

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Efectos clínicos de la vacuna contra la enfermedad de
Newcastle en el control de la papilomatosis en hatos
bovinos de la Región San Martín**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Oswaldo Manuel Puri Capillo

Lima-Perú

2009



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

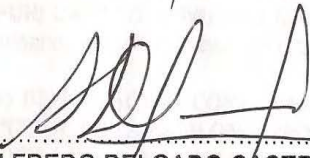
Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante
Resolución Directoral:

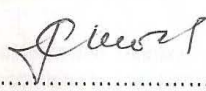
N° 148-EAPMV/FMV-2009.

PRESIDENTE :


HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO


MIEMBROS :


ALFREDO DELGADO CASTRO
Director de la Tesis


JOSÉ CAMACHO SALCEDO

San Borja, 06 de Agosto del 2009.

V° B°


Mv. LUIS TABACCHI NAVARRETE
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Jueves 06 de Agosto del 2009**, a las **14:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **148-EAPMV/FMV-2009**, integrado por los siguientes profesores:

HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO,	Presidente del Jurado
ALFREDO DELGADO CASTRO,	Director de la Tesis
JOSÉ CAMACHO SALCEDO,	Miembro del Jurado

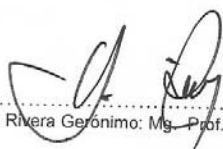
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **PURI CAPILLO. OSWALDO MANUEL**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

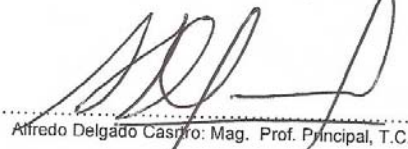
**“EFECTOS CLÍNICOS DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE
NEWCASTLE EN EL CONTROL DE LA PAPILOMATOSIS EN HATOS BOVINOS
DE LA REGIÓN SAN MARTÍN”**


Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Director de Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **15:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


.....
Hermelinda Rivera Gerónimo: Mg. Prof. Principal, D.E.


.....
Alfredo Delgado Castro: Mag. Prof. Principal, T.C.


.....
José Camacho Salcedo: MV. Prof. Asociado, T.C.



DEDICATORIA

A mi padre, Saturnino Puri Córdova y a mi madre, Ydelberta Elvira Capillo Castillo por todo su amor, comprensión y el inmenso esfuerzo que hicieron para que no me falte nada durante todo el tiempo que duró mis estudios universitarios. Una vez más me han dado la vida.

A Malena, por haber estado siempre a mi lado, brindándome su amor incondicional, apoyo y comprensión durante todo el tiempo que estuve estudiando.

A Fabricio, quien es el nuevo motorcito que impulsa mi vida, por que fuiste mi mejor asesor cuando me encontraba redactando mi tesis.

A mis hermanos: Raúl, Enrique, Wilfredo, Tito y Hugo por estar siempre presentes en cada momento importante de mi vida, celebrando mis triunfos ya que mis logros también es el de todos ustedes.

A mi tío Pelayo, en quien tuve un modelo a seguir. Y a mi tío Juan, quien es ejemplo de esfuerzo y superación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Violeta Elisa Díaz Romero por haberme brindado la oportunidad y haber confiado en mi persona para la realización de la presente investigación.

Al Proyecto Especial Alto Mayo (Gobierno Regional de San Martín), entidad que financió el presente estudio y de manera muy especial al Dr. Segundo Miguel Díaz La Torre por haberme proporcionado todas las facilidades del caso para la realización del trabajo de campo del presente estudio

A mi Director de Tesis, Dr. Alfredo Delgado Castro por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia profesional en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este estudio.

Al Dr. Néstor Gerardo Falcón Pérez quien ordenó mis ideas cuando estaban en un mar de confusión, me brindó su tiempo, comprensión y asesoría incansable durante todo el desarrollo del presente estudio.

Al Dr. Alberto Manchego Sayán por sus valiosas críticas al discutir los resultados de este estudio, la cual permitió concluir la presente investigación.

A los técnicos de la Granja Ganadera de Calzada: Fernando Uriarte, Roger Rojas, Buenaventura Torres, Asunciona Torres y a mis amigas y amigos de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán de Huanuco: Noemí, Verónica, Mayra, Raúl y Eder; quienes me ayudaron en el trabajo de campo de la presente investigación.

A todos los trabajadores de la Granja Ganadera de Calzada, y de manera muy especial a los señores: Alejandro, Leoncio y Sandro, quienes me brindaron su amistad durante el tiempo que duró mi estadía en el distrito de Calzada.

A mis amigos y amigas Miguel, Luyo, William, Eloy, Miguelon, Omar, Ángel, Hatzumi, Charlin, Paola, Gaby, Lupe, Milagros, Rosmeri; por su amistad sincera que va más allá de las aulas y de manera muy especial al Dr. Claudio Centeno Gabancho por su amistad desinteresada y enseñanzas.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Papilomatosis bovina.....	3
2. Propiedades generales de los papilomavirus.....	4
3. Taxonomía de los papilomavirus.....	4
4. Heterogeneidad de los BPVs.....	5
5. Genoma y organización genómica de los BPVs.....	6
6. Ciclo de vida del papilomavirus.....	6
7. Entrada viral y receptores.....	7
7.1. Unión a la superficie celular.....	7
7.2. Pasaje al citosol y núcleo.....	7
8. Transcripción y regulación de la transcripción de los BPVs	8
9. Replicación de los BPVs.....	10
10. Proteínas del BPV en papilomas y células transformadas.....	10
10.1. Proteína E5.....	11
10.2. Proteína E6.....	12
10.3. Proteína E7.....	12
11. Respuesta inmune contra el BPV.....	12
12. Estado latente del BPV.....	15
13. Vacunación terapéutica y profiláctica contra el BPV.....	16
14. Epidemiología.....	17
14.1. Presentación.....	17
14.2. Morbilidad.....	18
14.3. Origen y transmisión de la infección.....	18
14.4. Factores de riesgo.....	20
14.4.1. Manejo.....	20
14.4.2. Raza y Sexo.....	21
14.4.3. Edad.....	21

15.	Importancia económica.....	21
16.	Patogenia.....	22
17.	Patología.....	23
	17.1. Subgrupo A (BVP-1, BVP-2 y BVP-5).....	24
	17.2. Subgrupo B (BVP-3, BVP-4 y BVP-6).....	24
18.	Signos clínicos.....	25
	18.1. Número, tamaño y forma de los papilomas.....	26
	18.1.1. Forma pedunculada.....	27
	18.1.2. Forma plana.....	27
	18.2. Procesos clínicos asociados a los diferentes tipos de BPVs.....	27
	18.2.1. BPV-1.....	27
	18.2.2. BPV-2.....	28
	18.2.3. BPV-3.....	28
	18.2.4. BPV-4.....	29
	18.2.5. BPV-5.....	30
	18.2.6. BPV-6.....	30
19.	BPV y cáncer.....	31
	19.1. BPV-4 y el cáncer del tracto gastrointestinal superior.....	32
	19.2. BPV-1, BPV-2 y el cáncer de la vejiga urinaria.....	32
20.	Diagnóstico.....	33
21.	Pronóstico.....	34
22.	Tratamiento.....	34
	22.1. Remoción quirúrgica y cauterización.....	36
	22.2. Autohemoterapia.....	37
	22.3. Clorobutanol.....	37
	22.4. Vacunas autógenas y no autógenas.....	37
	22.5. Ungüento.....	38
	22.6. Vacuna atenuada del virus de la enfermedad de Newcastle.....	39
23.	Medidas preventivas.....	40
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
	1. Lugar de estudio.....	41
	2. Tamaño de la muestra.....	41
	3. Animales.....	42
	4. Materiales.....	42
	5. Diseño experimental y protocolo de inoculación.....	43
	6. Observaciones clínicas.....	43

7. Análisis de datos.....	44
IV. RESULTADOS.....	45
V. DISCUSIÓN.....	48
VI. CONCLUSION.....	51
VII. RECOMENDACIONES.....	52
VIII. LITERATURA CITADA.....	53

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1.....	46
CUADRO 2.....	46
CUADRO 3.....	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	9
FIGURA 2.....	20
FIGURA 3.....	23
FIGURA 4.....	26
FIGURA 5.....	47
FIGURA 6.....	47
FIGURA 7.....	47

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la eficacia de la vacuna atenuada del virus de la enfermedad de Newcastle cepa La Sota (NDV-LS) en el tratamiento de la Papilomatosis bovina, en 34 bovinos hembras mestizas productoras de leche con papilomatosis cutánea diagnosticada clínicamente criadas de forma semi-extensiva en fundos de la zona del Alto Mayo (Región San Martín). Los animales fueron inoculados subcutáneamente con un volumen de 2ml. de la vacuna atenuada del NDV-LS (10^9 dosis₅₀ infectiva en huevo) dos veces con un intervalo de una semana y evaluados clínicamente los días 0, 7, 30, 45 y 60 después de la primera inoculación. Un total de 30 animales sirvieron como controles. Se registró los detalles clínicos de los papilomas como: número, forma e imagen fotográfica. No se observó ningún signo clínico colateral en los animales tratados durante el tiempo que duró el estudio. La evaluación clínica al día 60 mostró que el tratamiento fue eficaz en 3 (8.8%) animales, éste resultado al ser enfrentado con el grupo control, mediante la prueba de Chi-cuadrado, no mostró diferencia estadística significativa. Se concluyó que la vacuna atenuada del virus de la enfermedad de Newcastle cepa La Sota, no fue eficaz en el tratamiento y control de la papilomatosis bovina en condiciones de crianza semi-extensiva de la zona del Alto Mayo.

Palabras clave: papilomatosis bovina, hembras mestizas, virus de la enfermedad de Newcastle

ABSTRACT

Effectiveness of Newcastle disease virus-La Sota strain (NDV-LS) attenuated vaccine as treatment for bovine Papillomatosis was evaluated in this study. 34 crossbreed dairy cattle with cutaneous papillomatosis clinically diagnosed and semi-extensively managed in farms of Alto Mayo (San Martín Region) were studied. Animals were subcutaneously inoculated with 2ml of NDV-LS attenuated vaccine (10^9 egg infective dose₅₀) on day 0 and day 7 and were clinically evaluated days 0, 7, 30, 45, 60. 30 animals were employed as controls. Papillomas clinical details were recorded: number, shape and picture. No secondary signs were observed in treated animals during the study. Clinical evaluation at day 60 showed that treatment was effective in 3 (8.8%) animals. Chi-square test showed that there wasn't statistically significant difference between control and treated group. In conclusion, the Newcastle disease virus-La Sota strain attenuated vaccine was not effective in treatment and control of bovine papillomatosis in semi-extensively managed animals from Alto Mayo zone.

Key words: bovine papillomatosis, crossbreed dairy cattle, Newcastle Disease Virus

I. INTRODUCCIÓN

La papilomatosis es una enfermedad infectocontagiosa, que afecta a muchas especies de aves y mamíferos, causando muchas veces daños considerables, principalmente en aquellos animales de importancia económica (Melo y Leite, 2003). La papilomatosis bovina es una enfermedad tumoral benigna, causada por un virus de naturaleza fibroepitelial, caracterizada por alteraciones de piel y mucosas. Este virus infecta las células basales del epitelio, formando proyecciones digitiformes macroscópicas o microscópicas. Las pérdidas económicas que la papilomatosis bovina acarrea son: ceguera, desarrollo retardado, problema de fertilidad, desvalorización del cuero del animal y, consecuentemente, la disminución de la productividad y su valor de venta. Los papilomas en los pezones dificultan el ordeño y pueden determinar cuadros de mastitis (da Silva *et al.*, 2004).

La papilomatosis bovina es una de las enfermedades de más alta incidencia en el trópico en general y en el Perú en particular (A. Delgado, Lima, comunicación personal). Observaciones de campo demuestran que esta enfermedad se encuentra desde hace muchos años en el valle del Alto Mayo (Región San Martín), presentando una alta prevalencia la cual se incrementa cada año; ataca de preferencia al ganado lechero y son más susceptibles la raza Holstein y sus cruces (el ganado tipo lechero en el valle del Alto Mayo es el Girolando, Holstein x Gir). Además, se observa que cuando el ganado tiene mayor sangre de Holstein el problema es mayor. (E. Palacios, Moyabamba, comunicación personal).

A pesar de la existencia en el mercado de innumerables tratamientos a disposición, la gran mayoría se evalúa insatisfactoriamente cuando es probada en el campo (da Silva *et al.*, 2004). En el valle del Alto Mayo se han probado diversos protocolos para el tratamiento de la papilomatosis bovina tales como: autohemoterapia, autovacuna, el fármaco clorobutanol, yodo, formalina, ácido acético, ácido salicílico al 10 %, ácido sulfúrico, lejía, jabón de ropa, kerosén,

cloranfenicol, extirpación de verrugas, quemaduras con fuego, clorhidrato de levamisol, diaminazene, diaceturato etc, todas con resultados discutibles y no eficaces (E. Palacios, Moyobamba, comunicación personal), que no llegan a los niveles alcanzados en las explotaciones intensivas en las diferentes cuencas lecheras del litoral Peruano (A. Delgado, Lima, comunicación personal).

Esta falta de efectividad de los tratamientos convencionales, lleva al productor a descartar precozmente animales de alto valor zootécnico, justificando plenamente la búsqueda de nuevos protocolos de tratamiento (da Silva *et al.*, 2004). En ese sentido, Avki *et al.* (2004), evaluaron la efectividad de la vacuna atenuada del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) cepa La Sota (NDV-LS) en el tratamiento de la papilomatosis cutánea bovina; las observaciones clínicas al día 60 post-inoculación mostraron una regresión completa y parcial de papilomas de 36% y 57% respectivamente. Además, muchos estudios en la literatura médica han demostrado la actividad antineoplásicas del NDV primero en modelos animales (Shirmacher *et al.*, 2001; Schirmacher *et al.*, 2000; Reichard *et al.*, 1992) y luego en pacientes humanos (Liang *et al.*, 2003; Csatory *et al.*, 1999; Csatory y Bak'acs, 1999).

En virtud de los resultados obtenidos por Avki *et al.*, (2004) y la falta de efectividad de los protocolos convencionales en el tratamiento de la papilomatosis bovina, el objetivo del presente estudio fue de comprobar la efectividad de la vacuna atenuada del NDV-LS en el tratamiento de la papilomatosis bovina, en vacunos lecheros de crianza semi-extensiva en fundos de la Región San Martín, ámbito del Proyecto Especial Alto Mayo.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Papilomatosis bovina

Los papilomas cutáneos son neoplasmas epiteliales proliferativas benignas (Jubb *et al.*, 1992), que pueden ser únicos (papiloma) o múltiples (papilomatosis) (Potel, 1974). El término papiloma deriva del latín *papila* que significa pústulas y del sufijo – *oma* que significa tumor benigno (Wittmann, 1999). Los papilomas se han descrito en la especie humana desde tiempos inmemorables y desde hace siglos en los animales; en los équidos fueron descritos en el siglo IX por el jefe de las caballerizas del Califa de Bagdad (Fenner *et al.*, 1987).

La etiología vírica de estas proliferaciones epiteliales llamadas papilomas o verrugas se estableció en 1907 (Vadillo *et al.*, 2002, Fenner *et al.*, 1987). En 1961, fue obtenida la identificación serológica del virus y en 1963, fue posible la observación de la estructura viral al microscopio electrónico (Wittmann, 1999) pero hasta 1978 no se reconocieron como diferentes entre sí los papilomavirus de las distintas especies animales. También fue reconocida muy tempranamente la posibilidad de evolución maligna de algunos papilomas benignos, y por ende la capacidad oncógena de los agentes causales correspondientes (Vadillo *et al.*, 2002).

Los papilomas son descritos en los seres humanos y en varias otras especies animales como: bovino, equino, caprino, ovino, canino, felinos, suinos, conejo (Wittmann, 1999). También han sido descritos en elefantes (Sironi *et al.*, 1990), alces, primates no humanos, hámster, algunas especies de aves, tales como el papagayo (Marins, 2004), bisonte Europeo (*Bison bonasus*) (Litterick *et al.*, 2006), y mamíferos marinos (Bossart *et al.*, 2002).

Los virus del papiloma bovino son atípicos, debido a que inducen la proliferación del mesodermo así como de la epidermis (Jubb *et al.*, 1992). Los papilomavirus son estrictamente

especie-específico e, incluso en condiciones experimentales, no infectan otro hospedero que su hospedero natural. El único caso conocido de infección no específica de especie es la infección de caballos y otros équidos por papilomavirus bovino (BPV) tipo 1 (BPV-1) y más raramente BPV-2 (Nasir y Campo, 2008).

2. Propiedades generales de los papilomavirus

Independientemente del sitio o tipo de lesión, el virión del BPV tiene una morfología y estructura constante. Como otros viriones de papilomavirus, el virión del BPV tiene una estructura icosaédrica no envuelta de 55-60 nm. de diámetro, el cual forma filas paracristalinas en el núcleo de las células infectadas (Campo, 2006). La cápside se compone de 72 capsómeros prismoides pentagonales huecos, 60 en agrupación hexamérica y 12 en agrupación pentamérica (Vadillo *et al.*, 2002). El virión está constituido por la proteína mayor L1 y la proteína menor de la cápside L2. El detalle estructural del virión del BPV ha sido recientemente determinado y un modelo atómico ha sido generado, mostrando que el C-terminal de L1 y el N-terminal de L2 son expresados en la superficie del virión y probablemente tenga un rol en la infección y en la inmunogenicidad (Day *et al.*, 2006; Modis *et al.*, 2002).

El virus se conserva activo por 90 días a 4° C y por 180 días a la temperatura de -70° C. También permanece activo por largo tiempo, cuando es mantenido en glicerina al 50% o liofilizado. Es inactivado en 30 minutos a 60° C y por formalina al 10% (Mayr y Guerreiro, 1988). Los virus son resistentes a solventes lipídicos, éter, grandes oscilaciones de pH (3,0 - 7,5) y en temperaturas alrededor de 50° C (Murphy *et al.*, 1999).

