

No los menciono a todos porque realmente son demasiados!! Pero a todos los llevo en el corazón y sé que a todos hasta el más pequeño tengo algo que agradecerle, pero sobre todo a mi querido tío Toño, gracias por la excelente muestra de fortaleza y coraje que me has dado en estos meses.

A los hermanos que me ha dado la vida, Julieta y Esteban:

Gracias por mostrarme el mundo desde otra perspectiva, por su poder de decisión, libertad y voluntad, los adoro.

Al M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González.

Patólogo creo que no existen palabras para poder expresar lo agradecida que estoy con usted, gracias sencillamente por ser la base de mi vida profesional, gracias por todas las enseñanzas, por las oportunidades, los regaños, la comprensión, pero sobre todo por ser mi amigo y por inspirar en mi tanta admiración.

A mis amigos:

Jesús Contreras, José Luis Hernández, Nohemí Valerio, Azalia García, Linda Duarte, Zayra Hernández, Jorge Flores, Nelson Mendoza, Oscar Loza, Erick Juárez, Marlen Vázquez, Elizabeth Téllez, Anayanqui Roblero, Rafael Luna, Alejandro Juárez, Florentino Eusebio, Daian Pacheco, Zulema Avila, Abril Márquez, Enver Reyes, y sobre todo a mis niños SAAN, Corine Mendoza, Mayra Alvares, Mónica Venegas, Vania Lizarraga, Oscar Limones, José Luis Carrera, Mateo López; Gracias por no juzgar. Gracias por escuchar sin opinar. Gracias por hacerme saber que siempre estarás allí si te necesito. Gracias por hacerme saber que, aunque hago cosas que no comprendes, siempre me estás esperando. Gracias niños y niñas por estos maravillosos 5 años de amistad, por momentos tan memorables, tan felices, pero sobre todo a aquellos que me dieron amistad bien intencionada y a los que no también.

“Las mentes más profundas de todos los tiempos han sentido compasión por los animales”

Friedrich Nietzsche

Resumen

El presente trabajo se realizó con la finalidad de reportar la primera investigación de diagnóstico de la Hematuria Enzootica Bovina, en el municipio de Guanaceví, en el norte del Estado de Durango. Se reportó un caso clínico. manifestando que hace más de 15 años se han estado observando casos de orina roja con coágulos en ganado bovino. Los animales presentan pérdida progresiva de peso, palidez de mucosas, orina roja, letargia y muerte lenta. A partir de este antecedente se propuso investigar la causa de la enfermedad, se dio seguimiento a un bovino criollo hembra de seis años de edad que presentó mucosas pálidas, pérdida progresiva de peso y orina roja, que al sedimentar el sobrenadante era de un color amarillo pajizo transparente y el precipitado estaba compuesto de sangre y coágulos.

Se tomaron muestras de vejiga urinaria, se fijaron en formol al 10% amortiguado con fosfatos a pH 7.4 durante 48 horas, se procesaron con la técnica de rutina de inclusión en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La interpretación fue visual utilizando un microscopio de luz visible y descriptiva. Macroscópicamente la vejiga urinaria, al corte presentó engrosamiento severo y presencia de una masa tumoral multinodular de aproximadamente 7 cm de diámetro, color rojo oscuro, sólida pero consistencia suave, además de otras dos nodulaciones color rojo oscuro de 1 y 2 cm ligeramente elevadas. Las lesiones fueron de tipo polipoide caracterizadas por una masa pedunculada en forma de coliflor y apariencia blanquecina en su base y de color marrón en los extremos. Se encontró escasa orina roja con coágulos de sangre. Histológicamente se observó proliferación de una capa simple de células endoteliales bien diferenciadas formando capilares sanguíneos alineados con los espacios vasculares llenos de eritrocitos y escasos leucocitos y un estroma escaso de tejido conectivo laxo. El crecimiento se observó a partir de la submucosa con los márgenes bien demarcados pero no encapsulados. De acuerdo a las características morfológicas del tumor se diagnóstico hemangioma capilar.

Palabras clave: Hematuria enzootica bovina, *Pteridium aquilinum*, *Papilomavirus* bovino tipo 2, *ptaquelosido*, helecho macho, bovinos, hemangioma.

Índice

| | Página |
|---|---------------|
| Dedicatoria | i |
| Agradecimientos | ii |
| Resumen | iv |
| I. Introducción | 1 |
| II. Antecedentes | 2 |
| 2.1. Definición | 2 |
| 2.2. Etiología | 3 |
| 2.2.1. Helecho Macho (<i>Pteridium aquilinum</i>) | 3 |
| 2.2.1.1. Generalidades | 4 |
| 2.2.1.2. Toxicidad | 5 |
| 2.2.2. <i>Papilomavirus Bovino</i> tipo 2 | 7 |
| 2.3. Patogenia | 8 |
| 2.3.1 Importancia en la salud humana | 9 |
| 2.4. Signos clínicos | 10 |
| 2.5. Lesiones | 11 |
| 2.6. Diagnóstico | 13 |
| III. Justificación | 14 |
| IV. Objetivos | 15 |
| V. Material y Métodos | 16 |
| 5.1. Proceso Histológico | 16 |
| 5.2. Ubicación geográfica | 16 |
| 5.3. Muestras | 16 |
| VI. Resultados | 17 |
| 6.1. Descripción macroscópica | 17 |
| 6.2. Descripción microscópica | 17 |
| VII. Discusión | 18 |
| VIII. Conclusiones | 19 |
| IX. Literatura citada | 20 |

I. Introducción

La Hematuria Enzootica Bovina (HEB), es una toxicosis crónica de creciente relevancia mundial, que produce grandes pérdidas económicas y de salud. Dicha enfermedad afecta al ganado de explotaciones extensivas y de forma indirecta a los humanos.