3. Taxonomía de los papilomavirus

Los papilomavirus (PVs) fueron originalmente agrupados junto con los poliomavirus en la familia *Papovaviridae* basado en su pequeño tamaño, cápside sin envoltura y genoma ADN circular de doble cadena. Sin embargo, luego se reconoció que los dos grupos de virus poseen genoma de diferente tamaño, organización genómica completamente diferente y ninguna similitud de importancia en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos. En tal sentido, según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (Internacional Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV), el virus de la papilomatosis bovina está clasificado actualmente en la familia *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004)

Recientemente los papilomavirus han sido re-clasificados. Según esta nueva nomenclatura las principales ramas del árbol filogenético son considerados géneros, que se identifican por letras griegas. Las ramas inferiores se consideran especies y unen tipos que son genómicamente distintos pero no exhiben diferencias biológicas conocidas. Este nuevo sistema taxonómico no afecta a la tradicional identificación y caracterización de "tipos" y muestra con diferencias genómicas pequeñas, conocidas como "subtipos" y "variantes", todos los cuales son taxones por debajo del nivel de "especie" (de Villiers *et al.*, 2004).

4. Heterogeneidad de los BPVs

Los BPVs son un grupo heterogéneo de virus que están distribuidos mundialmente. Seis miembros (BPV 1-6) han sido descritos en detalle (IARC, 2007) pero actualmente se han caracterizado diez BPVs (BPV 1-10) (Campo *et al.*, 1981; Jarret *et al.*, 1984; Tomita *et al.*, 2007; Hatama *et al.*, 2008; Owaga *et al.*, 2007), los cuales están agrupados en cuatro géneros en base a su biología y homología genómica (de Villiers *et al.*, 2004).

Los seis tipos de BPVs (BPV1-6) fueron originalmente clasificados en dos subgrupos (Subgrupo A y Subgrupo B), en base a criterios moleculares, inmunológicos, histológicos y patológicos (Campo *et al.*, 1995). El subgrupo A comprende: BPV-1, BPV-2 y BPV-5. Estos BPVs son comúnmente definidos como fibropapilomavirus, que son los virus que infectan el epitelio y la dermis subyacente dando lugar a los fibropapilomas. El subgrupo B comprende: BPV-3, BPV-4 y BPV-6, éstos BPVs son puramente epiteliotrópicos, los cuales infectan solamente el epitelio e inducen los verdaderos papilomas (Campo, 2006).

De acuerdo con la nueva nomenclatura, los epiteliotrópicos BPV-3, BPV-4 y BPV-6 son definidos como Xi-papilomavirus (ξ papilomavirus) y los BPV-1 y BPV-2 como Delta-papillomavirus (δ papilomavirus). El genoma del BPV-5 parece compartir homología con Xi-PVs y Delta-PVs e interesantemente parece tener una patología dual causando fibropapilomas y papilomas epiteliales. Estas dos observaciones han dejado a la reclasificación de BPV-5 como miembro del género Epsilon-papilomavirus (ϵ papilomavirus) (de Villiers *et al.*, 2004).

En base a análisis genético y filogenéticos, se ha propuesto que BPV-8 y BPV-9, BPV-10 pertenezcan al género ϵ de los papilomavirus (Tomita *et al.*, 2007) y ξ de los papilomavirus (Hatama *et al.*, 2008) respectivamente. Del mismo modo, se ha propuesto que BPV-7 esté asignado a un nuevo género (Ogawa *et al.*, 2007). Además nuevos BPVs han sido reportados (Ogawa *et al.*, 2004), los cuáles esperan ser caracterizados (Nasier *et al.*, 2008).

5. Genoma y organización genómica de los BPVs

La nucleocápside contiene una sola molécula de ADN bicatenario superenrollado y cerrado en círculo por enlaces covalentes, con histonas celulares asociadas (Campo, 2006; Vadillo *et al.*, 2002). El genoma de BPV-1, BPV-2 y BPV-5 tiene aproximadamente 8000 nucleótidos (nt), pero en BPV-3, BPV-4 y BPV-6 solamente hay 7300 nt aproximadamente. El genoma está dividido en 3 regiones canónicas: una región no codificadora de control (LCR, conteniendo los elementos cis-regulatorios necesarios para la replicación y transcripción del ADN viral), la región conteniendo los genes tempranos (que codifican proteínas no estructurales E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8) y la región conteniendo los genes tardíos, que codifican las proteínas de la cápside L1 y L2 (Campo, 2006).

El esquema genómico de BPV-1, BPV-2 y BPV-5 es similar a la mayoría de los papilomavirus, pero el de BPV-3, BPV-4 y BPV-6 carecen del gen E6, el cual ha sido reemplazado por el gen E5. Otra diferencia entre BPV-1, BPV-2, BPV-5 y BPV-3, BPV-4, BPV-6 es la organización del LCR. El LCR del grupo viral anterior contiene 12 sitios de unión a E2, y el LCR del último grupo contiene solamente cuatro lugares de unión a E2 (Campo, 2006).

6. Ciclo de vida del papilomavirus

El ciclo de vida del PV está relacionado estrictamente a las etapas de diferenciación de las células epiteliales del hospedero, con la totalidad del ciclo restringida al epitelio (O'Brien y Campo, 2002). Los acontecimientos claves del ciclo vital de los PVs parece ser regulados semejantemente en hospederos humano y no humano (Peh *et al.*, 2002). Las células basales epiteliales son los blancos iniciales de infección, que son expuestos como resultado de microlesiones del epitelio estratificado (Howley y Lowy, 2001).

La unión de los viriones con las células es mediada por el proteoglicano heparán sulfato de la superficie celular (Streeck *et al.*, 2007). Siguiendo con la unión y entrada del virus; los viriones migran a los núcleos y establecen sus genomas como multicopias de plásmidos extracromosomales, que son mantenidos en aproximadamente 20 a 100 copias por célula basal infectada (Lee y Laimins, 2007). La expresión de los genes virales tempranos es activada en los estratos basal y suprabasal del epitelio (O'Brien y Campo, 2002). Mientras las células se diferencian, el genoma viral es mantenido como un plásmido estable (Howley y Lowy, 2001).

Los queratinocitos no infectados salen del ciclo celular después de dejar el estrato basal, y los núcleos son degradados en muchas de esas células diferenciadas. En contraste, Las células infectadas con PVs sufren una diferenciación pero permanecen activas en el ciclo celular (Lee y Laimins, 2007). Los productos génicos tempranos E5, E6 y E7 son los responsables de la inducción de la proliferación celular (O'Brien y Campo, 2002). Esto permite que las células suprabasales altamente diferenciadas vuelvan a entrar a la fase S del ciclo celular y soporten altos niveles de replicación productiva del ADN viral (Lee y Laimins, 2007). La E2 del BPV media la asociación de los genomas virales con los cromosomas mitóticos resultando en una distribución eficiente de los genomas del BPV en las células hijas (Campo, 2006).

La expresión de E4 y la replicación del ADN viral ocurre en el estrato espinoso y granular (O'Brien y Campo, 2002). La replicación del genoma viral ocurre en la fase S del ciclo celular a través de la acción de las proteínas virales E1 y E2 en cooperación con las proteínas de replicación celular y en sincronización con los cromosomas de la célula del hospedero (Lee y Laimins, 2007). Mientras las células se diferencian, el programa de expresión génica tardía es activado y las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2 son expresadas en el estrato granular (O'Brien y Campo, 2002). Durante la morfogénesis del virión la L2 se liga al DNA favoreciendo su encapsidación (Lee y Laimins, 2007). Finalmente los viriones son ensamblados en el estrato escamoso y liberados con las escamas de queratina. (O'Brien y Campo, 2002).

7. Entrada Viral y Receptores

7.1 Unión a la superficie celular

En base a los últimos avances en el desarrollo sistemas de generación de (seudo) virion, el mecanismo más probable de entrada viral es el siguiente: los proteoglicanos heparán sulfato de la superficie celular con modificaciones específicas en los grupos amino 2-hidroxil y 6-hidroxil, median la unión de los viriones con las células. Esta unión es solamente dependiente de la conformación correcta de la proteína L1 y no requiere de la proteína L2. El retraso en la internalización es acompañada por cambios en el modo de unión y posiblemente la transferencia a un receptor secundario (Streeck *et al.*, 2007).

7.2 Pasaje al citosol y núcleo

Los virus aprovechan las estructuras y mecanismos celulares normales para la internalización de sustancias. Los viriones son internalizados vía un camino endocítico clatrin-

dependiente, la cual inicialmente es dependiente de actina para la formación de vesículas, pero después requiere de microtúbulos para el transporte vesicular. Una característica peculiar de la infección por papilomavirus es que ocurre una lenta internalización. Viriones de BPV-1, pudieron ser identificados en la superficie celular después de 8 horas, y la internalización completa puede tomar hasta 48 horas (Streeck *et al.*, 2007).

La reducción de los enlaces disulfuros intercapsoméricos y la acidificación de los endosomas probablemente desencadenen el desnudamiento del genoma viral. La proteína L2 es la más probable en mediar el escape endosomal del genoma viral. Se ha propuesto que el desensamblaje de las partículas virales es antes de la translocación nuclear, ya que las cápsides de los papilomavirus son demasiado grandes para pasar por los poros nucleares. La proteína L2 media la unión del genoma viral a los microtúbulos, facilitando de este modo el transporte intracitoplasmático y tal vez es la chaperona del genoma viral para que éste entre al núcleo (Streeck *et al.*, 2007). Una vez en el núcleo el genoma viral no se integra al ADN celular y permanece como episómico (Vadillo *et al.*, 2002).

8. Transcripción y regulación de la transcripción de los BPVs

Todo los marcos de lectura abierta (ORF) está situado en una sola cadena, indicando que la transcripción ocurre solamente en una cadena. La transcripción es regulada por el estado de diferenciación de la célula infectada y es complejo, debido a la presencia de promotores múltiples, patrones de empalme alternos y múltiples, y producción diferenciada de mRNA en diversas células (Howley y Lowy, 2001).

La LCR contiene los elementos cis-regulatorios necesarios para la replicación y transcripción del ADN viral (Campo, 2006). Análisis secuenciales de la LCR del BPV-4 revelaron un número de potenciales sitios de unión para factores de transcripción, incluyendo el transactivador/represor E2 codificado viralmente. Existen cuatro sitios de unión para E2 (Fig. 1) en la LCR con un arreglo muy similar a aquel de la LCR de los HPVs (Papilomavirus humano) genitales (Campo, 1997).

El análisis mutacional de los sitios E2 individuales ha demostrado que la unión de E2 a los sitios uno y tres ocasiona la activación transcripcional, mientras que la unión de E2 a los sitios dos y cuatro conlleva a la represión de la transcripción. Los sitios E2 están unidos no sólo por la proteína viral E2 si no también por factores de transcripción celular. De estos el mejor caracterizado es PEBP2, el cual se une al sitio dos en la región CE3 (Fig. 1) y activa la

transcripción. Así, la E2 viral y el PEB2 celular compiten por el mismo sitio y el resultado de esta competición determina si la transcripción de genes virales es regulada positivamente o negativamente (Campo, 1997). Esta situación recuerda a la observada con la LCR del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16), el virus involucrado en el cáncer cervical. En este caso, dos factores de transcripción celular, PEF-1 y Oct-1, compiten por unirse a un sitio en el potenciador transcripcional y la transcripción es regulada positivamente o negativamente dependiendo de si PEF-1 u OCT-1 se une al sitio cognado. El PEF-1 bovino también se une al LCR del BPV-4 en CE2, una región que ha sido demostrada en incrementar la transcripción viral (Fig. 1).

El elemento *cis* negativo NR2, adyacente a CE2, está unido por otro factor celular, identificado como C/EBP (Fig. 1). Se ha demostrado que C/EBP posee tanto actividad represora como transactivadora y en el contexto de la LCR del BPV-4, su actividad dominante es la regulación negativa de la transcripción (Campo, 1997).

La regulación de la transcripción génica viral parece, por lo tanto, ser un circuito muy afinado donde los elementos controladores virales y celulares, positivos y negativos contribuyen a la expresión regulada temporal y espacial de los genes virales. Si este delicado balance es subvertido, el resultado frecuentemente es la transformación celular hacia el estado neoplásico (Campo, 1997).

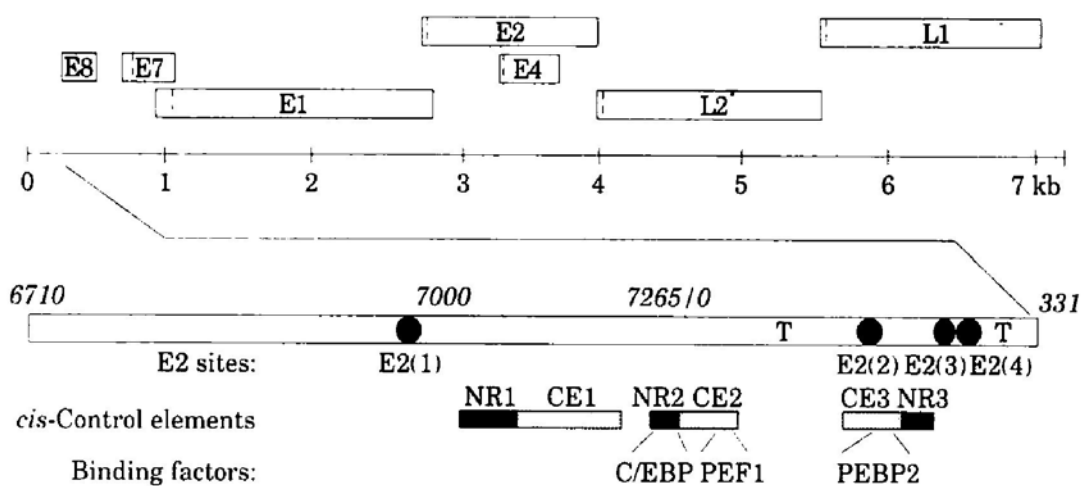


Fig. 1. Organización genómica de BPV-4. Los cuadrantes representan los genes tempranos (E) y tardíos (L) con el codón ATG indicado por una línea vertical. T es la caja TATA de los promotores virales, E2 (1-4) son los sitios de unión para la proteína viral E2; NR1-3 son elementos reguladores negativos y CE1-3 son elementos reguladores positivos; C/EBP, PEF1 y PEBP2 son factores de transcripción celular que interactúan con la LCR viral (Tomado de Campo, 1997).

9. Replicación de los BPVs

La replicación de los papilomavirus está estrechamente acoplada con el crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales, desde su origen en las capas basales hasta su descamación en la epidermis o en las mucosas (Vadillo *et al.*, 2002). La replicación del DNA viral es dependiente de 2 polipéptidos virales (E1, E2), y de la presencia de la secuencia de inicio de la replicación viral. Esos tres componentes son necesarios y suficientes para la replicación del ADN viral en células de mamíferos. El origen de la replicación está formado por una secuencia (60-80 bp) localizada entre la LCR y los marcos de lectura abierta tempranos. La secuencia es modestamente conservada, sin embargo la LCR conserva elementos de regulación. Estos caracteres son sitios de unión para la proteína E2 y para la proteína E1 (Stenlund, 2007).

La replicación de BPV se basa en una interacción física entre el dominio helicasa de E1 y el dominio activador de E2 cuando las proteínas están sujetas al Ori. La unión de la proteína E1 y E2 a sus respectivas secuencias de reconocimiento en la LCR es requerida para el reclutamiento de la ADN polimerasa y otras proteínas de replicación del ADN celular al origen de la replicación del ADN viral. La proteína E1 tiene actividad ATPasa y helicasa, que es necesario para el desenrollamiento de la superenrollada ADN viral, permitiendo de esta manera una eficiente replicación viral (Stenlund, 2007).

La afinidad de unión del monómero formado por la proteína E1 con su secuencia de reconocimiento es muy débil. Sin embargo la interacción de E2 con E1, aumenta la afinidad de E1 por su secuencia de reconocimiento al ADN y también aumenta su actividad helicasa (Stenlund, 2007). La replicación del ADN viral empieza con un complejo de inicio que se fija en un solo punto del círculo y abre las cadenas parentales, sintetizándose las complementarias en direcciones opuestas hasta volver al punto inicial, donde se unen entre sí separándose del genoma parental (Vadillo *et al.*, 2002).

10. Proteínas del BPV en papilomas y células transformadas

Los Delta-BPV codifican tres oncoproteínas, E5, E6 y E7, mientras que los Xi-BPV no poseen el gen E6 y sólo codifican E5 y E7. La importancia relativa de cada proteína en la transformación celular varía entre los diferentes BPV. La E5 es la principal oncoproteína del BPV-1, seguido de la E6, con un rol más modesto de la E7. Las proteínas de transformación del BPV-4 son la E5 y E7, siendo la E5 la que promueve la adquisición del crecimiento

independiente de anclaje y la E7 la que induce la ventaja de crecimiento y el lapso de vida extendido (Campo, 2006).

10.1 Proteína E5

Las proteínas E5 del BPV-1 y BPV-4 probablemente sean las oncoproteínas mejor estudiadas de estos virus. Ambas proteínas E5 se localizan en los compartimientos de endomembranas celulares, particularmente del aparato de golgi, y ambas se unen a la 16k ductina/subunidad C de la H⁺ ATPasa. Esta interacción ocasiona la inhibición de la comunicación intercelular por las uniones estrechas y en la falta de acidificación de los endosomas y del aparato de golgi. (Campo, 2006).

Las uniones estrechas son canales para mensajeros secundarios de bajo peso molecular, importantes en el control de la homeostasis de un tejido; si una célula transformada es liberada del control de las células normales circundantes, puede proliferar libremente y ocasionar una clona transformada expansiva. Por consiguiente, la falta de comunicación por las uniones estrechas en células transformadas por papilomavirus probablemente sea un evento temprano de la transformación y, al aislar a las células recientemente infectadas de sus hermanas normales del alrededor, permite que se establezcan otros eventos de transformación (Campo, 2006).

La inhibición de la acidificación de los endosomas y del aparato de golgi conlleva a la alteración del procesamiento y arreglo proteico, lo que ocasiona la retención y reciclamiento de receptores de factores de crecimiento activados desde los compartimientos endosomales. Adicionalmente, la E5 de BPV-1 interactúa directamente con y activa al receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Por lo tanto, la respuesta mitogénica está potenciada, directamente, por la E5 que interactúa con el receptor de PDGF, e indirectamente, por la E5 que interactúa con la proteína 16k, y al hacerlo inhibe la regulación negativa del receptor (Campo, 2006).

Además, la E5 activa varias proteínas cinasas involucradas en el control del ciclo celular, causando así una desregulación general del programa normal muy controlado de proliferación celular. Por ejemplo, la activación del complejo G1-S ciclina A-CDK2 es la base de la habilidad de la E5 del BPV-4 para inducir el crecimiento independiente de anclaje tanto en células murinas establecidas como en células primarias bovinas PalF (O'Brien *et al.*, 1999).

10.2 Proteína E6

La E6 del BPV-1 es por sí sola un activador transcripcional; inhibe la función de p53 logrando así la inactivación de las funciones apoptóticas y del arresto del ciclo celular por la p53. La E6 se une a la proteína de adhesión focal paxilina y bloquea la interacción entre la paxilina y otras proteínas de adhesión focal, incluyendo la vinculina y las cinasas de adhesión focal. Así, la alteración de las adhesiones focales probablemente sea la base del crecimiento independiente de anclaje observado y de la alteración del citoesqueleto de actina inducido por la E6 (Campo, 2006).

Los Xi-BPV son únicos entre los papilomavirus en que no poseen un ORF E6. Así, para estos virus no se requiere de la proteína E6 para que tenga un ciclo infeccioso exitoso, o para que el papiloma progrese a carcinoma en el caso del BPV-4. Esto conlleva a la pregunta de si las funciones de E6 no son requeridas por el BPV-4, o si estas funciones son proporcionadas por otra proteína viral o del hospedero. Por lo tanto, en ausencia de las funciones tipo E6, la actividad controladora del p53 debe ser ya sea pasada por alto o abolida por cofactores durante el desarrollo del papiloma y el progreso de la neoplasia a carcinoma. Esto es confirmado por la observación de que el gen p53 está mutado en al menos algunos papiloma y carcinomas (Campo, 2006).

10.3 Proteína E7

La proteína E7 de BPV-1 coopera con la proteína E5 así como también con E6 en la transformación celular. La proteína E7 interactúa con, e inhibe, la proteína supresora tumoral pRb (proteína del retinoblastoma) mediante su unión al dominio L-X-C-X-E. Este dominio es compartido por todas las proteínas E7 con excepción de las proteínas E7 de los fibropapilomavirus artiodáctilos. Se ha sugerido que la ausencia del dominio de unión al pRb contribuye a la característica patología de estos virus, esto es, la inducción de fibropapilomas. Será particularmente interesante comprender como la E7 de los fibropapilomavirus contribuye a la transformación celular y a que proteínas celulares se une (Campo, 2006).

11. Respuesta inmune contra el BPV

La respuesta inmune del ganado bovino hacia el BPV es sorprendentemente pobre (Campo, 1998). Los animales pueden tener tumores enormes, produciendo activamente virus en grandes cantidades, pero los bovinos no responden fácilmente a los antígenos del BPV durante

el curso de la infección y los anticuerpos anti-BPV raramente son detectados. Este es el caso de todos los tipos de BPV investigados, excluyendo ya sea el tipo viral o el sitio de infección de la pobre respuesta humoral (O'Brien y Campo, 2002). En algunos animales se pueden observar débiles respuestas celulares T y B hacia las proteínas de la cápside o hacia la proteína transformante E7 durante las etapas tardías de la infección y parecen estar asociadas con el rechazo del papiloma (Campo, 1998). La pobre respuesta inmune hacia el BPV probablemente sea la principal razón para la persistencia de la infección, incluso en hospederos inmunocompetentes, los papilomas persisten durante muchos meses antes de que se produzca la regresión (Campo, 2006).

Durante el rechazo de los papilomas BPV-4, se acumulan grandes masas de linfocitos activados en la dermis debajo del papiloma. En estos conglomerados los linfocitos CD4+ son el subtipo predominante, seguido por linfocitos CD8+ y células T $\gamma\delta$. En contraste, los linfocitos CD8+ y $\gamma\delta$ predominan en la capa basal y entre los queratinocitos (Campo, 1998). La contribución de los subtipos de linfocitos individuales para la regresión del papiloma no se ha establecido pero se ha reportado una distribución diferencial similar de linfocitos CD4+ y CD8+ en verrugas genitales en regresión de humanos y papilomas en regresión de conejos. Todas las similitudes topológicas y temporales entre las lesiones en regresión en los diferentes sistemas de papilomavirus confirma la generalidad de las observaciones (Campo, 2006).

La falla del sistema inmune para reconocer ya sea al virus entrante o a la progenie viral es minimizada por el hecho de que el ciclo de vida viral está restringido al epitelio, junto con el bajo nivel de expresión de proteínas virales y ausencia de inflamación. Los mediadores inflamatorios liberados como resultado del daño tisular por un patógeno invasor o herida activan las células presentadoras de antígeno profesionales locales tal como las células dendríticas (células de Langerhans), permitiéndoles procesar y presentar eficientemente el antígeno extraño a las células T, iniciándose así una respuesta linfocitaria efectora mediante la expansión de linfocitos virus-específicos. Sin embargo como los PVs son virus no líticos, la infección produce muy poca o nula respuesta inflamatoria, por lo tanto esta señal puede estar ausente (O'Brien y Campo, 2002).

Así, aunque la cápside del PVs es altamente inmunogénicas como lo demostraron los estudios vacunales que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, son esencialmente invisibles para el hospedero (O'Brien y Campo, 2002). Esta interpretación es sustentada por el hecho de que los animales de campo con tumores ulcerados y sangrantes poseen altos títulos de anticuerpos anti-BPV naturales y se pueden obtener buenas respuestas de anticuerpos luego de

la inoculación intramuscular con virus purificado o proteínas virales, confirmando que sólo cuando el papiloma está dañado, o se alcanza un umbral de naturaleza desconocida mediante la inmunización, los antígenos virales entran en contacto con las células inmunes (Campo, 1998).

Aunque las cápsides virales pueden ser inaccesibles para las células inmunes, las células infectadas con virus en los estratos inferiores del epitelio que expresan las proteínas virales tempranas, incluyendo E5, E6 y E7, deberían ser sujetas a vigilancia mediante células efectoras anti-virales, incluyendo linfocitos T citotóxicos. Aunque estas proteínas virales son inmunogénicas cuando son administradas con preparados vacunales, parece que durante la infección natural los antígenos virales no son presentados eficientemente al sistema inmune, ni pueden ser expresados a niveles detectables por el sistema inmune. Esto puede conllevar a la activación ineficiente de células T lo que resulta en la ignorancia o tolerancia inmunológica de las células infectadas con virus (O'Brien y Campo, 2002).

Los mecanismos del ciclo de vida del virus pueden ser considerados una vía indirecta por la cual el PVs podría limitar el reconocimiento del hospedero de la infección viral, y la extensión de su efecto durante la infección natural aún resta por ser determinado. Sin embargo, parece probable que el PV puede ser reconocido por el sistema inmune del hospedero al menos en alguna capacidad, aunque inefectivamente para mediar la eliminación rápida. Esto está sustentado por la presencia de efectores anti-virales, incluyendo anticuerpos y células T, de pacientes con infección persistente. Por lo tanto, es probable que el PVs, como muchos otros virus, también pueda haber evolucionado vías directas de evitar la eliminación inmune. Existen muchos mecanismos de escape inmune viral conocidos que funcionan para dirigir la respuesta inmune del hospedero lejos del virus (O'Brien y Campo, 2002).

Una función recientemente descubierta de E5 del BPV es la regulación negativa del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (MHC I) (Nasir y Campo, 2008). El MHC I es responsable de la presentación de antígenos peptídicos a células T efectoras y por lo tanto, juega un rol crítico en la respuesta inmune. Una vez que la cadena pesada del MHC I está asociado con β 2-microglobulina y el péptido, el complejo es transportado del retículo endoplásmico a través del aparato de Golgi a la membrana plasmática para el reconocimiento por células T (Tizar *et al.*, 2002).

La regulación negativa del MHC I por E5 del BPV ocurre en múltiples niveles: la transcripción del gen de la cadena pesada del MHC I es reducida, el péptido de la cadena pesada del MHC I es degradado y el complejo MHC I es secuestrado en las cisternas del aparato de

golgi e impedido irreversiblemente de alcanzar la superficie celular. La retención de MHC I en las cisternas de golgi es debida, por lo menos en parte, a dos eventos. Primero, a la alcalinización inducida por E5 del aparato de golgi, y secundariamente por una directa interacción física entre E5 y la molécula MHC I. Esta observación apoya fuertemente la idea que E5 del BPV ayuda al establecimiento de una infección exitosa no sólo con la transformación de la célula sino también por la regulación negativa del MHC I, y así permitir la infección celular evadiendo la inmunorespuesta del hospedero (Nasir y Campo, 2008).

12. Estado latente del BPV

Como muchos otros virus, los BPV pueden establecer una infección latente. El genoma viral puede hallarse frecuentemente en epitelios normales sin signos clínicos de enfermedad (Ogawa *et al.*, 2004) tanto en hospederos clínicamente normales como en los que tienen tumores (Campo, 2006). Los epitelios normales son el sitio aceptado de infección latente, y de hecho, la reactivación del BPV en sitios traumatizados sugiere que el ADN viral está presente en estos sitios de forma latente, y que el daño del epitelio, posiblemente por la producción de citocinas inflamatorias y la estimulación de la proliferación celular, induce la expresión de los genes virales conllevando a la formación del papiloma (Campo *et al.*, 1994).

El ADN del BPV también está presente en forma episomal en los linfocitos circulantes de los bovinos (Campo *et al.*, 1994) y se ha establecido la infección latente del BPV en linfocitos de bovinos de manera experimental (Stocco dos Santos *et al.*, 1998). Así mismo, se ha detectado secuencias del DNA del BPV-1 en sangre entera y plasma de bovinos afectados con papilomas cutáneos; sugiriendo en este caso que la presencia de secuencia de DNA libre en el flujo sanguíneo se originó de la muerte de las células transportadoras de virus (Freitas *et al.*, 2007). Además, la detección de secuencias de ADN del papilomavirus en nódulos linfático (Campo, 2006), células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Freitas *et al.*, 2007), de mujeres con infección urogenital por HPV también ha sido reportada.

Intrigantemente, se ha demostrado *in vitro* que las partículas tipo virus de papilomavirus se unen fuertemente a una variedad de células inmunes, incluyendo las células dendríticas, las células B, monocitos y macrófagos, y se ha hipotetizado que esta interacción probablemente sea importante en la respuesta inmunes contra la cápside del papilomavirus. Estos hallazgos presentan las posibilidades muy atractivas, pero aún puramente especulativas, de que las células sanguíneas representan otro sitio de latencia viral y que, adicionalmente, la relación entre PVs y

las células inmunes puede modular la respuesta inmune del hospedero hacia el virus (Campo, 2006).

13. Vacunación terapéutica y profiláctica contra el BPV

La observación que, aunque la respuesta inmune hacia la infección por BPV es pobre, se produce una respuesta inmune pronta y prolongada cuando los bovinos son inmunizados con proteínas BPV ha conllevado al desarrollo exitoso de vacunas anti-BPV. La primera serie de vacunas consistieron de vacunación intramuscular con virus. Estas vacunas “clásicas” ocasionaron la producción de anticuerpos neutralizantes y la completa protección contra el desafío subsecuente. Sin embargo, estas vacunas confieren protección tipo específica sólo contra el virus homólogo. La vacunación profiláctica se logró con viriones BPV-1 y los anticuerpos neutralizantes se produjeron por la vacunación con la proteína L1 del BPV-1. Luego de estos estudios iniciales, se escogieron al BPV-2 y BPV-4 como papilomavirus emblemáticos de piel y mucosa respectivamente, porque ambos están implicados en cáncer (Campo, 2006).

La vacunación con L2 de BPV-4 induce protección contra el desafío de BPV-4. La inmunidad inducida por la L2 de BPV-4 es de larga duración y los animales vacunados son refractarios a un segundo desafío viral por más de un año después de la vacunación. La inmunidad es conferida por el N-terminal de la L2. Estos resultados son consistentes con la observación de que el N-terminal de la L2 está expuesto sobre la superficie del virión BPV-1 y por lo tanto accesible por el sistema inmune. Se han identificado tres epítopes de células B inmunodominantes en el N-terminal de L2, y para una total protección contra la infección es suficiente sólo un péptido de 20 aminoácidos de largo (residuos 131-151) correspondientes a uno de los epítopes (Campo, 2006).

Las proteínas de la cápside del papilomavirus pueden autoensamblarse en partículas tipo virales (VLPs) cuando son expresados en células eucarióticas. Las VLPs son estructural y antígenicamente similares al virus, y presentan epítopes neutralizantes conformacionales. Las VLPs de BPV-4 conteniendo ya sean las proteínas L1 y L2 o solo la proteína L1 son vacunas profilácticas muy potentes, mientras que su estatus como vacunas terapéuticas es menos certero. La inmunidad protectora contra el BPV-4 puede lograrse ya sea sólo con L1 o sólo con L2. Sin embargo, aunque la vacunación ya sea con L1 o L2 induce la producción de anticuerpos neutralizantes, no todos los eventos de neutralización viral se producen en la superficie celular. El BPV-4 es neutralizado por suero anti-L2 después del ingreso a la célula, pero los mecanismos de esta neutralización intracelular son desconocidos. Por lo tanto, aunque la L2 del

BPV-4 proporciona una vacuna profiláctica poderosa, no protege contra la infección pero sí contra la enfermedad (Campo, 2006).

La vacunación de los terneros con la proteína E7 del BPV-4 no previene la infección. Sin embargo en los animales vacunados el desarrollo del papiloma es más lento y la duración de la papilomatosis es más corta que en los animales control. En los terneros vacunados los papilomas no alcanzaron la etapa final del desarrollo y comenzaron a regresionar en una etapa más temprana. Así, la vacunación con E7 desacelera el crecimiento tumoral e induce la regresión temprana. Los terneros vacunados producen altos títulos de anticuerpos dirigidos a tres epítopes de células B inmunodominantes (Campo, 2006).

Los terneros vacunados con E7 también mostraron una fuerte respuesta celular hacia dos epítopes de células T, no observada en animales control. Así, los linfocitos de animales vacunados proliferan vigorosamente *in Vitro* en presencia de la proteína E7 mientras que los linfocitos T de los animales control muestran poca, o ninguna respuesta. Los papilomas que regresionan naturalmente están infiltrados por gran número de linfocitos activados pero no se sabe hacia que antígenos virales están dirigidos los linfocitos, o si la respuesta inmune celular en terneros vacunados es similar a la que media el rechazo natural del papiloma (Campo, 2006).

Como para BPV-1, una vacuna de subunidad basada en la proteína L1 del BPV-2 produce anticuerpos neutralizantes y confiere protección contra la infección (Campo, 2006). Esto está de acuerdo con la estructura del virión del BPV, en la cual el C-terminal de la L1 se encuentra sobre la superficie del virión (Modis *et al.*, 2002). Una vacuna de L2 del BPV-2 no otorgó protección para el desafío viral pero indujo la regresión temprana de las verrugas; aunque los anticuerpos contra el antígeno son generados en animales vacunados, estos no son neutralizantes. En las verrugas en regresión se observan grandes cantidades de infiltrados de linfocitos y macrófagos, indicativo de una respuesta inmunes mediada por células (Campo, 2006).

14. Epidemiología

14.1 Presentación

La papilomatosis es una enfermedad que se observa en todo el mundo y en todas las especies animales (Radostits *et al.*, 2002)

14.2 Morbilidad

La morbilidad es muy variable, el problema puede alcanzar hasta el 75 % del rebaño y por la existencia de nuevos animales susceptibles la enzootia puede durar años. (Rosenberger *et al.*, 1989).

14.3 Origen y transmisión de la infección

La expresión de la infección con BPV requiere la presencia del agente en el medio ambiente, así como la existencia de lesiones superficiales de piel o mucosas (Dirkson *et al.*, 2005). El modo de propagación es el contacto directo con animales afectados, con penetración de los agentes etiológicos en la piel a través de las abrasiones cutáneas. El virus puede también mantenerse vivo en objetos en las cuadras e infectar a los animales cuando éstos se frotran con ellos (Radostits *et al.*, 2002).

Los bovinos afectados en forma subclínica y portadores eliminadores del virus, así como los portadores inanimados y animados, juegan un papel decisivo. Pertenecen al último grupo todas las herramientas o instalaciones del establo y de la pradera, instrumentos veterinarios no desinfectados correctamente como pinzas, caravanas, pinzas de tatuaje, emasculador, instrumental para el descorne, vagina artificial y guante de palpación rectal (Dirkson *et al.*, 2005). A veces aparecen grupos de verrugas alrededor de los aretes de las orejas y en las marcas de fuego del ganado, o en los rasguños sufridos con las cercas de alambre de espino, y pueden extenderse por instrumentos de tatuaje, tijeras de descorne y procedimientos como la prueba de tuberculina (Radostits *et al.*, 2002). Traumas en la piel, como los tatuajes con nitrógeno líquido, disminuyen el número o así mismo inactivan las células de Langerhans y contribuyen, probablemente para el desarrollo de los tumores de piel (Yeruhan *et al.*, 1993).

Las verrugas del pene en los toros jóvenes pueden impedir la cubrición y pueden propagar el virus a las vacas que son cubiertas de modo natural o a otros toros por medio de las vaginas artificiales que no se desinfectan por rutina (Rebhun *et al.*, 1995). La transmisión por la inseminación artificial es rara, pero puede ocurrir (Murphy *et al.*, 1999).

En la forma mamaria, la transmisión ocurre principalmente por las ordeñadoras mecánicas y por las manos de los ordeñadores que transmiten el virus que después infecta la piel en las zonas donde existen excoriaciones (Rebhun *et al.*, 1995).

La diseminación de la papilomatosis es mayor en lugares donde existen muchas garrapatas y situaciones de estrés, como transporte y destete, que pueden provocar o agravar la enfermedad (Correa y Correa, 1992). Se ha sospechado que los insectos propagan o inoculan el virus en la piel pero esto sigue siendo difícil de demostrar (Rebhun *et al.*, 1995). En Brasil la contribución más fuerte para diseminar la enfermedad ha sido el tránsito intenso de animales entre las diferentes regiones del país (Marins, 2004). Sin embargo, la manera como el virus es introducido en grupos aislados de animales permanece sin explicación (Bezerra *et al.*, 1994). Esos hallazgos indican la posibilidad de que el BPV puede estar presente en la forma latente en el organismo animal (Melo y Leite, 2003).