La HEB se identifica clínicamente por hematuria intermitente, emaciación progresiva, anemia y muerte en animales de 4 a 12 años de edad. Esto se debe a que la vejiga urinaria presenta lesiones neoplásicas y no neoplásicas causadas por la ingestión del helecho macho, *Pteridium aquilinum* (Pa), por la infección del *Papillomavirus Bovino* tipo 2 (PVB-2) o la interrelación de ambos.

En la sierra de Durango es muy común encontrar la enfermedad, sin embargo, debido a los signos que se presentan puede ser confundida con enfermedades como anaplasmosis, clostridiosis, leptospirosis o piroplasmosis, las cuales producen orina roja por hemoglobinuria, la confusión se da debido a las continuas pérdidas sanguíneas a través de la orina. Por tal motivo se ha decidido hacer una investigación con el fin de identificar a través de histopatología, las lesiones en la vejiga urinaria producidas por los agentes carcinogénicos, mutagénicos e inmunosupresores del helecho, interactuando con el *Papillomavirus bovino* tipo 2.

La investigación se realizó a partir de un animal que presentó hematuria y donde la vejiga urinaria mostró cambios patológicos macroscópicos los cuales estén relacionados con la enfermedad o los signos clínicos de la misma. La recolección se efectuó en el rastro municipal de Guanaceví en el Estado de Durango.

El objeto del presente trabajo además de identificar las lesiones y realizar un diagnóstico de la enfermedad, fue contribuir con la definición y etiología de la HEB, para poder así informar y trabajar, a favor de los ganaderos de la región. Dada la importancia de la HEB y de los daños económicos que a ellos pueden producir en un futuro cercano.

II. Antecedentes

2.1. Definición

La Hematuria Enzootica Bovina (HEB) es un padecimiento no infeccioso que afecta principalmente a animales de pastoreo en áreas específicas del mundo. Esta enfermedad se caracteriza por lesiones en vejiga urinaria, las cuales se deben al prolongado consumo del Helecho macho (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn [Pa.]), a la infección por el Papilomavirus bovino tipo 2 o a la interrelación de ambos.

La HEB se define por cambios hematológicos como la presencia intermitente de sangre en la orina, con un período de regresión que varían de unas pocas semanas a unos pocos meses, seguida por anemia. El curso de la enfermedad suele ser de algunos años y se llega a presentar en animales de 4 a 12 años de edad. El cuadro clínico que acompaña a la HEB en todos los casos aparecen vesículas altamente vascularizadas en la pared interior de la vejiga urinaria. Estas vesículas son en realidad neoplasias en crecimiento, con una vascularización descontrolada, que finalizan por estallar y vaciar sangre directamente a la orina, por lo que conlleva a una anemia que debilita al animal (Alonso-Amelot, 1997). Las lesiones neoplásicas no llegan a ser únicas en vejiga urinaria, ya que se ha demostrado la presencia de tumores generalmente fibropapilomas en esófago (causando ronquera y tos en los animales) e intestino (Campo, 1997). Otras de las patologías que se llegan a observar son hemorragias internas en tubo digestivo, sistema respiratorio alto, corazón, páncreas, tiroides, riñón, útero y ovarios.

La gravedad de los signos va en aumento e inicia la debilidad general, complicaciones secundarias y la muerte. A la necropsia el bovino presenta tumores de origen mixto de diferentes tamaños y formas en la vejiga urinaria (Hopkins, 1986; Sánchez, 2003). Por otro lado, esta enfermedad se llega a presentar principalmente en hembras que en machos, algunas veces las hembras son menores de un año y ya se ha diagnosticado la enfermedad. Esto podría ser a causa de que su vida productiva es mucho más larga, por lo tanto, tienen un mayor lapso de tiempo de exposición a los agentes causales. No existe una predisposición por raza ni una edad específica (Gonzalez, 2003).

Existen varias teorías que intentan dar una explicación a la enfermedad, pero algo que se tiene bien claro es que la ingestión del helecho *Pteridium aquilinum* es el causante de la HEB. Los estudios que se basan en la composición química del *Pteridium aquilinum*, determinan la presencia de un compuesto llamado Ptaquelosido (Niwa. *et al*, 1983) el cual es el encargado de todos los signos de la HEB, pues al suministrarlo a los bovinos en raciones controladas se pudo inducir las lesiones tanto vasculares, como neoplásicas (Pamukcu,1967). Incluso, si la cantidad de ptaquilósido es suficientemente alta (> 10 g/animal/día en vacas) se llega a provocar un cuadro de intoxicación aguda, muy similar al que ocasiona la sobre-ingestión de helecho macho entero, que mata el animal en pocas horas (Alonso-Amelot, 1997).

La HEB es una enfermedad grave para la cual no existe un tratamiento definitivo, en ciertos casos se ha aplicado hierro y vitamina K con la intención de tener buenos resultados, sin embargo, la muerte siempre es inevitable, por tal motivo, algunos de los productores que llegan a reconocer este problema prefieren deshacerse de sus animales antes de que estos dejen de ser productivos.

La HEB se ha observado en numerosos países en los que llega a valores realmente críticos. Lugares tan diversos como Nueva Zelanda, Brasil, Suecia, Inglaterra, Canadá y las islas Fiji muestran pérdidas económicas por HEB.

La HEB es una enfermedad crónica de creciente relevancia a nivel mundial, siendo considerada una de las toxicosis de mayor interés económico y de salud pública (Sánchez-Villalobos, 2004) ya que se ha descubierto que los componentes carcinogénicos del helecho se acumulan en todo el cuerpo del ganado que se alimenta naturalmente con el helecho y es eliminado por la leche y orina, donde su actividad carcinogénica es preservada. (Pamucku, 1966).

2.2. Etiología

2.2.1. Helecho Macho (*Pteridium aquilinum*)

El helecho macho pertenece a la familia de las pteridáceas. Es una planta perenne, rizomatosa, herbácea, erecta y ramificada que mide entre 50 y 180 cm. Es cosmopolita,

pues está presente en todos los continentes exceptuando la Antártida, sobre todo se llega a presentar en regiones tropicales y templadas, principalmente en zonas montañosas con suelos ácidos y que se ubican en altitudes entre 1000 a 2000 m.s.n.m. Debido a sus propiedades reproductivas (por rizomas y esporas), así como a sus propiedades de conservación sobre la vegetación circundante, que favorecen su invasión a los potreros, es considerada una de las cinco malezas más importantes del mundo (Alonso–Amelot, 1999; Villalobos, 2000).

2.2.1.1. Generalidades

El helecho macho forma parte del:

- Reino: *Plantae*.
- Subreino: *Traqueobionta* (plantas vasculares).
- Clase: *Filicopsida*.
- Orden: *Polypodiales*.

Al helecho macho se le puede identificar además de *Pteridium aquilinum*, como *Pteris aquilina*, otros nombres comunes utilizados son Chipe, helecho hembra, ocopetate, yogo, pesma, helecho espada y alambrillo, entre las lenguas indígenas utilizadas en el sur del país se le conoce como Quin-guin, tzin, xual-kanil (Martínez, 1979).

En el mundo se llegan a encontrar hasta 12 variedades de *Pteridium aquilinum*, pero en América se han descrito solo dos, las cuales son: *caudatum* y *arachnoideum*, ambas son morfológicamente distinguibles:

La variedad *arachnoideum* es de mayor tamaño, alcanzando una alzada de 1.5 hasta más de 2.0 metros, los tallos son ásperos al tacto y sus hojas tienen el lóbulo, al lado opuesto del tallo.

La variedad *caudatum* es de menor tamaño, tallos lisos y sus hojas poseen en su base, un pequeño lóbulo apenas diferenciado.

La cantidad de sustancias tóxicas, varían de acuerdo a la edad de la planta, tipo de helecho, el mismo individuo y según la altitud sobre la que crezca el *Pteridium* (Alonso-Amelot, 1999).

El helecho crece en suelos pobres y ácidos, es muy resistente a nevadas o quemas; la combinación de alta viabilidad y crecimiento del helecho, con los hábitos de alimentación del bovino y la alta concentración de metabolitos en las plantas, incrementan el riesgo de envenenamiento sobretodo en épocas secas (Hopkins, 1986; Marrero, 2000).

2.2.1.2. Toxicidad.

En diferentes investigaciones realizadas acerca de la composición química del *Pteridium* se ha demostrado que el componente carcinogénico, mutagénico e inmunosupresivo de la plata es el *ptaquilosido*.

El *ptaquilósido* es un compuesto termoinestable, que se descompone a un segundo derivado químico denominado *dienona*. Este nuevo material es el tóxico verdadero, pues es poderosamente alquilante. Que es capaz de unirse químicamente con una gran cantidad de proteínas, ácidos nucleicos, y hasta ADN (Saveria *et al.*, 1992).

El helecho macho ha sido estudiado en múltiples ocasiones, y en los resultados se han observado una considerable cantidad de toxinas que llegan a ser altamente peligrosas. Por tal motivo es necesario que se conozca el riesgo que se adquiere al momento en que el ganado consume esta planta.

A continuación se describe la relación que existe entre al tamaño del helecho y su potencial tóxico.

El principal tóxico que encontraremos en la edad más juvenil es el cianuro, y el riesgo de ser consumido es muy alto, ya que es más aceptable para el ganado en las etapas tiernas. Sin embargo, cuando la planta llega a una edad madura, está compuesta por taninos y sílice, por tal motivo el riesgo es mucho menor, debido a la dureza del fronde y la poca palatabilidad de la planta (Alonso-Amelot, 1997).

En múltiples investigaciones realizadas en los últimos años se ha evidenciado la presencia de una sustancia carcinogénica en el helecho macho. Dentro de estas investigaciones se arrojaron resultados de animales que fueron alimentados con cantidades reguladas del *Pteridium* y presentaron carcinomas en la pared muscular de la vejiga urinaria, algunos se alimentaron con dosis más altas y llegaron a morir de intoxicación, pero sin la presencia de neoplasias (Pamucku *et al.*, 1967). Después se logró obtener la sustancia carcinogénica y mutagénica del helecho el *Ptaquilosido* (Pq), lo que se denominaría como el agente etiológico de la HEB (Niwa *et al.*, 1983), También se logró reproducir la formación de neoplasias en ratones que fueron alimentados con orina de bovinos, y estos al mismo tiempo estaban expuestos al consumo de *Pteridium*, por lo que los resultados sugirieron la presencia de una o más sustancias cianogénicas en la orina del ganado (Pamucku, 1966). El *Pteridium*, así como sus extractos, son tóxicos para todos los animales de experimentación a los que se les ha administrado. En los ratones produce múltiples adenomas pulmonares y diversos tipos de tumores intestinales. En las ratas produce adenocarcinomas y papilomas en el intestino y carcinomas escamocelulares y de células transicionales en la vejiga. En el intestino de codornices se desarrollan adenocarcinomas altamente malignos (Villalobos, 2000).

Con el tiempo se lograron aislar nuevas sustancias (glucósidos norsesquiterpénicos) equivalentes al Pq, los cuales han sido denominados: pteridanona z, isoptaquilósido y caudatósido, sin embargo sus propiedades patológicas no son totalmente conocidas y aún siguen en estudio (Castillo *et al.*, 2000).

El Pq, una vez que es capaz de traspasar la barrera fisiológica estomacal e intestinal del bovino, es apto para integrarse al torrente sanguíneo y alojarse en órganos como el hígado, riñón y vejiga urinaria siendo estos los órganos más perjudicados. De la misma manera traspasa la membrana celular y nuclear dando a lugar algunas aberraciones cromosomáticas (Kushida *et al.*, 1994).