La detección de material genético de BPV-1 en verrugas, sangre, leche y calostro de una vaca afectada por papilomas cutáneos, así como en la placenta, líquido amniótico y sangre de su ternero recién nacido, sugieren que la sangre periférica puede ser una vía de difusión a otros tejidos y proporciona pruebas sobre la transmisión vertical del BPV-1 (Freitas *et al.*, 2007). Además también ha sido investigada la presencia de secuencias de DNA del BPV en muestras uterinas, ováricas, fluidos y oocitos, de bovinos decaídos no afectados por la papilomatosis cutánea y también muestras de semen usadas en programas de inseminación artificial (Carvalho *et al.*, 2003a). Estos hallazgos alertan la posibilidad de transmisión del BPV a través de los procedimientos de transferencia de embriones, inseminación artificial y de fertilización *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2003b).

La presencia del DNA del BPV en sangre periférica, tracto reproductivo, y gametos de bovinos a sido documentado (Carvalho., *et al* 2003a, b; Freitas *et al.*, 2003b). Las observaciones anteriores plantean la pregunta de cómo los papilomavirus pueden estar localizados en esos tejidos, considerando la ausencia de infección directa y la histórica presunción que no ocurre la diseminación hematogena y viremia por los papilomavirus. Quizás no hay mejor interpretación en cuanto al hallazgo del ADN del virus del papiloma en PBMCs en lo relacionado a como el virus puede propagarse e infectar las células epiteliales en otros órganos (Freitas *et al.*, 2007)

Dado que durante la respuesta inmune contra el virus del papiloma las células inmunitarias presentes en el torrente sanguíneo interactúan con el virus del papiloma, se puede especular que las PBMCs, los linfocitos, pueden actuar como una vía para la difusión o transmisión del BPV, que podrían servir como fuente de BPV en la infección de las células epiteliales y contribuir a su diseminación. Estudios desarrollados con el virus de la inmunodeficiencia humana, que infecta los linfocitos T CD4, podría demostrar su transmisión

placentaria y sugiere que los leucocitos presentes en la decidua, así como la presencia de sangre materna en los espacios entre las vellosidades, como posibles fuentes de infección viral. Los mismos lugares pueden ser los sitios para la transmisión transplacentaria del BPV, ya que su presencia en la sangre periférica libre o en el interior de la célula también ha sido verificada (Fig. 2) (Freitas *et al.*, 2007).

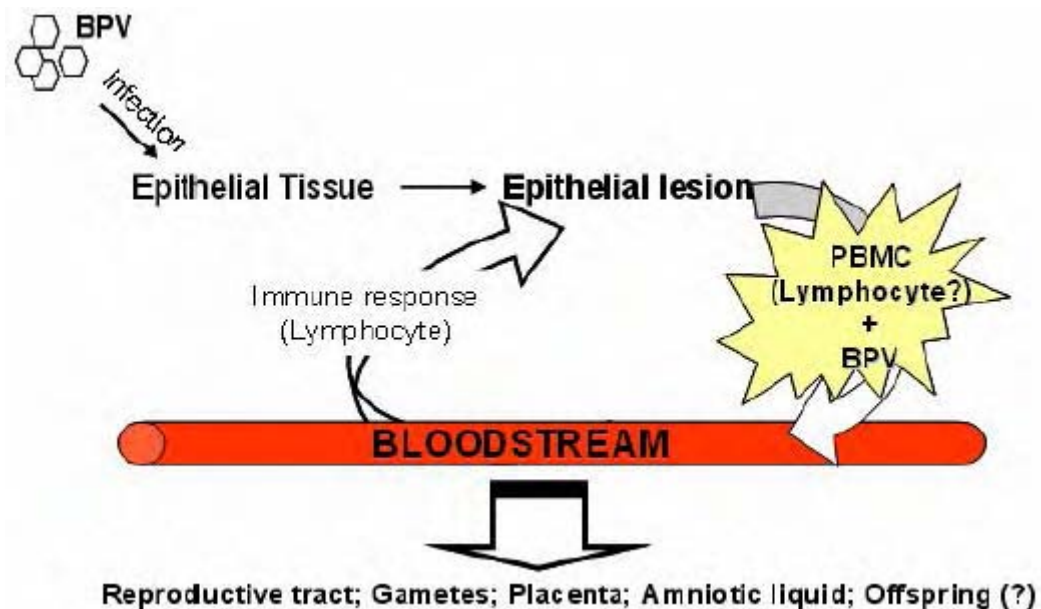


Fig. 2 Propuesta del tránsito del BPV entre los tejidos o fluidos corporales a través del torrente sanguíneo después de la infección del tejido epitelial (Freitas *et al.*, 2007).

14.4 Factores de riesgo

14.4.1 Manejo

El sistema de crianza de la población expuesta por la enfermedad influencia en la tasa de incidencia. Poblaciones confinadas son más susceptibles a los brotes y a la mayor incidencia de la enfermedad. Las lesiones clínicas de la papilomatosis en becerros parece manifestarse principalmente después del destete (Melo y Leite, 2003). Las excoriaciones de la piel debidas a traumatismos de poca importancia por objetos aguzados (uñas, madera astillada, alambre de espino, extremos de cerrojos) permiten la inoculación del virus en la piel y aumentan la incidencia de las verrugas (Rebhun *et al.*, 1995)

Hama *et al.* (1988) observaron una ocurrencia de la enfermedad del 46.21% en novillas; donde probablemente factores específicos, tales como nutrición, infestación por garrapatas y la edad, puedan haber contribuido para tal frecuencia. William *et al.*, (1992) observaron que todos

los animales que presentaban papilomatosis eran concomitantemente infestados por garrapatas. En Kenia, Mbuthia *et al.*, (1993) reportaron que la implantación en el manejo de control obligado de garrapatas por el uso de ectoparasiticidas alteró la incidencia de presentación de la papilomatosis.

14.4.2 Raza y Sexo

Según da Silva *et al.*, (2004) el BPV no presenta predilección por sexo o raza. Sin embargo según Melo y Leite (2003) los animales de la raza holandesa de la variedad negro y blanco presentan una mayor ocurrencia de la enfermedad. También se ha observado que en becerros que presentaron papilomatosis después del destete, las hembras aparentemente tuvieron mayor sensibilidad, probablemente debido a algún mecanismo hormonal poco esclarecido, envuelto en la patogenia de la enfermedad.

14.4.3 Edad

Aunque todas las edades son susceptibles (Melo y Leite, 2003) se observa preferentemente en bovinos receptivos, entre los 6 meses y 2 años de edad, en forma esporádica o enzoótica (Dirkson *et al.*, 2005). La falta de susceptibilidad de los adultos para la infección natural se considera debido a la inmunidad adquirida por infección aparente o inaparente cuando eran jóvenes (Dirkson *et al.*, 2005; Radostits *et al.*, 2002). La papilomatosis cutánea de los becerros acostumbra regresionar en el plazo de un año o menos; sin embargo, en vacas, la tendencia es a no regresionar, principalmente en la forma del papiloma plano (Correa y Correa, 1992).

15. Importancia económica

Los prejuicios económicos que la papilomatosis bovina acarrea, son la ceguera, desarrollo retardado, desvalorización del cuero del animal y, consecuentemente, la disminución de la productividad. En animales de pura raza pueden interferir con las ventas y ser un inconveniente para su exposición, debido al aspecto antiestético de las verrugas (Radostits *et al.*, 2002). Ocurre todavía una sensible depreciación del valor del animal, en función de los problemas relacionados con la fertilidad principalmente cuando la localización del papiloma es observada en los genitales (Rosemberger *et al.*, 1989). La papilomatosis del pene interfiere con la función normal del toro y el animal tiene que ser sacrificado (Campo *et al.*, 2002). Las

verrugas perianales son estéticamente poco atractivas, pero no parece que reduzcan la actividad o la productividad de los animales (Radostits *et al.*, 2002).

Otro problema recurrente de la enfermedad es el surgimiento de papiloma en la ubre y pezones. Esta enfermedad, especialmente si es causada por BPV-6, no es únicamente un problema de salud sino también tiene consecuencias económicas. Cuando la expansión es clínicamente significativa, las vacas con papilomas en pezones no pueden ser ordeñadas, los terneros no pueden mamar, y a menudo los papilomas pedunculados se arrancan, estos sitios se infectan y la mastitis puede seguir con la alteración del conducto de la leche. Ocasionalmente todo el ganado tiene que ser sacrificado si la papilomatosis no retrocede. (Campo, 2006).

Los animales con extensas lesiones pueden perder peso, y la invasión bacteriana secundaria de verrugas traumatizadas puede llegar a ser preocupante (Radostits *et al.*, 2002). Una de las consecuencias inmediatas del proceso es el establecimiento de miasis donde el papiloma se localiza, además de servir de puerta de entrada para otras infecciones secundarias (Rosemberger *et al.*, 1989). Animales que desarrollan extensas lesiones papilomatosas en el tracto gastrointestinal superior tienen dificultades al comer y respirar y tienen que ser sacrificados. Si la papilomatosis no es demasiado grave, el animal sobrevive pero tienen gran riesgo de desarrollar carcinomas de células escamosas (Campo, 2006).

Los Caballos, burros y mulas pueden desarrollar sarcoide como resultado de la infección por el BPV 1-2. Ya que el tumor es localmente invasivo y refractaria al tratamiento puede conducir a que el animal sea sacrificado. La pérdida económica es importante tanto para la industria de las carreras y aún más para los agricultores y campesinos de los países en vías de desarrollo, para los que a menudo la mula o asno es el único medio de subsistencia (Campo, 2002).

16. Patogenia

Los papilomavirus suelen infectar a las células basales del epitelio escamoso como consecuencia de pequeñas abrasiones, las células basales epiteliales son los blancos iniciales de infección, (Howley y Lowy, 2001). También pueden penetrar en el organismo a través de puntos vulnerables, tales como las uniones entre diferente tipo de epitelio (Quinn *et al.*, 2002). La expresión de los genes virales tempranos (E1, E2, E5, E6 y E7) es activada en el estrato basal y suprabasal del epitelio (Fig. 2) (O'Brien y Campo, 2002). Las proteínas codificadas por los marcos E5, E6 y E7 aumentan la tasa de división y retrasan la maduración celular en el

estrato germinal y sucesivos, cuyas células se acumulan y dan lugar al papiloma naciente (Vadillo *et al.*, 2002).

La expresión de E4 y la replicación del ADN viral ocurre en el estrato espinoso y granular (O'Brien y Campo, 2002). La replicación del genoma viral se da a través de la acción de las proteínas virales E1 y E2 en cooperación con las proteínas de replicación celular (Stenlund, 2007). Las proteínas estructurales de cápside L1 y L2 son expresadas en el estrato granular. Finalmente los viriones son ensamblados en el estrato escamoso y son liberados con las escamas de queratina. (O'Brien y Campo, 2002). Tras la inoculación experimental, el periodo de incubación en la vaca es de 3 a 8 semanas, pero por lo general es mayor en el caso de exposición natural. El tumor contiene tejido epitelial y conjuntivo, y puede corresponder a un papiloma o un fibropapiloma, según la proporción relativa del tejido epitelial y conjuntivo presente; los papilomas contienen poco tejido conjuntivo, mientras que los fibropapilomas están formados sobre todo por éste, con escasa cantidad de tejido epitelial (Radostits *et al.*, 2002).

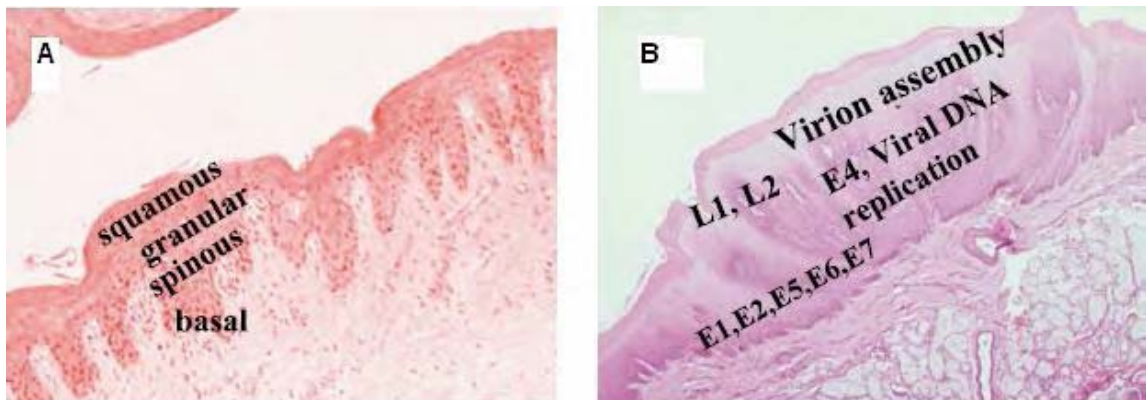


Fig. 3. (A) Sección histológica de epitelio normal, con las capas celulares indicadas. (B) Papiloma epitelial. Expresión de proteínas tempranas E1, E2, E5, E6 y E7 empieza en la capa basal y suprabasal; expresión de E4 y replicación del ADN viral tiene lugar en el estrato granular y espinoso; producción de las proteínas de la cápside L1 y L2 tiene lugar en el estrato escamoso; viriones son ensamblados en el estrato escamoso y liberados con las escamas de queratina. (O'Brien y Campo, 2002).

17. Patología

Según Campo (1995), los virus de la papilomatosis bovina están subdivididos en dos subgrupos y el desarrollo del tumor por cada virus sigue, de acuerdo con el subgrupo en el que el virus actuante está incluido. En cada subgrupo el desarrollo del tumor está dividido en cuatro estadios. Los subgrupos y la caracterización de cada estadio son:

17.1 Subgrupo A (BVP-1, BVP-2 y BVP-5)

En el estadio uno (fibroma) se desarrolla una activa proliferación de los fibroblastos epiteliales. En el estadio dos se observa fibroma con acantosis (hiperplasia difusa y afección de la capa celular primordial), existe proliferación de la capa basal del epitelio y penetración de tejido fibromatoso. En el estadio tres ocurre el fibropapiloma verdadero: hay presencia de queratinocitos formando masas que tienen un núcleo central de tejido conectivo (Campo, 1995).

Las lesiones microscópicas típicas de los llamados fibropapilomas consisten en acantosis, hiperqueratosis y crecimiento de la “rete ridges” (hiperplasia irregular que resulta en la formación de “espigas” de epidermis que se proyectan hacia la dermis subyacente) hacia abajo, con predominio de proliferación de la dermis. La célula proliferante es un fibroblasto grande y redondo. Las células están distribuidas en espiral y en fascículos desordenados, y no en capas perpendiculares como sucede en el tejido de granulación. En algunos la proliferación de la epidermis es mínima y se observa solo bajo la forma de una ligera acantosis con acentuación de la “rete ridges” (Jubb *et al.*, 1985).

En el estadio cuatro (regresión del tumor) ocurre el ataque de linfocitos y macrófagos, primero al fibroma y después a la porción papilomatosa del tumor. De los cuatro estadios del desarrollo del fibropapiloma, sólo el estadio tres soporta replicación viral y liberación, sin embargo la replicación del ADN viral y la síntesis de antígenos virales pueden también ser detectados en el estadio dos. En el caso de los fibropapilomas del rumen, esófago y vejiga, histológicamente se asemejan a los fibropapilomas de piel en estadio dos (fibroma con acantosis). El desarrollo del tumor no llega más lejos, y tampoco soporta producción viral, pero presentan copias episomales de ADN viral en fibroblastos y células epiteliales (Campo, 1995).

17.2 Subgrupo B (BVP-3, BVP-4 y BVP-6)

El estadio uno (“placa”) aparece cerca de cuatro semanas después de la inoculación y consiste de tubos de queratinocitos, que irán a formar la masa del futuro papiloma. En este estadio ya es detectada la replicación viral. El estadio dos (típico papiloma epitelial) está compuesto por masas epiteliales que contienen grandes cantidades de ADN episomal viral. La replicación viral continúa en las áreas queratinizadas (Campo, 1995).

Microscópicamente en los papilomas de tipo escamoso completamente desarrollados, la epidermis se encuentra engrosada con hiperplasia del estrato espinoso y corneo. La epidermis

hiperplásica muestra hiperqueratosis y paraqueratosis superficial y alargamiento notorio de la “rete ridges”, que se interdigita con el tejido conectivo hiperplásico de las papilas dérmicas. En el estrato espinoso se puede encontrar racimos de células epidérmicas con citoplasma vacuolado. Estas células infectadas por virus poseen tonofilamentos libres y sufren degeneración hidrópica. En el estrato espinoso se han observado cuerpos de inclusión intranucleares basofílicos que corresponden a grupos de viriones, pero no es frecuente observarlos en las lesiones que ocurren en forma natural (Jubb *et al.*, 1985).

Después de aproximadamente ocho meses la formación tumoral entra en el estadio tres y, aunque histológicamente es similar al estadio dos, los tumores no soportaran por más tiempo ni la producción viral ni la replicación del ADN viral. En el estadio cuatro la formación tumoral entra en el último estadio, de regresión (Campo, 1995).

18. Signos clínicos

En los fibropapilomas de la piel los signos clínicos son evidentes pero las verrugas planas de base amplia y de color gris a veces se diagnostican erróneamente como lesiones costrosas de la tiña. Las lesiones tienden a ser múltiples y se encuentran ubicadas principalmente en la cara, en el cuello, en la espalda y en el tronco (Rebhun *et al.*, 1995). Sin embargo las verrugas se pueden presentar en cualquier parte del cuerpo, pero cuando están afectados varios animales de un mismo grupo, es frecuente que las lesiones se encuentren en todos ellos en la misma parte del cuerpo (Radostits *et al.*, 2002) siendo esta una ayuda para identificar la causa de la infección (Rebhun *et al.*, 1995).