Estos daños se verán reflejados en diferentes funciones celulares como procesos bioquímicos, refiriéndonos principalmente a la proteína P53, que es la encargada de regular la apoptosis, y la presencia de la *dienona* dará la formación y multiplicación de tejido

carcinogénico. De allí se inician las lesiones en diferentes partes del organismo lo que conlleva a que éste sea inviable y muera (Alonso-Amelot, 1995).

Estas plantas, al estar compuestas por tóxicos, son capaces de dañar al ganado de una forma drástica de diferentes maneras como puede ser: avitaminosis B1 con parálisis mecánica y de rumen, trombocitopenia aguda, daño renal y hepático, hemorragias en el tracto digestivo, neoplasias y HEB. Llega a ocasionar ceguera en caprinos, además de que sus efectos pueden ser transmitidos al hombre a través de la leche de estos animales, ya que se ha demostrado que la leche que contiene cantidades suficientes de Ptaquilosido puede ser el causante de cáncer esofágico y gástrico en humanos (Alonso-Amelot, 1997).

2.2.2. *Papillomavirus Bovino* tipo 2 (PVB-2)

El PVB-2 es un pequeño virus ADN oncogénico miembro del género *Deltapapilomavirus* de la familia *Papilomaviridae* (Fauquet, *et al.*, 2004). Este es un fibropapilomavirus que puede causar papiloma común en piel, fibropapilomas en el tracto digestivo y en la vejiga urinaria del ganado (Campo, 1997). Los *Papilomavirus* en general se caracterizan por ser estrictamente específicos de una especie aún estando en condiciones de experimentación no llegan a infectar a cualquier especie si esta no es su hospedador natural (Campo, 2006).

En investigaciones realizadas alrededor del mundo basadas en la etiología de neoplasias en vejiga urinaria en bovinos, se han confirmado la presencia del PVB-2, en donde al inducir el virus atenuado en animales de estudio, estos presentan signos clínicos y cambios patológicos característicos de HEB (Pamucku, 1967), otros estudios importantes han detectado a través del PCR la presencia de PVB-2 en animales con HEB natural y con HEB producida (Campo *et al.*, 1992; Borzacchiello *et al.*, 2001). Hace unos años se detectó a través de inmunohistoquímica la presencia del ADN de PVB-2 en 39 vejigas de vacas que habían sufrido de HEB (Roperto *et al.*, 2005).

Un posible mecanismo etiopatogénico es que el PVB-2 infecta el epitelio de la vejiga y produce infección latente (Borzacchiello *et al.*, 2003) Los químicos carcinogénicos e inmunosupresores del helecho actúan sinérgicamente con el virus e induce la formación

de lesiones neoplásicas (Campo *et al.*, 1990). También se reconoce que el consumo de toxinas del hehecho son capaces de inducir tumores en vejiga sin presencia de PVB-2 y que igualmente el *Papilomavirus* produce neoplasias en becerros, que no tienen acceso al hehecho (Peña *et al.*, 2005).

2.3. Patogenia

La patogenia de la HEB no está totalmente identificada pero se tienen evidencias para plantearla. Una vez que el bovino consume el *Pteridium aquilinum* (Pa), este se fermenta en el retículo y rumen, después se liberará el Pq, el cual será absorbido en estas cámaras y en el omaso, una vez que el Pq llega al abomaso una parte será destruida por el medio ácido en el que se encuentra, mientras que la otra parte llegará al intestino delgado donde se absorberá por las vellosidades, y se integrará al torrente sanguíneo y se distribuirá al hígado, riñón, músculo esquelético, glándulas mamarias, vejiga urinaria, etc. Una vez que el Pq se encuentre en un ambiente alcalino (como el de la vejiga urinaria) se transforma en una dienona, el tóxico del Pq, y ésta termina por unirse con ADN celular, a nivel de las adeninas, dando como resultado el fraccionamiento del ADN, lo que causará una alteración en los genes, principalmente a la proteína P53 que es la encargada de regular la apoptosis, lo que originará proliferación de lesiones neoplásicas en la mucosa vesical.

Las neoplasias que se producirán serán de tipo epitelial, mesenquimal o mixto, y se caracterizan por ser focos de ulceración que producirán hemorragias hacia el contenido urinario de la vejiga, dando así el cuadro clínico de hematuria. Si estas hemorragias llegan a ser profusas se dará la formación de coágulos dentro de la vejiga, lo que le causará un cuadro obstructivo severo e impedirá la micción del animal, por lo cual el bovino desarrollara un cuadro urémico y lo conducirá a la muerte. En dado caso de que no se dé el cuadro obstructivo, el animal sufrirá una anemia crítica, con depresión del tejido mieloide, con neutropenia y trombocitopenia, dando a lugar una hipoxia cerebral, shock hipovolémico, un paro cardiorrespiratorio, seguido por la muerte del animal.

Por otro lado, bajo condiciones ligeramente ácidas, el Pq se transforma en una sustancia denominada *pterosina* B, que no posee actividad carcinogénica. De manera

similar, la *dienona* tóxica cuando reacciona con aminoácidos que contienen sulfuros, se convierte en una *indanona* no tóxica, que tampoco posee actividad carcinogénica, lo que nos haría pensar que los aminoácidos que contienen sulfuros, se podrían utilizar para detoxificar el Pq (Alonso-Amelot, 1999; Gonzales, 2003; Potter *et al.*, 2000).

2.3.1 Importancia en la salud humana

Una vez que el contenido tóxico del Pa fue estudiado, las nuevas hipótesis de los investigadores se basan en la excreción del Pq, al demostrarse que el Pq se elimina en forma activa a través de la orina, las sospechas se inclinan sobre la leche y carne del ganado afectados por HEB (Marrero, 2001). Así que a partir de ese momento la salud pública empieza a ser un tema de gran trascendencia dentro de las investigaciones de la enfermedad, ya que permitiría la evaluación de los riesgos que corren los agricultores y consumidores locales de zonas donde la HEB es endémica.

Estudios realizados en Venezuela han revelado que efectivamente el Pq es excretado a través de la leche, y el humano al consumir 0.5 l de leche por día, de una vaca que produce 20 l al día y que haya consumido una dosis de 5000 mg de Pq/animal/día, estará ingiriendo de 1.75 a 13.4 mg de Pq, esto dependerá entre el tiempo en que la vaca consuma el helecho y el ordeño. Aunque no existen datos fiables de los efectos carcinogénicos que el *Ptaquilosido* puede tener sobre el humano, los efectos que se han demostrado sobre animales de laboratorio, nos permiten tener un pronóstico reservado del efecto que causará en los humanos. Estos efectos solo tendrán validez en zonas rurales en donde la leche sea consumida cruda (Alonso-Amelot, 1998).

Estudios realizados en Colombia mencionan que los primeros 10 años de vida son cruciales para determinar el riesgo de padecer cáncer gástrico en un futuro. Ya que las personas que vivieron su niñez en zonas hematóricas, tienen una mayor prevalencia de metaplasia intestinal, que es una lesión precursora de carcinoma gástrico de tipo intestinal (Correa, 1979).

Es por todos sabido que el sección de población que consume más leche son los infantes, no es de impresionarse entonces que sea el grupo de más alto riesgo en presentar

metaplasia intestinal, sobre todo si viven en lugares donde la HEB está presente. Sin embargo en Costa Rica se demostró que la población que presenta problemas carcinogénicas son mayores de 50 años y muchos de los casos presentados son en lugares donde no está presente la HEB, pero que en algún momento de su niñez estas personas vivieron en zonas de alto riesgo, y a partir de este punto se deduce que el riesgo de padecer carcinoma en Costa Rica, está determinado más por el lugar de nacimiento que por el lugar de residencia (Villalobos, 1985).

Se ha demostrado que la incidencia de carcinoma gástrico y esófago entre la población humana es muy alta en países como Japón y Nueva Zelanda (Shimkin, 1965), se ha sugerido que esto se debe a que la ingestión de Pa se encuentra en la dieta común de sus habitantes, y llegan a presentar una tasa de carcinoma gástrico dos veces y media mayor que el resto de la población (Villalobos, 1985).

En Venezuela, tienen índices muy altos de carcinoma gástrico en estados andinos, y estos son mucho mayores a comparación de las zonas bajas de ese país. Dentro de los casos de todos los tipos de cáncer presentados entre 1987 y 1990 muestran que el 28% corresponden a cáncer gástrico en hombres y el 23% en mujeres, siendo así el tipo de cáncer que causa más muertes en el país (Alonso-Amelot, 1997).

Entre estos dos fenómenos, el helecho carcinogénico y el cáncer gástrico humano, es posible que exista un nexo, y ese nexo podría ser la leche. Así que mientras no sea esclarecida por completo esta teoría, se debe tener en cuenta que mientras existan potreros invadidos por Pa, este debe ser considerado como un posible agente etiológico del cáncer gástrico en humanos.

2.4. Signos clínicos

La característica principal que se presenta y que le da significado a la enfermedad es la hematuria, que es la presencia de sangre en orina, y tiene la particularidad de ser intermitente, en la primera etapa de la hematuria puede ser que ni siquiera sea percibida, se le conoce como microhematuria. Después con el paso del tiempo la orina se va tornando a un color más oscuro, hasta llegar a una macrohematuria, en donde se nota la presencia de

sangre total en el contenido urinario y en casos crónicos vendrá acompañada de coágulos, esto causará un cuadro obstructivo que provocará tenesmo y disuria, y en el peor de los casos uremia, lo cual llegaría a ser fatal. Estos cuadros clínicos no llegan a presentarse en todos los casos ya que la enfermedad se llega a presentar sin periodos de hematuria. Como respuesta secundaria del organismo afectado se muestran signos substanciales que son emaciación progresiva hasta llegar a la caquexia en muchos de los casos, debilidad general, mucosas pálidas, caídas en la producción láctea, y en estados crónicos los animales adoptan la posición de falsa xifosis e inevitablemente la muerte (Gonzales, 2003; Gonzalez, 2004; Marrero, 2000; Sánchez, 2003).

2.5. Lesiones

Lesiones macroscópicas: Para distinguir la HEB a simple vista, se pueden observar ciertos cambios patológicos encontrados principalmente en el tracto urinario bajo, los cuales se caracterizan por el engrosamiento de la vejiga urinaria, palidez de mucosas y serosas, la presencia de nódulos prominentes en la mucosa de la vejiga, estos estarán formados por una gran cantidad de vasos reticulares proliferando el subepitelio. Se encuentran lesiones verrucoides o papilomatosas, de color nacarado, además de focos rojizos con extravasación sanguínea que dan formación a macrohematuria, esta generalmente es causada por procesos tumorales que se ulceran y sangran profusamente hacia la luz del órgano. La gravedad de la pérdida de sangre, no es proporcional al tamaño o extensión de las lesiones de la vejiga, pues el animal puede sangrar hasta que ocurra su muerte, aunque sólo tenga lesiones pequeñas y focalizadas (Marrero *et al.*, 2000; Radostits *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004).

En los casos severos se encuentran múltiples proliferaciones sobre la mucosa en forma de coliflor y nódulos firmes con tendencia a caer, mostrando continuidad superficial, repliegues y focos de extravasación sanguínea. También, dentro de las lesiones macroscópicas se hallan nodulaciones de color verde-claro a verde-negruzco, de apariencia encapsulada, de consistencia sólida, pero blanda al corte, y se fijan a la mucosa de la vejiga por un pedicelo muy delgado, pero resistente al corte (González *et al.*, 2004).