Sobre la piel de la cabeza, cuello, tronco y extremidades se producen papilomas pedunculados (fungiformes) o con superficie como de coliflor o corales (coraliformes). Estos tumores que rara vez llegan a ser de las dimensiones de una cabeza humana o un balde, en principios son blandos, carnosos, con una coloración rosada o gris-rosada; más tarde se induran por queratinización del epitelio. Ante acciones mecánicas los papilomas tienden a sangrar, lo que les da una coloración más oscura; además por necrosis celular despiden un olor desagradable. (Dirkson *et al.*, 2005). Según Hama *et al.* (1988), la papilomatosis en bovinos lecheros parece presentar una cierta predilección por áreas de la ubre y pezones en animales adultos y novillas. Según Melo y Leite (2003), en becerras las lesiones en ubre y pezones constituyen un hallazgo clínico poco común, siendo el cuello, barbilla, orejas, región del cigomático, regiones periocular y perilabial, los lugares más susceptibles.

Las verrugas de los pezones son muy corrientes en las vacas lecheras (Rebhun *et al.*, 1995). La razón por la cual la infección de los pezones por el BPV es más prolongada y menos propensa a la resolución que la infección de la piel por el BPV no son conocidas (Campo *et al.*, 2006). Los pezones y las ubres de las vacas están sometidos a la infección por tres tipos diferentes de BPVs (Fig. 3) (Campo *et al.*, 2002, Radostits *et al.*, 2002) manifestándose de formas diferentes, según el tipo de papilomavirus causal, y pueden aumentar en frecuencia con la edad. Las verrugas en el extremo del pezón a veces impiden el ordeño eficaz y siempre predisponen a mastitis por causa de los contaminantes ambientales. Las verrugas del pezón pueden desaparecer durante el periodo de reposo de la glándula y volver a presentarse con la siguiente lactancia (Radostits *et al.*, 2002).

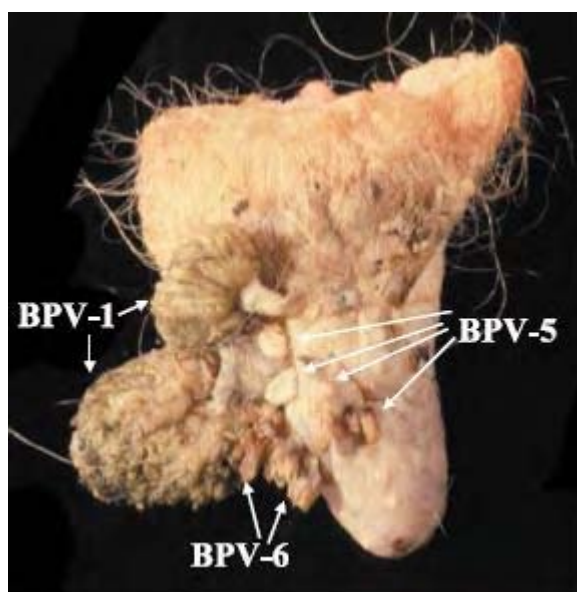


Fig. 4. Papiloma en pezón de bovino. Fibropapiloma frondoso largo son causados por BPV-1; Fibropapiloma ovalado pequeño (grano de arroz) por BPV-5, y pequeño papiloma epitelial frondoso por BPV-6. (Tomado de Campo, 2002).

18.1 Número, tamaño y forma los papilomas

El número, tamaño y forma de las neoplasias presentan grandes oscilaciones. Existen tamaños desde el de una lenteja al de la cabeza de un niño y también neoformaciones que alcanzan 30 kg. En algunos casos fueron contados hasta 220 papilomas; en promedio, aparecen 10 a 100 por animal. Generalmente es observado que cuando mayor es el número de papilomas, menor es su tamaño (Wittmann, 1999).

18.1.1 Forma pedunculada

El papiloma pedunculado es el más común en animales jóvenes, pero también puede ocurrir en los adultos (Santin y Brito, 2003). Es más visible y ocurre generalmente en la barbilla, cuello o cabeza, pero puede surgir en cualquier otra región del cuerpo (Santin, 2001). Macroscópicamente las proliferaciones del tipo fibropapiloma son esponjosas, con superficie lisa o agrietada, de acuerdo con el grado de hiperplasia epidérmica (Jubb *et al.*, 1985). Estos tumores aparecen blancos o grises; inicialmente, son achatados o lisos y, más adelante, son negro-grisáceos; elevados, pedunculados y con superficie queratinizada bastante firme, a veces, duro como uñas o cuernos (Correa y Correa, 1992). Se caracteriza por una base de inserción amplia, superficie irregular, cornificada, ausencia de pelos y con tamaño de uno a 10 cm. de diámetro (Santin y Brito, 2003). Se presenta en forma arborescentes, friables, semejantes a la forma de la “coliflor” (Santin, 2001). Las masas papilomatosas pueden emanar olor putrefacto (Wittmann, 1999).

18.1.2 Forma plana

La forma plana, a su vez, es más frecuente en animales viejos (Santin y Brito, 2003). El tipo plano ocurre más en la región del cuello y dorso-lateral del abdomen. Por ser de visualización más difícil, generalmente el criador sólo percibe el problema cuando está en grado avanzado, lo que dificulta el tratamiento (Santin, 2001). La lesión macroscópica típica en los papilomas es una lesión circular, clara u oscura con aspecto filiforme, de formación achatada, con inserción amplia, pudiendo presentar pelos. Las lesiones son más bien circulares midiendo desde 0,5cm (Santin y Brito, 2003) hasta los 20cm de diámetro, pero son más comunes las lesiones de cinco a diez centímetros (Jubb *et al.*, 1985)

18.2 Procesos clínicos asociados con los diferentes tipos de BPVs

18.2.1 BPV-1

El BPV-1 produce fibropapiloma en la mucosa peniana (Dirkson *et al.*, 2005; Campo *et al.*, 1997), mucosa prepucial (Dirkson *et al.*, 2005), fibropapiloma grande frondosos (Campo *et al.*, 2002) o fibroso deflecados (Dirkson *et al.*, 2005) en la piel de los pezones, alrededor del aparato genital, partes anteriores y ventrales del cuerpo (Radostits *et al.*, 2002), cabeza, cuello y en la región de la articulación escápula-humeral; siendo más frecuentes en estas últimas tres regiones (Fenner *et al.*, 1992).

Se presentan en la verga o en el glande de toros jóvenes, pueden ser únicos o múltiples y estar pedunculado. Las verrugas genitales en el pene y la vagina hacen imposible el coito, debido a su gran tamaño, y a que son friables y sangran fácilmente. Con frecuencia se infectan y se complica con miasis (Radostits *et al.*, 2002). La lesión puede propagarse a lo largo del periné y hacia la parte dorsal del toro, pudiendo llegar a necrosarse y causar la pérdida de la función reproductiva (Campo, 2006) pero con frecuencia curan de manera espontánea (Radostits *et al.*, 2002).

BPV-1 también infecta el epitelio de la vejiga urinaria estableciendo una infección abortiva, sin producción de virión. La participación del helechero y BPV-1 en la carcinogénesis de vejiga ha sido reconocida por largo tiempo, esta progresión neoplásica se ha reproducido experimentalmente y se ha reconocido un proceso carcinogénico similar de manera general al establecido por el BPV-4 (Campo, 2002).

En muestras de ovario, útero, oocitos y célula del cúmulo obtenidas de bovinos que no manifestaban papilomatosis cutánea fue encontrado el BPV-1 (Carvalho *et al.*, 2003a). Así como muestras de verrugas, placenta, líquido amniótico y sangre de un animal que presentando clínicamente la enfermedad, fueron positivas para el BPV-1 (Freitas *et al.*, 2003a). También fue reportado que la cría del animal anterior presentó secuencia de DNA del BPV-1 en muestras de sangre colectadas inmediatamente después del nacimiento. Siendo este el primer reporte de transmisión vertical natural de BPV-1 y muestra nuevas evidencias de la presencia intracelular del DNA del BPV-1 en el torrente sanguíneo (Freitas *et al.*, 2003a).

18.2.2 BPV-2

Este tipo de fibropapiloma cutáneo afecta el ganado joven de menos de dos años de edad (Quinn *et al.*, 2002). El tipo 2, es el más común, (Campo *et al.*, 1997) y produce fibropapilomas en coliflor en el bajo vientre, periné (Dirkson *et al.*, 2005) pero son más frecuentes en la cabeza, cuello y en la región de la articulación escápulo-humeral. Generalmente al cabo de un año se produce la regresión espontánea de las lesiones (Quinn *et al.*, 2002). BPV-2 también infecta el epitelio de la vejiga urinaria estableciéndose un proceso similar al producido por el BPV-1 (Campo, 2006).

Fue evidenciado material genómico de BPV-2 en las muestras de sangre, tejidos del tracto reproductivo de bovinos hembras (ovario, útero, oocito y célula del cumulus) (Carvalho *et al.*, 2003b), líquido seminal y muestras de semen congelado de un reproductor bovino oriundo

del Valle de Paraíba–SP (Brasil) y también de muestras de sangre, verruga y semen congelado de un macho oriundo de la región del Sur del Estado de Bahía (Brasil) (Carvalho y Stocco dos Santos, 2000).

Secuencias de DNA de BPV-2 han sido identificadas en células de sangre periférica, asociadas o no con reportes patológicos, recordando que los virus en esas células pueden entrar en estado de latencia (Freitas *et al.*, 2003a, b). BPV-2 puede estar presente en la forma latente en linfocitos (Wosiacki *et al.*, 2003; Campo *et al.*, 1994).

18.2.3 BPV-3

Este tipo aparece en cualquier lugar del cuerpo (Desrochers *et al.*, 1994), pero tiene predilección por la cabeza, cuello y es sospechoso de estar en los espacios interdigitales, a pesar de no haber sido aislado aún de los papilomas interdigitales. Por esa razón, algunos autores especulan que las verrugas interdigitales pueden ser causadas por una nueva cepa de BPV (Smith, 1990). Actualmente cuatro nuevos papilomavirus bovino (BPV 7-10) han sido caracterizado (Campo *et al.*, 1981; Jarret *et al.*, 1984; Tomita *et al.*, 2007; Hatama *et al.*, 2008; Owaga *et al.*, 2007).

Generalmente el tumor tiende a persistir durante años. Pueden estar afectados tanto los animales jóvenes como los adultos y las lesiones consisten en proyecciones multiples parecidas a dedos o a frondes que son papilomas con proliferación del epitelio pero carecen de fibromatosis de la dermis. Estas lesiones no son tan notablemente elevadas como las verrugas debidas al BPV-1 o al BPV-2 y simplemente pueden estar entremezcladas con piel sana provista de pelo (Rebhun *et al.*, 1995). Acostumbran ser sésiles, circulares, planos y recubren un área grande, normalmente poseen proyecciones en su superficie (Desrochers *et al.*, 1994).

18.2.4 BPV-4

BPV-4 induce papiloma en el tracto gastrointestinal superior, todos los lugares desde la lengua hasta el rumen pueden ser afectados (Campo, 2006). Rara vez se observan clínicamente en los animales vivos en la mayoría de los países (Radostits *et al.*, 2002). Los fibropapilomas de esófago o de la mucosa preestomacal son blanquecinos y coraliformes y muchas veces recién se descubren en la endoscopía, rumenotomía exploratoria (Dirkson *et al.*, 2005) o en el matadero (Radostits *et al.*, 2002). En la base de la lengua, se puede observar tejido verrucoso en animales que adelgazaron y que, posiblemente, roncan; en el esófago, pueden causar meteorismo

recidivante y timpanismo crónico; en la laringe y la tráquea, puede causar estertores audibles y disnea, pero estos últimos sólo se diagnostican cuando están bastante avanzados (Correa y Correa, 1992).

En animales sanos los papilomas son escasos y normalmente regresionan después de aproximadamente doce meses. En animales inmunodeprimidos crónicamente la regresión no tiene lugar y los papilomas se propagan y persisten (Campo *et al.*, 2002). Animales que desarrollan extensas lesiones papilomatosas en el tracto gastrointestinal superior tienen dificultades al comer, respirar (Campo, 2006), eructar, rumear (Dirkson *et al.*, 2005) y tienen que ser sacrificados. Si no es demasiado grave, el animal sobrevive, pero tiene gran riesgo de desarrollar carcinomas de células escamosas (Campo, 2006).

El desarrollo de los papilomas tipo 4 y su progreso hacia el cáncer esta mediado por la interacción entre el virus, químicos carcinogénicos e inmunosupresores presentes en el hehecho común. Mientras tanto, su evolución para la malignidad no requiere necesariamente estar influenciado por las toxinas presentes en el hehecho común (Campo *et al.*, 1997). Eventos raros son descritos en lesiones cutáneas (Kobashi *et al.*, 2003), pudiendo también estar presente en oocitos y células del cumulus (Carvalho *et al.*, 2003a).

18.2.5 BPV-5

El tipo 5 es responsable de la formación de fibropapiloma conocida vulgarmente como “grano de arroz” (Dirkson *et al.*, 2005; Radostits *et al.*, 2002) por presentarse con aspecto liso, blanco y plano (Smith, 1990). Estos papilomas generalmente son múltiples, se encuentran localizado en la piel de la ubre (Campo, 2006; Dirkson *et al.*, 2005; Radostits *et al.*, 2002) y en la piel de uno o varios pezones (Campo, 2006; Quinn *et al.*, 2002) de vacas de cualquier edad, tienden a propagarse a todo un rebaño y no regresionan espontáneamente (Desrochers *et al.*, 1994). Rara vez provocan malestar, dificultan el ordeño, o causan otros problemas a no ser que esté afectado el extremo del pezón (Rebhun *et al.*, 1995). También se a demostrado su presencia en las verrugas cutáneas (Radostits *et al.*, 2002).

18.2.6 BPV-6

Es responsable de los pequeños papilomas epiteliales frondosos en los pezones (Campo, 2006) y la ubre (Radostits *et al.*, 2002). También fue aislado de pezones cuyo papiloma se presentaba con aspecto redondo, plano y achatado (Smith, 1990). Poco se sabe al respecto de

esta cepa viral (Marins, 2004). Una característica de BPV-6 es su difusión secundaria e incluso terciaria alrededor de los tumores primarios. La regresión natural no ha sido observada en situaciones experimentales. Esta expansión es clínicamente significativa, cuando las vacas con papilomas en el pezón no pueden ser ordeñadas, los terneros no pueden mamar y a menudo los papilomas pedunculados se arrancan. En ocasiones, todo el ganado tiene que ser sacrificado si la papilomatosis no retrocede (Campo, 2006).

19. BPV y cáncer

Las lesiones persistentes inducidas por papilomavirus tienen un alto riesgo de progresar a cáncer en humanos y otros animales como por ejemplo los bovinos (Campo, 2006). El papilomavirus humano (HPV) ha sido firmemente identificado como el mayor agente etiológico responsable de neoplasias del epitelio cutáneo y mucoso. El cáncer cervical causada por el HPV es la segunda causa de muerte más común relacionadas a cáncer en mujeres de todo el mundo (NRC, 2009). Recientes estudios sugieren que la infección por el HPV puede inducir cáncer oral, de cabeza y cuello, de esófago, de pulmón y colorectal. Además, otros estudios reportan la presencia de DNA del HPV en tejido prostático, células espermáticas y en tejido de cáncer de mama (Freitas *et al.*, 2007).

El cáncer, incluyendo el asociado a papilomavirus, es una enfermedad multifactorial y se requieren varios pasos antes de que se alcance la transformación neoplásica completa. El cáncer de la parte superior del tracto gastrointestinal y la vejiga urinaria en el ganado son el resultado de complejas interacciones entre el virus del papiloma, inmunosupresores, químicos carcinógenos y la conformación genética del hospedero (Campo, 2006). Se ha identificado al helecho común como un cofactor ambiental importante en la carcinogénesis inducida por el BPV en el ganado. El helecho común contiene los inmunosupresores y un número de mutágenos. La inmunosupresión inducida por el helecho es asociada a dos cambios hematológicos marcados. El primero de éstos es una caída dramática en leucocitos polimorfonucleares. Si la caída es desenfrenada, llevará a una inmunosupresión aguda severa con invasión de la circulación sanguínea por bacterias alimenticias y muerte por septicemia. Esto está bien descrito en el síndrome veterinario de envenenamiento agudo por helecho. El segundo efecto del consumo del helecho es una caída crónica de los linfocitos circulantes. Incluso durante períodos de retiro del helecho la cuenta del linfocito sigue siendo muy baja (Campo, 2006).

19.1 BPV-4 y el cáncer del tracto gastrointestinal superior

En el ganado alimentado con helecho común los papilomas del tracto gastrointestinal superior inducidos por el BPV-4 se encuentran en alto riesgo de progresar a cáncer. El helecho común contiene inmunosupresores y sustancias químicas carcinogénicas y su presencia en la alimentación animal causa una variedad de enfermedades (Campo, 1997). La contribución viral, así como de factores químicos e inmunológicos en la progresión neoplásica de los papilomas inducidos por el BPV-4 se estableció por primera vez en el campo y luego en condiciones experimentales (Campo *et al.*, 1994).

Estudios epidemiológicos y moleculares han permitido la determinación de los eventos que se tienen lugar durante la carcinogénesis. BPV-4 infecta la mucosa de la parte superior del tracto gastrointestinal, expresa sus proteínas transformantes e induce papilomas. Estas son lesiones hiperproliferativas benignas que en animales sanos inmunocompetentes retrocede debido a una respuesta inmune mediada por células. En el ganado vacuno que se alimenta de helecho común el sistema inmune está crónicamente deprimido por los inmunosupresores presentes en la planta y una respuesta eficaz no puede ser montada contra el virus o las células infectadas. Los papilomas se diseminan ampliamente y presenta un extenso blanco para las sustancias químicas carcinogénicas presentes en el Helecho común (Campo, 2002).

Durante el proceso carcinogénico, se incrementa el número de receptores celulares para el factor de crecimiento epidérmico, el gen ras es activado y el gen del p53 es mutado. Las células del papiloma en división rápidamente empiezan a invadir la dermis subyacente y se produce la completa transformación al carcinoma de células escamosas. Los eventos transformantes probablemente son debido a productos químicos contenidos en el Helecho común, pero, aunque esto ha sido demostrado *in vitro*, queda por ser establecido *in vivo* (Campo, 2002).