Lesiones microscópicas: Las lesiones microscópicas observadas en la HEB son tan variadas que se pueden considerar patognomónicas ya que no existe otro cuadro clínico similar a esta enfermedad.

En estudios relacionados con química sanguínea, biometría hemática y examen general de orina en animales afectados por HEB muestran anemia microcítica al valorar hematocrito, hemoglobina, cuenta eritrocitaria total y volumen corpuscular medio, además de hipoproteinemia, hipoalbuminemia, aumento del BUN, hipocalcemia e hipofosfatemia. Al evaluar la orina de los animales afectados podremos encontrar proteinuria, hematuria, leucocituria, nitritos positivos, en el sedimento estarán presentes hematíes, leucocitos, bacterias y células transicionales, he aquí la explicación del deterioro clínico presentando en los casos de HEB (Sánchez-Villalobos *et al.*, 2004).

Existen anomalías que afectan el epitelio de la mucosa vesical, en animales con HEB como son nidos de Von Brunn's, que son grupos de células epiteliales de transición las cuales están agrupándose unas a otras en la lámina propia, con o sin conexión a la superficie del epitelio, además de estos nidos, se encuentra metaplasia escamosa, cistitis quística y polipoide (Pamucku, 1974).

La presencia de procesos neoplásicos en la HEB es altamente significativa para el diagnóstico de la enfermedad, en ella se encuentran neoplasias epiteliales como son los papilomas, carcinomas, carcinoma de células escamosas, adenoma y adenocarcinomas. Mientras que en los mesenquimales se encuentran los hemangiomas, hemangiosarcoma, mixosarcoma, y en casos menos frecuentes se llegan a presentar papilomas basoescamosos, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma, hemangiopericitosarcoma, carcinoma tubular, carcinoma escamoso y linfoma (Pamucku, 1974; González, 2004; Peixoto, 2003).

2.6. Diagnóstico

Existen diferentes maneras de diagnosticar HEB, entre las más utilizadas se encuentran las siguientes:

Cuadro Clínico. Se observa una baja condición corporal, baja coloración en las mucosas,

depresión de las constantes fisiológicas, hematuria, tenesmo, disuria o hasta anuria (Hopkins, 1986).

Histopatología. Como se menciona anteriormente las lesiones de la HEB son patognomónicas, por lo cual su diagnóstico definitivo se puede realizar mediante ésta técnica, complementados con estudios de histoquímica e inmunohistoquímica (González, 2004).

Examen de orina. La alteración de la orina se observa con un color rojizo-marrón hasta negruzca, de olor ofensivo, se deja reposar la orina para evidenciar la hematuria, después se analiza el sedimento, además de perfiles enzimáticos (Sánchez-Villalobos et al., 2004).

Análisis Sanguíneos. Se puede diagnosticar por la presencia de anemia microcítica, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, aumento del nitrógeno ureico sanguíneo, hipocalcemia e hipofosfatemia (Sánchez-Villalobos *et al.*, 2004).

III. Justificación

El presente trabajo se realizó con la finalidad de reportar la primer investigación de diagnóstico de la Hematuria Enzoótica Bovina, que se llevó a cabo en el norte del Estado de Durango, con el cual se inicia la primera fase para el control de esta enfermedad, en beneficio de todas las comunidades ganaderas afectadas.

Dada la relevancia de este trastorno en hatos de ganado bovino, principalmente de productores de carne, alrededor del mundo, es necesario que en México se tenga en cuenta el daño que le puede causar a los animales y las pérdidas económicas que representan para muchos productores que habitan en regiones donde se encuentra el helecho referido en los antecedentes. Por tal motivo, es necesaria la presentación de estudios que contribuyan a la definición y etiología de la enfermedad, así como la detección del helecho en las distintas regiones de nuestro país, promoviendo conocimiento de dicha planta a los ganaderos y los riesgos que representan.

Es deseable que a través de este estudio se generen manuales informativos para los ganaderos, y que éstos sean capaces de identificar los signos característicos de la enfermedad y que las autoridades correspondientes otorguen los apoyos necesarios para combatirla a través de la información y conocimiento del problema.

La Hematuria Enzoótica Bovina es una enfermedad crónica de creciente relevancia a nivel mundial, siendo considerada una de las toxicosis de mayor interés económico y de salud pública, motivo por el cual es suficiente para realizar este trabajo donde ya se indicaron las causas, detección y posibles acciones correctivas. La distribución del helecho en México es muy amplia, sin embargo, el efecto que produce es desconocido por muchos, por lo tanto es relevante presentar este reporte para informar la presencia de la enfermedad en el Estado de Durango.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo General

4.1.1. Reportar la presencia de Hematuria Enzootica Bovina por medio de estudios anatomopatológicos de vejiga urinaria de un bovino sacrificado en el rastro municipal de Guanaceví, Durango.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Identificar las lesiones en vejiga urinaria de un bovino sacrificados en el rastro municipal de Guanaceví, Durango, con signos clínicos de hematuria.

4.2.2. Realizar estudio histopatológico de las lesiones observadas en la vejiga urinaria para, utilizando la tinción de hematoxilina y eosina.

V. Material y métodos

5.1. Marco de Referencia

El municipio de Guanaceví se localiza al noroeste del estado de Durango, en las coordenadas 25° 56' 00" latitud norte y 106° 00' 00" de longitud oeste, a una altura de 2,300 msnm. Limita al norte con los municipios de Ocampo y San Bernardo; al oeste con el estado de Chihuahua; al este con el municipio de El Oro; y al sur con el municipio de Tepihuanes. Se divide en 147 localidades, de las cuales las más importantes son: San Pedro, San Marcos, El Zape, Quelites, Sembradillar, Guanaceví y la Rosilla.