19.2 BPV-1, BPV-2 y el cáncer de vejiga urinaria

El cáncer de vejiga urinaria abarca dos tipos principales, carcinoma del urotelium, según lo considerado en seres humanos, y hemangioendoteliomas de los capilares subyacentes. Los dos tipos de tumores ocurren a menudo juntos en la misma vejiga (Campo, 2006). La participación del helecho y BPV-1 o BPV-2 en la carcinogénesis de vejiga ha sido reconocida por largo tiempo y más recientemente esta progresión neoplásica se ha reproducido

experimentalmente reconociéndose un proceso carcinogénico similar de manera general al establecido por el BPV-4 (Campo, 2002).

BPV 1-2 infecta el epitelio de la vejiga urinaria (tal vez como una infección secundaria derivada de la infección del área paragenital) y establece una infección abortiva, sin producción de viriones, como es el caso de los fibropapilomas del canal alimentario. El ADN viral en las lesiones de vejiga es todavía infeccioso y capaz de iniciar un ciclo replicativo en el ambiente permisivo de la piel (Campo, 2006). Los inmunosupresores del helechito permiten la formación de las lesiones pre-neoplásicas, que se han de convertirse en malignas por las sustancias químicas cancerígenas de la planta (Campo, 2002). La oncoproteína viral E5 es expresada, el gen ras es activado, y la expresión del locus de tetradas de histidina frágiles supresores tumorales (FHIT) esta regulada negativamente. La inmunosupresión inducida por el helechito común previene el rechazamiento del tumor y los mutágenos del helechito contribuyen a la desestabilización del genoma (Campo, 2006).

20. Diagnóstico

Debido a su forma característica, los papilomas y fibropapilomas cutáneos y de límite cutaneomucoso son fáciles de reconocer (Dirkson *et al.*, 2005). Sin embargo si los signos no son patognomónicos, la biopsia de extirpación es confirmativa (Rebhun, 1995). Entre las pruebas sugestivas y confirmatorias importantes para el diagnóstico de infección por PBV, destacan la citopatología, la histopatología, la microscopía electrónica, la inmunohistoquímica y las pruebas para detección de ácido nucleico viral (Romanos *et al.*, 2002).

El examen citopatológico identifica tanto las alteraciones celulares benignas, como aquellas de mayor gravedad. Los criterios histopatológicos permiten el diagnóstico de la infección por BPV, mas no identifican el tipo viral envuelto. Además, la infección puede ocurrir sin alteraciones citopatológicas, siendo importante, de esa forma, una combinación de pruebas. El análisis inmunocitoquímico es basado en la captura de antígenos en frotices celulares, empleando anticuerpos dirigidos contra las proteínas comunes de los papilomavirus, conjugados con peroxidasa o sustancias fluorescentes. La sensibilidad de estos análisis es limitado, variando de acuerdo con el tipo de lesión. La microscopía electrónica de transmisión revela la presencia de partículas virales intranucleares, sin embargo, tal procedimiento es poco utilizado en el diagnóstico de las lesiones (Romanos *et al.*, 2002).

Con relación a los exámenes para la detección del ácido nucleico viral, más allá de detectar una infección, dependiendo del método empleado, tales exámenes son más sensibles para determinar el tipo de BPV envuelto. Pueden ser empleadas las técnicas de *Southern blotting*, hibridización *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Carvalho *et al.*, 2003a, b; Romanos *et al.*, 2002).

21. Pronóstico

El pronóstico en la papilomatosis cutánea bovina es favorable, excepto si los papilomas son tratados tardíamente, comprometiendo principalmente a los animales inmunodeprimidos (Correa y Correa, 1992). La mayoría de los papilomas y fibropapilomas del bovino tienen un periodo de “florecimiento” de 1 a 3 meses, luego de lo cual en otro 1-3 meses involucionan sin consecuencia; con excepción algunas de estas neoplasias pueden persistir por un tiempo menor o igual a 18 meses (Dirkson *et al.*, 2005). Rosenberg (1989) describió que la extensión y duración del crecimiento de los papilomas estaban relacionadas a la edad, a la receptividad genética, al manejo inadecuado y a la inmunodeficiencia. La enfermedad acostumbra persistir solamente en animales inmunosuprimidos (Somvanshi *et al.*, 1988).

Los fibropapilomas resultantes de la infección por el BPV 1-2 que suelen localizarse en la cabeza y cuello del ganado bovino de menos de 2 años de edad por lo general al cabo de un año se produce la regresión espontánea de las lesiones. El papiloma causado por el BPV-3 tiende a persistir (Quinn *et al.*, 2002) incluso durante años (Rebhun *et al.*, 1995). En los casos de papilomatosis de la mucosa del tracto alimentario y de la vejiga, el pronóstico es reservado, ya que los papilomas avanzados pueden evolucionar a neoplasias de carácter maligno (Correa y Correa, 1992). El papiloma causado por el BPV-6 puede presentar difusión secundaria e incluso terciaria alrededor de los tumores primarios. En ocasiones, todo el ganado tiene que ser sacrificados si la papilomatosis no retrocede (Campo, 2006).

22. Tratamiento

Según Correa y Correa (1992), el papiloma puede despertar la inmunidad humoral y citomediada promoviendo por tanto la cura espontánea de la enfermedad. Sin embargo, esta respuesta suele ser tardía, llevando a mayores pérdidas económicas por la demora en la rehabilitación de los animales o incluso su muerte (da Silva *et al.*, 2007).

A pesar de la existencia en el mercado de innumerables tratamientos a disposición, la gran mayoría de ellos se ha evaluado insatisfactoriamente cuando es probada en el campo (da Silva *et al.*, 2004), presentando resultados contradictorios y deficientes y, en muchos casos, exigiendo una repetición del tratamiento por varias veces, en función de la falta de especificidad del tratamiento (Sturion *et al.*, 1997). Bezerra *et al.* (1994) mencionan que la evaluación del tratamiento contra la papilomatosis es relativa debido a que se trata de una enfermedad autolimitante y que puede variar con cada animal. Los innumerables tratamientos a disposición se pueden agrupar en: tratamientos empírico-científico, químico-corrosivo, homeopático, fitoterápicos, inmunoterápicos (Correa y Correa, 1992) y mágico-espirituales (Melo y Leite, 2003).

En el tratamiento empírico-científico, se realiza la ligadura del papiloma, amarrando la verruga pedunculada con crin de caballo o con hilo de seda, para causar gangrena seca y reabsorción del muñón (Correa y Correa, 1992).

Los tratamientos químico-corrosivos, como la cauterización con bastones de soda, ácido sulfúrico, tintura de yodo, soda cáustica, nitrato de plata y otros, pueden causar reabsorción del tejido rico en virus, y el animal que tiene madures inmunológica y buena inmunocompetencia viene a curarse secundariamente por el estímulo desencadenado (Correa y Correa, 1992). Sin embargo este tipo de tratamiento es de resultado inseguro debido a la problemática de la dosificación y pone en peligro al paciente y al personal (Dirkson *et al.*, 2005).

Entre los tratamientos homeopáticos y fitoterápicos, se usa la *Thuja occidentalis* y otros medicamentos irritantes como, por ejemplo, la *Euphorbia tirucallis*, conocida vulgarmente como “aveloz” o “mata verrugas”, que desencadenan los mismos fenómenos citados anteriormente. (Correa y Correa, 1992).

El uso de inmunoestimulantes pueden auxiliar cualquier opción de tratamiento, acelerando la regresión de las verrugas y evitando recidivas (Marins, 2004). Recientemente Borku *et al.* (2007) reporta una eficacia de 77.7% y 88.8% con una y dos dosis de ivermectina (0.2 mg/kg) respectivamente, aplicada subcutáneamente a bovinos entre 9 y 17 meses de edad con papilomatosis inducida naturalmente. Lassauzet y Salamin (1993), reportaron la ausencia de efecto del Interferón Recombinante Bovino Alpha₁ 1 en el tratamiento de verrugas bovinas experimentalmente inducidas. Por otro lado da Silva *et al.* (2007) evaluaron el efecto de etilenodinitrilo tetracetato de calcio y cobre y del lactobionato de cobre parenteral en papilomatosis bovina, no encontrando diferencia estadística significativa entre los grupos

tratados y el grupo testigo. Además Santin y Brito (2004) usando levamisol en el tratamiento de papilomatosis bovina, tampoco encontraron diferencia estadística significativa entre el grupo tratado y testigo.

Los tratamientos “mágico-espirituales” tales como: llamar a la solidaridad, bendecir a los animales, perforar sus orejas con fierro caliente, amarrar el cuello con una cuerda de cuero, pasar kerosene en la nuca del animal y colocar sal mineral en los papilomas, son frecuentemente observados en el campo (Correa y Correa, 1992). Estos tratamientos a veces funcionan, porque en los bovinos jóvenes el propio papiloma despierta la inmunidad humoral y celular y, consecuentemente, los papilomas desaparecen naturalmente. Generalmente se busca a los responsables de ese tipo de tratamiento cuando todo ya fue intentado, dando tiempo para que aquellas lesiones se autocuren (Melo y Leite, 2003).

Otros métodos propuestos como alternativa para el tratamiento de la papilomatosis bovina son:

22.1 Remoción quirúrgica y cauterización

La retirada de algunas verrugas puede estimular el sistema inmune humoral y provocar la caída de las otras formaciones semejantes (Melo y Leite, 2003). La cauterización es importante porque permite la reabsorción del tejido rico en virus y el animal que tiene madures inmunológica e inmunocompetencia viene a curarse secundariamente al estímulo desencadenado (Melo y Leite, 2003). Según Hama *et al.* (1988), la escisión de los papilomas seguida de la aplicación tópica de formalina al 10% dan buenos resultados en el tratamiento de tetas y ubres. Productos químicos corrosivos como ácido sulfúrico, nitrato de plata, bastones de soda y productos homeopáticos (tintura de Thuya) también han sido usados, muchas veces inadvertidamente, para la cauterización de las lesiones. (Melo y Leite, 2003).

En el caso de la papilomatosis peniana, el procedimiento más indicado es la remoción de los papilomas por acto quirúrgico, en cuanto, a la forma vulvogenital, se debe descartar inmediatamente a los enfermos (Correa y Correa, 1992). Foz Filho *et al.*, (2002) indican la remoción quirúrgica como una posibilidad segura de tratamiento en los papilomas de gran volumen.

22.2 Auto-hemoterapia

De acuerdo con Correa y Correa (1992), una auto-hemoterapia promueve un estímulo proteínico inespecífico. Los productos de degradación eritrocítica son conocidos por estimular la eritropoyesis y estimular el sistema inmune normal, permitiendo la manutención de la homeostasis. De acuerdo con Lobato y Birgel (2000) en el caso de la papilomatosis bovina, cuando el organismo animal absorbe la sangre venosa, el sistema inmune es activado y empieza a producir anticuerpos contra el papiloma, lo que lleva a la eliminación de la enfermedad.

El tratamiento consiste en la retirada de 10 a 40 ml. de sangre de la vena yugular o caudal, con o sin anticoagulante, para aplicarlo al mismo animal, por vía intramuscular o subcutánea. (Melo y Leite, 2003). Santin y Brito (2004) utilizando cuatro dosis de 20 ml. de sangre sin anticoagulante con un intervalo de una semana lograron una eficacia del 50%.

22.3 Clorobutanol

El Clorobutanol actúa probablemente en el metabolismo del virus causante de la papilomatosis impidiendo su crecimiento. Además el Clorobutanol es un potente antiséptico, así como anestésico local, con la ventaja de estar exentos de efectos secundarios (Biotong S.A.; 2009). La administración de esta sustancia puede causar irritación en la región administrada, además de la necesidad de repetirse la aplicación en los casos de grandes papilomas, conforme afirma Vianna, (1996). Los resultados de su aplicación son muy variables por ejemplo Silva *et al.* (2001), obtuvo una eficacia del 42% y Vianna (1967) una eficacia del 100%.

22.4 Vacunas autógenas y no autógenas

Dentro de los inmunoestimulantes, las vacunas autógenas o no autógenas son las más recomendadas, ya que poseen efecto curativo y preventivo, siendo por eso la medida de control más indicada (Eisa *et al.*, 2000). Sin embargo, las vacunas comerciales son mucho menos eficaces (Radostits *et al.*, 2002) ya que las vacunas existentes en el comercio pueden contener, o no, el tipo de ADN apropiado (Rebhun, 1995). El inconveniente de las vacunas autógenas consiste en que la cantidad de tejido que se necesita para producir una vacuna podría resultar difícil de obtener de las lesiones un tanto pequeñas en los pezones a no ser que se recojan docenas de verrugas (Rebhun, 1995). Aunque las vacunas autógenas de verrugas son a veces muy efectivas en el ganado, se han registrado fallas (Smith, 1990)

Ndarathi y Mbuthia (1994) comprobaron que la vacuna individuo-específica es mucho más eficaz que la especie-específica porque esta última es producida con una cepa productora de la enfermedad; y la especie-específica puede ser formada por una cepa diferente del virus que afecta al animal, no promoviendo, de esa forma, respuesta inmunológica contra el papiloma. La vacuna se prepara a partir de tejido verrugoso homogeneizado, que se filtra e inactiva con formol. Debido a la existencia de diferentes tipos de BPV, es preciso ser cuidadoso al seleccionar los tejidos. Por lo general pueden seleccionarse según tipo de tumor, localización y composición histológica. El estadio de desarrollo de la enfermedad también es importante, ya que los virus están presentes en mayor concentración en el tejido epitelial de las verrugas más antiguas que en las más recientes (Radostits *et al.*, 2002).

No hay una edad específica para la vacunación inicial, ni contraindicaciones y efectos colaterales posibles (Smith, 1990). La vacuna puede administrarse por vía subcutánea, pero se ha afirmado que los resultados son mejores tras la inyección intradérmica. Si los animales ya se infectan antes de vacunarlos con una cepa de campo de BPV, pueden enfermar de fibropapilomatosis pese a la vacunación. La aplicación repetida de vacuna curativa en animales afectados a lo sumo acorta el curso de la enfermedad en uno a dos meses (Dirkson *et al.*, 2005). Generalmente, se aplican cinco dosis (10ml cada dosis) de la vacuna a intervalos de 7 a 10 días. La mayoría de las veces, las verrugas fibrosas y arborescentes, comúnmente en los animales jóvenes, ceden a este tratamiento. Sin embargo, aquellos papilomas pediculares del pezón raramente responden favorablemente (Melo y Leite, 2003).

Según Radostits *et al.* (2002) se obtiene la curación en 3 a 6 semanas en el 80 a 85% de los casos cuando las verrugas están en la superficie del cuerpo o en el pene de los animales, pero solo en el 33% cuando están en los pezones. da Silva *et al.* (2004) reporta una eficacia del 50% no diferenciando entre verrugas en la superficie del cuerpo o en el pezón. Por otro lado, Marins (2004) reporta una eficacia del 100%. Las diferentes respuestas de un animal a otro en cuanto a regresión de la enfermedad tras la vacunación de un grupo de terneras con una vacuna preparada a partir de una sola ternera del grupo ha sido atribuido a la presencia de más de un tipo de BPV en el grupo (Radostits *et al.*, 2002).

22.5 Ungüento

Producto en forma de pasta cuya composición química esta compuesta por formol y una sustancia queratolítica asociada a otra necrotizante (Embrapa S.A., 2009) Este producto actúa matando el virus, evitando de esta forma nuevos casos de enfermedad en el rebaño, secando las

lesiones y permitiendo la total regeneración del tejido lesionado. Los resultados obtenidos en investigaciones muestran una eficiencia del 90% para papilomas en general y más del 50% para papilomas de pezones (Melo y Leite, 2003).

22.6 Vacuna atenuada del virus de la Enfermedad de Newcastle

El primer informe publicado en establecer un vínculo entre la infección de un virus y la regresión del cáncer apareció en 1912. Este informe describe a una mujer cuyo cáncer de cuello uterino mejoró después del tratamiento para prevenir la rabia. La mujer había sido mordido por un perro, y posteriormente fue inyectado con una vacuna atenuada del virus de la rabia. Durante los próximos 60 años, muchos otros virus han demostrado tener potencial anticanceroso (National Cancer Institute, 2009). Estos incluyen adenovirus, paperas, viruela, enterovirus bovino, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), reovirus, parvovirus, poxvirus y virus del herpes simple (Wildner, 2001). El efecto anticancerígeno del NDV fue reportado primeramente en 1965 y nuevamente en 1971 (Csatary y Bak'acs, 1999).

El NDV, un paramyxovirus aviar, tiene propiedades anti-neoplásicas y pleitrópicas inmunoestimuladoras (Wen-jun *et al.*, 2007; Schirmacher *et al.*, 2001). El NDV puede infectar y lisar directamente una variedad de células tumorales sin afectar de manera significativa a células normales (Wen-jun *et al.*, 2007; Wilder, 2001; Schirmacher *et al.*, 2000), activar macrófagos para realizar actividades antitumorales (Schirmacher *et al.*, 2000), inducir la producción del factor- α de necrosis tumoral (TNF- α) en células mononucleares el cual es un factor inmune que ataca y destruye células cancerígenas (Wilder, 2001; Csatary y Bak'acs, 1999; Csatary *et al.*, 1993), puede incrementar la sensibilidad de las células neoplásicas a los efectos citolíticos del TNF- α (las células infectadas por el NDV son más sensibles al efecto citolítico del TNF- α (Wilder, 2001).

Además, se ha demostrado que las células cancerígenas humanas infectadas con el NDV son más eficientes en la activación de células T (CD4, CD8 y NK) que las células no infectadas. La proteína hemaglutinina-neuraminidasa, presente en la membrana plasmática de las células infectadas, parece desempeñar un papel en la mayor activación de las células T. Así mismo otros estudios indican que las proteínas virales del NDV insertadas en la membrana plasmática de células cancerosas infectadas, puede ayudar al sistema inmunitario al mejor reconocimiento de los antígenos tumorales específicos, lo que podría dar lugar a la muerte de las células cancerosas infectadas y no infectadas por el virus (Schirmacher *et al.* 1999).

Liang *et al.* (2003), Csatory *et al.* (1999), Csatory y Bak'acs (1999), Csatory *et al.*, (1993) reportaron que el NDV desacelera o detiene la progresión tumoral en humanos con diferentes tipos de cáncer. Del mismo modo, Avki *et al.* (2004), utilizando la vacuna atenuada del NDV cepa La Sota (NDV-LS) en bovinos con papilomatosis cutánea, provocaron la regresión de los papilomas; las observaciones clínicas al día 60 mostraron una regresión completa y parcial de los papilomas en el 36% y en el 57% de los animales respectivamente.

23. Medidas Preventivas

Entre las medidas preventivas adoptadas, podemos citar: nunca comprar o aceptar animales con papilomatosis. Al constatar las verrugas, aislar los animales enfermos, iniciar el tratamiento lo más rápido posible, dar atención especial a los animales recién nacidos, persistir en el tratamiento hasta solucionar el problema y descartar gradualmente los animales que no responden a ningún tipo de tratamiento (Smith, 1990). Debe evitarse el empleo de utensilios comunes entre animales afectados y no afectados (Radostits *et al.*, 2002). Para la desinfección de herrameintas o el establo vacío se puede utilizar una solución diluida de potasa (sumergir, lavar) o solución de formaldehído (rociado) (Dirkson *et al.*, 2005). Controlar garrapatas (Correa y Correa, 1992) y moscas hematófagas (Vadillo *et al.*, 2002; Campo *et al.*, 1994) considerados posibles vectores mecánicos en la transmisión de la enfermedad.

Es de sentido común ordenar las vacas afectadas en último lugar, se debe evitar el uso de utensilios comunes durante el lavado de las ubres; antes del ordeño, las ubres se deben lavar y secar con toallas de papel individuales (Rebhun *et al.*, 1995); evitar el uso de ordeñadoras o hacer una rigurosa asepsia del equipamiento (Smith, 1990). La reducción al mínimo de los traumatismos de la piel de los pezones también puede reducir la incidencia. Esto se consigue principalmente mejorando la yacija, con una técnica adecuada de ordeño, y con un baño no irritante de los pezones (Rebhun *et al.*, 1995).

En rodeos muy afectados se recomienda la vacunación profiláctica de los terneros en recría con “autovacuna” del mismo establo preparada a partir del material tumoral fresco (Dirkson *et al.*, 2005). Sin embargo, la vacunación profiláctica confiere inmunidad a la epidermis, más no al tejido conjuntivo. De esta manera, pequeños papilomas pueden aparecer en el tejido subcutáneo, después de la infección en animales vacunados (Melo y Leite, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de estudio

El presente estudio fue realizado en el departamento de San Martín (Perú), ámbito del Proyecto Especial Alto Mayo, el cual se ubica en la zona del Alto Mayo, comprendiendo las provincias de Moyobamba y Rioja. El valle del Alto Mayo está situado en la parte Nor-oeste de la Región San Martín ubicada a 860 m.s.n.m. (INEI, 2008).

El clima de esta zona es sub-tropical, templado húmedo, la temperatura anual promedio es de 22°C, la humedad relativa de 85% y la precipitación anual oscila alrededor de 1.668 mm³. Las lluvias se registran con mayor intensidad en los meses de Enero, Febrero y Marzo. El periodo en el que se realizó el estudio comprendió desde el 17 de Junio al 30 de septiembre del 2008, coincidiendo con la época de seca (Junio - Octubre), donde la temperatura puede llegar hasta los 30°C (INEI, 2008).

Observaciones de campo demuestran que el valle del Alto Mayo es una zona con una alta prevalencia de papilomatosis bovina, en especial en el distrito de Moyabamba, Calzada, Habana, Soritor y Rioja (E. Palacios, Moyabamba, comunicación personal).

2. Tamaño de la muestra

Para hallar el tamaño de muestra se usó la fórmula para estimar una diferencia entre proporciones (Fleiss, 1980).

$$N = \left[\frac{z(a) + (b)}{p_1 - p_2} \right]^2 (p_1q_1 + p_2q_2)$$

Donde:

N = número mínimo de animales para cada grupo.

$Z_{(a)}$ = valor de Z al 95% de confianza.

$Z_{(b)}$ = valor de Z para una potencia de 80%.

p_1 = proporción para el grupo control

p_2 = proporción para el grupo tratamiento

Usando lo anterior descrito se obtuvo la cantidad de 30 animales por cada grupo. Sin embargo, debido a la disponibilidad de animales se decidió formar un grupo de 34 animales.

3. Animales

Un total de 64 bovinos hembras mestizas (Cebú x Europeo), con edades entre uno a seis años y con papilomatosis cutánea diagnosticada clínicamente fueron usadas en este estudio. Los ejemplares elegidos para el estudio fueron animales con aptitud lechera y con un mínimo de tres meses sin haber recibido algún tratamiento contra la papilomatosis. Los animales evaluados pertenecían a fundos ganaderos ubicados en los distritos de: Calzada, Habana, Soritor, Rioja y Yuracyacu.

Durante el estudio los animales de experimentación fueron mantenidos en sus respectivos fundos, sometidos al mismo manejo y alimentación que sus compañeras no seleccionadas. Los animales pastaban en pasturas naturales, el ordeño era a mano una vez al día con ternero al pie, se les suplementaba con pasto picado (una vez al día) y con la excepción de nueve animales (suplementados con sal mineral), a los restantes sólo se les suplementaba con sal común (una vez al día o una vez a la semana).

4. Materiales

Vacuna atenuada del NDV-LS (10^9 EID₅₀).

Jeringas estériles de 5ml.

Agujas estériles N° 21 x 1.

Guantes quirúrgicos.

Cooler.

Gel refrigerante.

Marcador de ganado.

Cámara digital KODAK de 7.5 mega píxeles.

Libreta de apuntes.

Mochila

5. Diseño experimental y protocolo de inoculación

Se formaron dos grupos experimentales, uno sería el tratado y el otro el control. En cada fundo se eligió al azar por cada animal tratado un animal control. Un total de 34 animales fueron inoculadas con un volumen de 2ml. (con una dosis total de 10^9 dosis₅₀ infectiva en huevo (EID₅₀) de la vacuna atenuada del NDV-LS (elaborado por el Dr. Edgar Vallenás Ochoa) dos veces con un intervalo de una semana. El protocolo fue determinado en base al trabajo de Avki *et al.* (2004). Se eligió una sola área del cuerpo del bovino (cabeza, cuello, escápula, ubre o pezones, que eran las zonas donde los papilomas aparecían mayormente) para la evaluación clínica e inyección subcutánea del biológico. Si la zona a evaluar eran los pezones la inyección se aplicó en la ubre. Con el objetivo de simular el estrés por el manejo de los animales al momento de la aplicación del biológico, otros 30 animales fueron inoculados con igual volumen de suero fisiológico siguiendo la misma metodología adoptada para el grupo tratado.

6. Observaciones clínicas

Los animales fueron evaluados clínicamente los días 0, 7, 30, 45 y 60 después de la primera inoculación. Se registraron los detalles clínicos de los papilomas como: número, forma e imagen fotográfica. Los detalles clínicos de los papilomas se registró sólo en la zona a evaluar (cabeza, cuello, escápula, ubre y pezones). La forma de los papilomas se clasificó como: plana y pedunculada. Con el objetivo de observar algún efecto secundario después de la aplicación del biológico, todos los animales tratados fueron monitoreados durante una semana después de la primera inoculación, básicamente se evaluó el comportamiento de los animales.

La respuesta al tratamiento fue evaluada del siguiente modo: respuesta excelente, con regresión de un mínimo de 85% en el número de papilomas; respuesta buena, con regresión entre 75% a 84% en el número de papilomas; respuesta regular, con regresión entre 65% a 74% en el número de papilomas; respuesta mala, con regresión inferior a 65% en el número de papilomas. El tratamiento fue considerado eficaz cuando la respuesta fue de excelente a buena e ineficaz cuando la respuesta fue de regular a mala (Santín y Brito., 2004).

7. Análisis de datos

Los resultados de campo fueron introducidos a una base de datos y analizados mediante el programa estadístico SPSS 11.1. Para determinar la significancia entre la diferencia de proporciones se utilizó la prueba de Chi-Cuadrado.

IV. RESULTADOS

El examen clínico indicó la presencia de animales con un solo tipo de papiloma (plano o pedunculado) y con los dos tipos de papiloma a la vez. La distribución de animales según el tipo de papiloma diagnosticado clínicamente se observa en el Cuadro 1. Los tipos de papilomas se pueden observar en las Fig. 4 y 5.

El tratamiento con la vacuna atenuada del NDV-LS produjo una respuesta excelente, buena, regular y mala en 2 (5.9%), 1 (2.9%), 1 (2.9%), 30 (88.2%) bovinos, respectivamente, de un total de 34 animales. Cuadro 2.

El tratamiento con la vacuna atenuada del NDV-LS fue eficaz en 3 (8.8%) animales de un total de 34. Éste resultado al ser enfrentados con el grupo control, mediante la prueba de Chi-cuadrado, no mostró diferencia significativas ($p = 0.096$) (Cuadro 3.)

No se observó ningún signo clínico colateral por efecto de la inoculación de la vacuna durante todo el tiempo que duró el estudio en los animales tratados.

Un total de 61 animales evaluados estaban infestados con garrapatas. Observándose que los animales con mayor grado de infestación por garrapatas también presentaban mayor número de papilomas. Dentro de un mismo fundo se pudo observar que los animales que no tenían papilomas tampoco tenían garrapatas (Fig. 6).

Cuadro 1. Distribución de animales según el tipo de papiloma diagnosticado clínicamente.

Tipo de papiloma	Frecuencia	Porcentaje
Plano	36	56.3
Pedunculado	23	35.9
ambos a la vez	5	7.8
Total	64	100.0%

Cuadro 2. Respuesta al tratamiento con la vacuna atenuada del NDV-LS contra la papilomatosis bovina.

Grupo	Respuesta al Tratamiento				Total
	Excelente	Buena	Regular	Mala	
Tratados	2	1	1	30	34
Control	0	0	1	29	30
Total	2	1	2	59	64

Cuadro 3. Eficacia del tratamiento con la vacuna atenuada del NDV-LS contra la papilomatosis bovina.

Grupo	Eficacia del tratamiento		Total
	Ineficaz	Eficaz	
Tratamiento	31	3	34
control	30	0	30
Total	61	3	64



Fig. 5. Papilomas pedunculados similares a la forma de “coliflor”

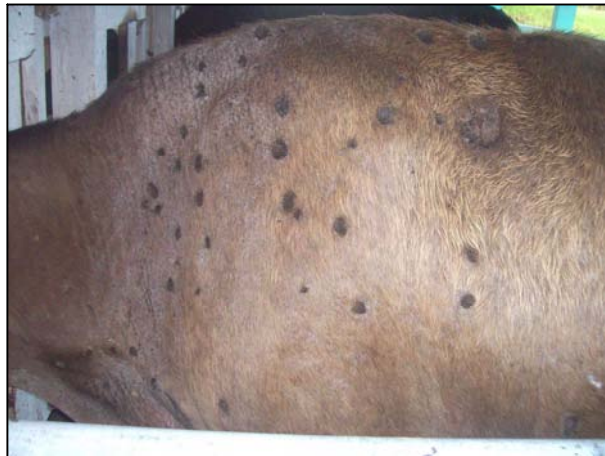


Fig. 6. Bovino presentando papilomas en la forma plana

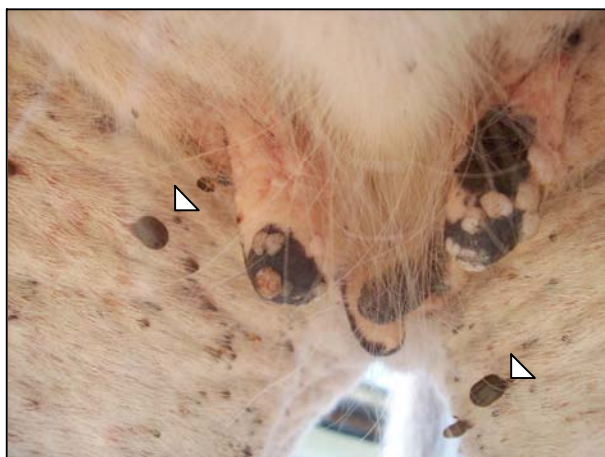


Fig. 7. Papilomas en pezones, próximos a garrapatas (punta de flecha)

V. DISCUSIÓN

La respuesta observada en los tres animales del grupo tratados puede ser un indicador de la respuesta del hospedador a la infección viral ya que según Correa y Correa (1992), el papiloma puede despertar la inmunidad humoral y citomediada promoviendo por tanto la cura espontánea de la enfermedad. Sin embargo, esta respuesta también puede haber sido el resultado de la actividad antitumoral del NDV-LS sobre el papiloma, ya que existen antecedentes de este efecto según la referencia de Avki *et al.* (2004), quien obtuvo una regresión total de papilomas en el 36% de los bovinos inoculados con este biológico. Sin embargo, no se observa diferencia estadística significativa en el porcentaje de animales en los que se apreció una regresión de papilomas evidente entre el grupo tratado y control, por lo que no se descarta que la respuesta observada en esos tres animales se deba a regresión espontánea.

El resultado antagónico entre la presente investigación y el de Avki *et al.* (2004), se puede haber dado por las diferentes condiciones de manejo y alimentación de los animales en cada estudio, ya que factores como estrés, nutrición, presencia de parásitos entre otros, pueden influir en la respuesta inmunológica del animal (Grandin, 1997, Tizard, 2002). El presente estudio probó este nuevo tratamiento en condiciones de campo, con normas de manejo estándar para la zona, mientras que en el estudio de Avki *et al.* (2004), los animales fueron alojadas individualmente en un área medioambientalmente controlada en sus granjas, alimentadas con heno y comida comercialmente paletizadas y agua a libitum.

Si bien la respuesta obtenida por Avki *et al.* (2004), en los valores de recuperación clínica sugieren que la inoculación de bovinos con la vacuna atenuada del NDV-LS podría ser una alternativa para una terapia no específica contra la papilomatosis bovina, estos resultados no son concluyentes debido a que en ese estudio no se encontró diferencia estadística significativa en los niveles del TNF- α entre los animales tratados y control (en el referido estudio se midió

los niveles del TNF- α antes y después de la inoculación del biológico, para evaluar la actividad inmunoestimulante del NDV-LS). Por lo tanto, la recuperación clínica que reporta (regresión completa de papilomas en el 36% de los bovinos) puede haber sucedido por regresión espontánea. En contraposición a esto, Santin y Brito (2004), reportan regresión espontánea de papilomatosis cutánea bovina en 2 (10%) animales de un total de 20, mientras que William *et al.* (1992) y Marins (2004) relatan no haber observado regresión espontánea en ningún animal utilizado en su estudio.

De otro lado y al igual que en nuestro estudio William *et al.*, (1992) también observó que todos los animales que presentaban papilomatosis eran concomitantemente infestados por garrapatas. Así mismo Correa y Correa (1992), afirma que la diseminación de la papilomatosis es mayor en lugares donde existen muchas garrapatas. En tal sentido, se sospecha que los insectos propagan o inoculan el virus en la piel (Rebhun *et al.*, 1995). Esto tiene que llamar la atención, si se parte de la premisa que *Boophilus microplus*, es la garrapata prevalente en nuestra Amazonia, y al ser una garrapata de un solo hospedero, su capacidad de infectar con el virus de la papilomatosis sería mínima de comprobarse su rol en la transmisión de esta enfermedad, quedando sólo la evidencia circunstancial del hallazgo, al igual que William *et al.* (1992).

Del mismo modo que en el estudio de Avki *et al.* (2004) en nuestro estudio los bovinos inoculados con la vacuna atenuada del NDV-LS no demostraron ninguna alteración clínica que podría ser atribuible a una infección por el NDV. Este resultado es corroborado por otros estudios en los que se usó el NDV en terneros por administración intranasal (Cakala *et al.*, 1992), en vacas por inyección en nódulos linfáticos de ubre (Kandfer- Szerszen *et al.*, 1995). También ha sido reportado que la administración intravenosa del NDV en humanos con cáncer fue segura y sin efectos secundarios tóxicos (Wilder, 2001; Csatory y Bak'acs, 1999). Del mismo modo Liang *et al.* (2003), administrando a 25 pacientes (con cancer colorectal, cancer estomacal entre otros) por vía subcutánea 2 a 6 tratamientos (un tratamiento: tres aplicaciones de 2ml del NDV-LS una vez cada tres días), algunos de ellos hasta con 8 tratamientos, no observaron efectos colaterales significativos. Unos pocos pacientes presentaron síntomas similares a la gripe como fatiga, fiebre leve, dolor articular los cuales desaparecieron en uno a dos días.

La ausencia de signos clínicos adversos en los bovinos tratados con la vacuna atenuada del NDV-LS, indicaría probablemente que el uso de este biológico al número y frecuencia de inoculaciones en el presente estudio es seguro. Por lo tanto, es posible realizar otros estudios

donde se pueda aumentar el número y reducir la frecuencia de inoculaciones. Liang *et al.* (2003), comparando la efectividad de un tratamiento (un tratamiento: tres aplicaciones de 2ml del NDV-LS una vez cada tres días) con dos tratamientos en 13 pacientes con cáncer colorectal reportaron que el efecto curativo del ultimo fue superior al primero.

VI. CONCLUSIÓN

La vacuna atenuada del virus de la enfermedad de Newcastle cepa La Sota, no fue eficaz en el tratamiento y control de la papilomatosis bovina en condiciones de crianza semi-extensiva de la zona del Alto Mayo (Región San Martín).

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar otros trabajos de investigación, empleando la vacuna atenuada del NDV-LS, considerando diferente número y frecuencia de inoculaciones.
- Seguir realizando investigaciones sobre terapia y control de la papilomatosis bovina, por ser un problema real en la Amazonia Peruana.