5.2. Caso clínico

Se manifiesta que desde hace más de 15 años se han estado observando casos de orina roja con coágulos en ganado bovino en el Municipio de Guanaceví, en el Estado de Durango. Los animales presentan pérdida progresiva de peso, palidez de mucosas, orina roja, letargia y muerte lenta.

A partir de este antecedente se propuso investigar la causa de la enfermedad, se dio seguimiento a un bovino criollo hembra de seis años de edad que presentó mucosas pálidas, pérdida progresiva de peso y orina roja que al sedimentar el sobrenadante era de un color amarillo pajizo transparente y el precipitado estaba compuesto de sangre y coágulos.

5.3. Muestras

Se tomaron muestras y se fijaron en formol al 10% amortiguado con fosfatos a pH 7.4 durante 48 hrs. Se procesaron con la técnica de rutina de inclusión en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La interpretación fue visual utilizando un microscopio de luz visible y descriptiva.

VI. Resultados

6.1. Descripción macroscópica.

El animal se sacrificó en el rastro regional y se practicó la inspección *postmortem*, observándose palidez severa de mucosas y serosas. La única alteración morfológica se encontró en la vejiga urinaria, al corte ésta presentó engrosamiento severo y presencia de una masa tumoral multinodular de aproximadamente 7 cm de diámetro, color rojo oscuro, sólida pero consistencia suave, además de otras dos nodulaciones color rojo oscuro de 1 y 2 cm ligeramente elevadas. Las lesiones fueron de tipo polipoide caracterizadas por una masa pedunculada en forma de coliflor y apariencia blanquecina en su base y de color marrón en los extremos. Se encontró escasa orina roja con coágulos de sangre.

6.2. Descripción microscópica

Histológicamente se observó proliferación de una capa simple de células endoteliales bien diferenciadas formando capilares sanguíneos alineados con los espacios vasculares llenos de eritrocitos y escasos leucocitos y un estroma escaso de tejido conectivo laxo. El crecimiento se observó a partir de la submucosa con los márgenes bien demarcados pero no encapsulados. De acuerdo a las características morfológicas del tumor se diagnóstico hemangioma capilar.

VII. Discusión

La Hematuria Enzootica Bovina causa grandes pérdidas económicas en hatos de ganado bovino alrededor del mundo, incluyendo a México. En la Sierra de Durango es muy frecuente, sin embargo la confunden con enfermedades que causan hemoglobinuria como piroplasmosis, clostridiasis, leptospirosis o intoxicación por cobre.

La ganadería bovina de tipo extensiva es una de las principales actividades económicas del Municipio de Guanaceví, Durango. Sin embargo el desarrollo ganadero de esta región se encuentra limitado por ésta enfermedad que se caracteriza por hematuria. Esta enfermedad es un trastorno no infeccioso que afecta a los bovinos en pastoreo.

En este caso, durante el examen clínico del animal se pudieron notar las mucosas pálidas y la presencia de orina color rojizo, pero no se observó caquexia, como lo reporta Marrero (2000).

Junto con las lesiones encontradas en vejiga urinaria de tipo polipoide caracterizadas por una masa pedunculada en forma de coliflor, también se observaron áreas de hemorragias petequiales, equimóticas y sufusiones, además de presentar engrosamiento de la pared vesical con presencia de coágulos, similar a lo descrito por González (2004). El mismo autor menciona que los hemangiosarcomas y hemangiomas son los tumores más frecuentemente encontrados en casos de HEB, seguidos por los carcinomas.

Histológicamente se observó la proliferación de células alargadas con núcleos fusiformes pequeños con escaso citoplasma asemejando a la formación de capilares con abundantes glóbulos rojos característicos de hemangioma capilar similares a los nidos angioblásticos mencionados por González (2004) los cuales pueden ser fuentes de futuros procesos neoplásicos vasculares con una actividad celular endotelial exacerbada, estos vienen a ser indicadores de una alteración en los procesos celulares normales que podrían ser causados por alguna sustancia carcinogénica como el *ptaquelosido* del *Pteridium aquilinum* que actuaría deteniendo la apoptosis y lleva a la célula a elevar su metabolismo y proliferar indiscriminadamente (Sardon, D, 2005).

VIII. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el estudio realizado permiten concluir que la hematuria fue causada por las lesiones tumorales debido a la intoxicación con el Helecho Macho. Debido a las características preproductivas de la planta, ésta se ha extendido a los agostaderos detectados en este caso en el norte del Estado de Durango. Es muy importante, que las autoridades tomen conciencia de las pérdidas económicas que pueden producir y hacer un estudio a fondo para prevenir las implicaciones que a la salud humana puede acarrear.

Sirva este estudio como un aporte informativo en el cual puedan basarse para realizar una investigación más profunda y donde se utilice todos los recursos, humanos, tecnológicos y científicos necesarios para realizar un verdadero combate contra esta enfermedad.

IX. Literatura Citada

- 1. Alonso-Amelot M.E., Castillo U., Smith B. L. y Lauren D.R. (1997).** Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait*.78: 413-423.
- 2. Alonso-Amelot, M.E. (1999).** Helecho macho, salud animal y salud humana. *Rev Fac. Agron..* 16 (5): 528-541.
- 3. Alonso-Amelot, M.E; Castillo, U., Smith, B.L. y Lauren, D.R. (1996).** Bracken ptaquiloside in milk. *Nature*, 382.
- 4. Borzacchiello, G., Ambrosio, V., Galato, P., Poggiali, F., Venuti, A. y Roperto, F. (2001).** The pagetoid variant of urothelial carcinoma in situ of urinary bladder in a cow. *Vet Pathol.* 38(1):113-116.
- 5. Borzacchiello, G., Iovane, G., Marcante, M.L., Poggiali, F., Roperto, F., Roperto, S., Venuti, A. (2000).** Presence of bovine Papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J Gen Virol* 84:2921–2926,
- 6. Campo, M.S., Jarrett, W.F.H., Barron, R., O'Neil, B.W., Smith, K.T. (1992).** Association of bovine Papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res* 52:6898–6904
- 7. Campo, M.S. (1997).** Review bovine papillomavirus and cancer. *Vet J.* 154: 175-188.
- 8. Campo, M.S., McCaffery, R.E., Doherty, I., Kennedy, I.M. y Jarrett, W.F. (1990).** The Harvey ras 1 gene is activated in papillomavirus-associated carcinomas of the upper alimentary canal in cattle. *Oncogene.* 5: 303–308.

- 9. Campo, M.S. (2006).** Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In Campo, M.S. (Eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond, Chap 23. First published in Wymondham, England: Caister Academic Press.
- 10. Castillo, U.F., Ojiva, M., Alonso-Amelot, M.E. y Sakagami, Y. (1998).** Ptaquiloside Z, a new toxic unstable sesquiterpene glucoside from the neotropical bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Bioorg Med Chem.* 6(11):2229-2233.
- 11. Correa, P., Cuello, C., Haenzel, W. (1979)** Epidemiologic Pathology Precursor lesions and Pathogenesis of gastric carcinoma in Colombia. In C. J. Pfeiffer, Gastric Cancer Etiology en Pathogenesis G. Witzstrock Publishing House. New York; 112-127.
- 12. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L.A. (2004).** Virus Taxonomy, Academic Press, San Diego, 1162 pp.
- 13. Christian González, E., Alfonso Chavera, C., Rosa Perales, C., Néstor Falcón, P. y Roberto Evaristo, R. (2004).** Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de Oxapampa, Pasco. *Rev Inv Vet Perú.* 15(1): 25-36.
- 14. Hopkins, N.C. (1986).** Aetiology of enzootic haematuria. *Vet Rec.* 118(26):715-717.
- 15. Kushida, T., Uesugi, M., Sugiura, Y., Kigoshi, H., Tanaka, H., Ojika, M. y Yamada, M. (1994).** DNA damage by Ptaquiloside a potent bracken carcinogen: detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage products. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 479-486.
- 16. Martínez, M., (1979).** Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

17. Marrero, E., Bulnes, C., Sánchez, L.M., Palenzuela, I., Stuart, R., Jacobs, F. y Romero, J. (2001). *Pteridium aquilinum* (bracken fern) toxicity in cattle in the humid chaco of Tarija, Bolivia. *Vet Hum Toxicol.* 43(3):156-158.

18. Niwa, H., Ojiva, M, Wakamatsu, K., Yamada, K., Ohba, S., Saito, Y., Hirono, I. y Matsushita, K. (1983). Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var *latiusculum*. *Tetrahedron lett.* 24: 5371-5372.

19. Pamukcu, A.M.; Olson, C. y Price, J.M. (1966). Assay of fractions of Bovine urine for carcinogenic activity after feeding bracken fern (*Pteris aquilinum*). *Cancer Res.* 26(1):1745-1753.

20. Pamukcu, A.M., Goksoy, S.K. y Price, J.M. (1967). Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Reseach.* 27: 917-924.

21. Pamukcu, A.M., Olson, C. y Goksoy, S.K. (1967). Influence of a papilloma vaccine on chronic bovine enzootic hematuria. *Cancer Research.* 27: 2197-2200.

22. Pamukcu, A.M. (1974). Tumours of the urinary bladder. En: International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. Bull Wld Hlth Org. Vol. 50, Cap. 4. World Health Organization, Geneva (Switzerland).

23. Peña, R.F., Marin, S.A., Camacho, E.A, Avello, O.E., Arce, G.M. y Perez, G.C. (2005). Thuja (200 ch, 1000 ch) en el tratamiento de la papilomatosis bovina. Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET).

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605.html>.

24. Potter, D.M., Baird, M.S. (2000). Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. *Br J Cancer.* 83(7):914-920.

- 25. Peixoto, P.V., França, T.N., Barros, C.S. y Tokarnia, C.H. (2003).** Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 23(2):65-81.
- 26. Roperto, S., Ambrosio, V., Borzacchiello, G., Galati, P., Paciello, O., Russo, V. y Roperto, F. (2005).** Bovine Papillomavirus Type-2 (BPV-2) Infection and Expression of Uroplakin IIIb, a Novel Urothelial Cell Marker, in Urinary Bladder Tumors of Cows. *Vet Pathol.* 42:812–818.
- 27. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. y Hinchcliff, K.W. (2002).** Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9na Ed, p. 1534, 1971-1974. Editorial Mc Graw Hill – Interamericana. Madrid, España.
- 28. Sánchez, A.V., Villarroel, R.N., Pino, D.R., García, D.B., Molero, G.S. y Carrasco, D.D. (2003).** Evaluación Comparativa de Diferentes Métodos de Control de la Hematuria Enzoótica Bovina. *Rev Científica.* 13(1):33-37.
- 29. Sánchez, A.V., Arraga de Alvarado, C.M., García-Bracho, D., Pino-Ramírez, D., Villarroel-Neri, R. y Boscán-Ocando, J. (2004).** Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *Revista Científica.* 14(4): 317 – 323.
- 30. Sardon, D., De la Fuente, I., Calonge, E., Perz-Alenza, M.D., Castaño, M., Dunner, S. y Peña, L. (2005).** H-ras immunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. *J Comp Path.* 132: 195-201.
- 31. Shimkin, M.B. (1965).** Epidemiology of Cancer: Spatial-Temporal Aggregation. *Cancer Research.* 25: 1363-1374.

32. Villalobos, J. (1985). Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia de cáncer gástrico en costa rica. *Rev Cost Cienc Med.* 6(3):131-139.

33. Villalobos, J. (2000). Últimos descubrimientos sobre el efecto carcinogénico del helecho macho que comen nuestras vacas. *Ambientico.* 82: 26.