LITERATURA CITADA

- Araibi EH, Marchetti, GH, Asharafi, Campo MS. 2004. Downregulation of major histocompatibility complex class I in bovine papillomas. *Journal of General Virology* 85, 2809-2814.
- Avki S, Turutoglu H, Simsek A, Unsal A. 2004. Clinical and immunological effects of Newcastle disease virus vaccine on bovine papillomatosis. *Veterinary Immunology and immunopathology* 98, 9-16.
- Biotong S.A. [Internet], [12 marzo 2009]. Disponible en: <http://www.biotong.com.pe>
- Bezerra MJG, Soares PC, Bezerra R. 1994. Avaliacao da imunizacao contra papilomatose bovina com as vacinas atenuada e inativada. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 16(3): 98-1001.
- Bohl J, Hull B, Vande Pol, SB. 2001. Cooperative transformation and coexpression of bovine papillomavirus type 1 E5 and E7 proteins. *J. Virol.* 75, 513-521.
- Borku MK, Atalay O, Kibar M, CamY, Atasever A. Ivermectin is an effective treatment for bovine cutaneous papillomatosis. 2007. *Research in Veterinary Science* 83. 360-363.
- Bossart GD, Ewing RY, Lowe M, Sweat M, Decker SJ, Walsh CJ, Ghim sj, Jenson AB. 2002. viral papillomatosis in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *experimental and Molecular Pathology* 72:37-48.

- Cakala S, Kondracki M, Szuster A, Zdzisinska B, Kandefor-Szerszen M. 1992. The use of La Sota Newcastle disease vaccine as an interferon inducer in the prevention of bronchopneumonia in calves. *Tierärztliche Umschau* 47, 153-155.
- Campo MS, Moar MH, Laird H, Jarrett WF. 1981. Molecular heterogeneity and lesion site specificity of cutaneous bovine papillomaviruses. *Virology* 113: 323-35.
- Campo MS, Jarret WFH, O'Neil W, Barron RJ. 1994. Latent papillomavirus infection in cattle. *Research in Veterinary Science*. 56(2): 151-157.
- Campo MS. 1995. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends in Microbiology* 92 vol.3 No.3 March 1995.
- Campo MS. 1997. Bovine Papillomavirus and Cancer. *The Veterinary journal* 154,175-188.
- Campo MS. 1998. Persistent infection by bovine papillomavirus. In "Persistent Viral Infections" ed Rafi Ahmed, (John Wiley and Sons, ed), pp503-516.
- Campo MS. 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research* 89 (2002) 249-261.
- Campo MS. 2003. Papillomavirus and disease in humans and animals. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1, 1, 3-14.
- Campo M.S. 2006. *Bovine papillomavirus: old system, new lessons?* In: Campo, M.S. ed. *Papillomavirus Research: From natural history to vaccine and beyond*. Chap 23. First published in Wymondham, England: Caister Academic Press. [Internet], [12 febrero 2009]. Disponible en: <http://eprints.gla.ac.uk>
- Carvalho C, Stocco dos Santos RC. 2000. Estudos integrados sobre a transmissao horizontal e vertical da papilomatose entre bovinos e entre bovino e suinos, em propiedades de diversas regiones do Brasil. Tese (Medicina Veterinaria) Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo, 70 p.

- Carvalho C, Freitas AC, Brunner O, Yagui A, Becak W, Stocco dos Santos RC. 2003a. Detection of bovine papillomavirus DNA sequences in bovine gametes and reproductive tract. In: XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis. Journal of the Brazilian Society for Virology, 8 (1):166.

- Carvalho C, Freitas AC, Brunner O, Goes LGB, Cavalcance AY, Becak W, Stocco dos Santos rc. 2003b. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. Brazilian Journal of Microbiology 34 (Suppl.1):82-84.

- Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I, Czeglédi F, Fenyvesi C, Gergely P, Bodey B, Csatory CM. 1993. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. Cancer Detect. Prev. 17. 619-627.

- Csatory LK, Moss RW, Beuth J, Torocsik B, Szeberenyi J, Bakacs T. 1999. Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-668/H). Anticancer Res. 19, 635-638.

- Csatory LK, Bak'acs T. 1999. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. JAMA 281. 1588-1589.

- Corrêa WM, Corrêa CNM. 1992. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 843p.

- da Silva LAF, Verissimo ACC, Filho PRLV, Fioravanti MCS, Eurides D, Linhares GCF, Romani AF, Trindade BR. 2004. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguaiana, v.11, n. 1, p. 61-76.

- da Silva LAF. Sousa VR. Silva MAM. Franco LG. Fioravanti MCS. Rabelo RE. Moura MI. Soares lk, Cunha PHJ. 2007. Efecto del etilenodinitrilo tetracetato de calcio y cobre y del lactobionato de cobre parenteral en el tratamiento de la papilomatosis cutánea bovina. Téc Pecu Méx 2007; 45(3): 289-297.

- Day PM, Schiller JT. 2006. Early events in the papillomaviral life cycle in: Campo MS, ed. Papillomavirus Research: Natural History to Vaccines and Beyond. Norfolk, England: Caister Academic Press, 175-92.

- de Villers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Zur-Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27.

- Desrochers A, St-Jean G, Kennedy GA, 1994. Congenital cutaneous papillomatosis in a one-year-old Holstein. *Can Veterinary Journal*, 35 (10): 646-647.

- Dirkson G, Grunder H-D, Stober M. 2005. *Medicina Interna y Cirugia del Bovino*. 4ta ed. Vol 1. Editorial Intermédica. Argentina. 632p.

- Eisa MI, Kandeel A, El-Sawalhy AA, Abouel-Fetouh MS. 2000. Some studies on bovine papilloma virus infection in cattle with trials of its treatment. *Veterinary Medicine Journal Giza*. 48 (1):47-55.

- Embrapa S.A. [Internet], [12 marzo 2009]. Disponible en: <http://www.embrapa.br>

- Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. 1992. *Virologia Veterinaria*. Zaragoza: Acribia. 691 p.

- Freitas AC, Brunner O, Becak W, Stocco dos Santos RC. 2003a. Análisis of BPV DNA sequences in peripheral blood of bovines affected by cutaneous papillomatosis: evidences of virus localization inside blood cell. In: XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis. *Journal of the Brazilian Society for Virology*, 8 (1): 167.

- Freitas AC, Carvalho C. Brunner O, Birgel-Junior EH, Dellalibera AMMP, Benesi FJ, Gregory I, Becak W, Stocco dos Santos RC. 2003b. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the viruses: a discussion about BPV-1. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (Suppl.1):76-78.

- Freitas AC, Silva MAR. Carvalho CCR. Birgel-Jr. EH. dos Santos JF. Becak W. Stocco dos Santos RC. 2007. Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A*. Méndez-Vilas (Ed.): 697-704.

- Foz Filho RPP, Lucas R, Maiorka PC, Yoshino ML. 2002. Retirada cirurgica de fibropapiloma equino por meio de criocirurgia. In: V Congresso Brasileiro de Medicina e

Anestesiologia veterinaria. Rio de Janeiro: Revista Brasileira de Ciências Veterinárias. 9 (1): 282-283.

- Grandin T. 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci.* 75: 249-257.
- Hama C, Matsumoto T, Franceschini PH, 1988. Papilomatose bovina: avaliação clínica de diferentes produtos utilizados no controle e tratamento. *Ciência Veterinária, Jaboticabal*, v.2, n.2, p.14.
- Hatama S, Nobumoto K, Kanno T. 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology.* 158-63
- Haas C, Ertel C, Gerhards R, *et al.*, 1998. Introduction of adhesive and costimulatory immune functions into tumor cells by infection with Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol* 13 (6): 1105-15.
- Howley PM, Lowy DR. 2001. Papillomaviruses and their replication. In P.M. Howley (ed.): *virology*, vol. 2. Philadelphia, PA: Lippincott/The Williams & Wilkins Co, pp. 2197–2229.
- IARC 2007. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 90, Human Papillomaviruses. Lyon, France p: 412-432.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. 2008. Lima. [Internet], [20 noviembre 2008]. Disponible en <http://www.inei.gob.pe/>
- Jarrett WF, Campo MS, O'Neil BW, Laird HM, Coggins LW. 1984. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. *Virology* 136: 255-64.
- Jones TC, Hunt RD, King NW 2000. *Patologia Veterinaria*. 6 ed. Sao Paulo: Manole, 1415p.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. 1992. *Patología de los animales domésticos*. 3ª ed. Vol 3. Uruguay: Agropecuaria Hemisferio Sur. 571p.

- Kandefer-Szerszen M, Szuster-Ciesielska A, Zdzisinska B, Kominska T, Kondracki M. 1995. In Vitro and in vivo interferon production by bovine colostrum leukocytes. *Deum. Tierarztl. Woch.* 102, 190-192.
- Kobashi LS, Freitas AC, Palmieri DA, Becak W, Lopes CR, Stocco dos Santos RC. 2003. BPV 1-2 and 4 co-infection in bovine warts: unusual detection of BPV 4. In. XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis. *Journal of the Brazilian Society for Virology*, 8 (1): 166-167.
- Lassauzet ML, Salamin PA. 1993. Ausencia de efecto del Interferon Recombinante Bovino alfa₁ 1 en el tratamiento de Verrugas Bovinas Inducidas experimentalmente. *Can J Vet Res* 57: 166-169.
- Lee C, Laimins LA. 2007. The Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomaviruses in Keratinocytes. En: Garcea RL, DiMaio D, eds. *The Papillomaviruses*. [Internet], [12 febrero 2009]. Disponible en: <http://labibliotecademaverick.blogspot.com>.
- Liang W, Wang H, Sun T-H, Yao W-Q, Chen L-L, Jin Y, Li C-L, Meng F-J. 2003. Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract. *World Journal Gastroenterology*, 9(3): 495-498.
- Literak I, Tomita Y, Ogawa T, Shirasawa H, Smid B, Novotny L, Adamec M. 2006. papillomatosis in a European Bison. *Journal of Wildlife Diseases*. 42(1), pp. 149-153.
- Lobato Z, Birgel JRE. 2000. Verrugas atrapalham a produção. *Produtor Parmalat*, n. 37, p. 36-39, mar.
- Marins, RSQQ. 2004. Epidemiologia da papilomatose cutanea bovina e avaliacao da eficacia de diferentes tratamentos em micro-regiones dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Tese de Mestre em Productio Animal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 106 p.
- Mayr A, Guerreiro MG. 1988. *Virologia Veterinaria*. 3 ed. Porto Alegre. Editora Sulina. 476p.
- Mbutia GP, Ngatia TA, Wamokoya JPO. 1993. Occurrence of bovine skin diseases in Kenya. *bulletin of Animal Production in Africa*. Mugaga-Kikuyu. v. 41, p.311-316.

- Melo CB, Leite RC. 2003. Papilomatose Bovina. *Cienc. vet. trop.*, Recife-PE, v.6,n.1,p1-12-janeiro/abril.

- Modis Y, Trus BL, Harrison SC. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* Vol. 21 No. 18 pp. 4754-4762.

- Murphy FA, Gibbs PJ, Horzinek MC, Studdert MJ, 1999. *Veterinary Virology*. 3 ed. Academic Press. 629p.

- Ndarathi CM, Mbuthia PG. 1994. Individual bovine-specific and species-specific autogenous vaccine in treatment of bovine cutaneous papillomatosis. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 64, n. 3, p. 218-221.

- Nasir L. Campo MS. 2008. Papilomavirus Bovino: Su rol en la etiología de tumores cutáneos de bovinos y equinos. *The Autores. Journal compilation*. 19;243-254.

- National Cancer Institute (NRC), [Internet], [12 marzo 2009]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/NDV/HealthProfesional>

- O'Brien V, Ashrafi GH, Grindlay GJ, Anderson RA, Campo MS. 1999. A mutational analysis of the transforming functions of the E5 protein of bovine papillomavirus type 4. *Virology* 254, 385-394.

- O'Brien PM, Campo MS. 2002. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* 88 103-117.

- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I, Shirasawa H. 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *Virology* 85, 2191-2197.

- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, de Villiers E-M, Shirasawa H. 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *Journal of General Virology*. 88: 1934-8.

- Peh, WL, Meddleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, Brandsma J, Percival A, Lewis J, Liu WJ, Doorbar J. 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of human papilloma-virus associated disease. *Journal of Virology* 76: 10401-1041.
- Potel K. 1974. *Tratado de Anatomía Patológica General Veterinaria*. 1^{ra} ed. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
- Quinn PJ, Merker BK. 2002. *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*. 1ra ed. Editorial Acribia. Zaragoza-España. 667p.
- Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9 ed. vol. 2. España: McGraw-Hill interoamericana S.A. 1006p.
- Rebhun WC. 1995. *Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero*. 1ra. ed. Editorial Acribia. Zaragoza-España. 666p.
- Reichard KW, Lorente RM, Cascino CJ, Peeples ME, Walter RJ, Fernando MB, Reyes HM, Greager JA. 1992. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J. Surg. Res.* 52, 448-453.
- Romanos MTV, Santos MSO, Miranda MMF 2002. *Introducao a virologia humana*. 2002. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.199-219.
- Rosenberger, G. 1989. *Enfermidades de los bovinos*. 1^{ra} ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, v.1,
- Santin API, 2001. *Estudo da papilomatose cutanea em bovinos leiteiros: comparacao de diferentes tratamentos e caracterizacao anatomopatologica*. Tese de Mestre em Medicina veterinaria. Universidade Federal de Goias. 147p.
- Santin API, Brito LAB. 2003. *Caracterizacao anatomopatológica da papilomatose cutanea em bovinos leiteiros*. In: XI Encontro Nacional de patologia veterinaria. Sao Paulo, p.220.
- Santin API, Brito LAB. 2004. *Estudio de la papilomatosis cutánea en bovinos lecheros: Comparación de diferentes tratamientos*. *Ciencia Animal Barasileira* v.5, n.1,p.39-45,ene-mar.

- Schirmmacher V, Griesbach A, Ahlert T. 2001. Antitumor effects of Newcastle disease virus in vivo: local versus systemic effects. *Int. J. Oncol.* 18. 945-952.

- Schirmmacher V, Bai L, Umansky V, Yu L, Xing Y, Qian Z. 2000. Newcastle disease virus activates macrophages for antitumor activity. *Int. J. Oncol.* 16. 363-373.

- Schirmmacher V, Jurianz K, Roth C, *et al.* 1999. Tumor stimulator cell modification by infection with Newcastle Disease Virus: analysis of effects and mechanism in MLTC-CML cultures. *Int J Oncol* 14 (2): 205-15.

- Silva LAF, Santin API, Fioravanti MCS, Dias Filho FC, Eurides D. 2001. Papilomatose bovina: comparação e avaliação de diferentes tratamentos. *Hora Veterinária*, n. 121, p: 55-60.

- Smith BP. 1990. Moléstias virais. Smith BP. (ed) In: *Tratado de medicina interna de grandes animais*. v.2, Sao Paulo: Manole, p:1260-1262.

- Sironi G, Canaiatti M, Scanziani E. 1990. Immunohistochemical detection of papillomavirus structural antigens in animal hyperplastic and neoplastic apithelial lesions. *Journal Veterinary Medicine*, 37(10): 760-761.

- Somvanshi R. Sharma B. Koul GL. Biswas JC. Yadav MP. 1988. The delayed cutaneous hypersensitivity and humoral immune response in spontaneous bovine papilomas. *Indian Medicine Veterinary Journal*. 12: 7-14.

- Srivastava A K, Sharma DN, Dwivedi JN. 1991. Oral papiloma in a calf. *Indian Veterinary Journal*, Chennai, v. 68, p.10.

- Stenlund A. 2007. DNA Replication of Papillomaviruses. En: Garcea RL, DiMaio D, eds. *The Papillomaviruses*. [Internet], [12 febrero 2009]. Disponible en: <http://labibliotecademaverick.blogspot.com>

- Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz OP, Pinto JR, Mirandola, RS, Benesi FJ, Birgel EH, pereira CAB, Becak W. 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *Journal of General Virology*, 79:2127-2135.

- Streeck RE, Selinka H-C, Sapp M. 2007. Viral Entry and Receptors. En: Garcea RL, DiMaio D, eds. The Papillomaviruses. [Internet], [12 febrero 2009]. Disponible en: <http://labibliotecademaverick.blogspot.com>
- Sturion DJ, Pardo EP, Tanaka NM. 1997. Tratamento da papilomatose bovina com implante axilar. *Animar Ciencias*. 6(2): 51-58.
- Tizard IR. 2002 *Inmunología Veterinaria*. Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana. México DF. 516p.
- Tomita Y, Literak I, Jin Z, Shirasawa H. 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant variant type from a European bison. *Virus Genes*. 35: 243-9.
- Vadillo S, Piriz S, Mateos EM. 2002. *Manual de microbiología veterinaria*. 1ra. edición. McGraw-Hill Interoamericana de España: 853p.
- Veiga VMO, Paiva MAV, Junqueira MM, Carvalho WEG, Reis ES. 2000. Avaliacao de tratamento quimico da papilomatose cutanea bovina. *Revista Brasileira de Medicina veterinaria*. 22(2): 74-77.
- Vianna CHM. 1967. *Contribuição ao tratamento da papilomatose bovina*. Curitiba, 1967. 12p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Vianna CH. 1996. *Contribuicao ao tratamento da papilomatose bovina*. *Revista do Conselho federal de Medicina Veterinaria*. ano 2(6).
- Wen-jun J, Yang W, Rui H, Wen-xiu Y, Xiao-lan T, Qi-ming L. 2007. The modification effect of Newcastle Disease Virus Lasota on Human Tumor Cells in vitro. *Cancer Research On Prevention and Treatment*, 34, 4, 281-283.
- Wildner O. 2001. Oncolytic viruses as therapeutic agents. *Ann. Med.* 33, 291-304.
- William BJ, Kirubaharan J, Uthuman M, Kumanan K, Balachandran S. 1992. Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis. *Indian Veterinary Journal*, 69: 842-844.

- Wittmann, W. 1999. Doencas infecciosas em Animais Domesticos. Sao Paulo: Roca, p. 256-261.
- Wosiacki SR, Claus MP, Barreiros MAB, Alfieri AF, Alfieri AA. 2003. Detection of bovine papillomavirus type 2 by Nested PCR in bovine lymphocytes. In: XIV Encontro Nacional de virologia. Florianopolis. Journal of the Brazilian Society for Virology. 8(1): 164.
- Yeruham I, Perl S, Yakobson B. 1993. Skin tumors in cattle following tattooing by liquid nitrogen. Israel Journal of Veterinary Medicine, Raanana, v.48, p.38-40.