



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA EN CINCO PROPIEDADES DE  
GANADERÍA DE LECHE, EN EL CANTÓN PEDRO VICENTE MALDONADO  
EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos  
para optar por el título de

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

Profesor Guía

DR. CARLOS PAZ ZURITA

Autores

JUAN VÍCTOR CHARRY DÁVALOS

MARÍA BERNARDA HINOJOSA LÓPEZ

Año

2011

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido, y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Dr. Carlos Paz Zurita

Médico Veterinario y Zootecnista

C.I:170253174-8

### **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Hinojosa López Ma. Bernarda  
171353556-3

Charry Dávalos Juan Víctor  
171220318-9

## **AGRADECIMIENTO**

Quisiéramos agradecer a nuestro director de tesis, Dr. Carlos Paz Zurita y a otros doctores que nos ayudaron a lo largo de todo el proceso de la investigación, Dr. Carlos Fierro y Dr. Joar García. También quisiéramos agradecer la apertura que tuvieron los propietarios de las haciendas estudiadas, y la ayuda de todo el personal que trabaja en ellas.

## RESUMEN

La papilomatosis bovina es una enfermedad viral especie específica causada por más de 10 tipos de Papilomavirus bovino (BPV), que provocan lesiones en distintas zonas anatómicas del cuerpo del animal. El virus puede ingresar al organismo a través de cortes o laceraciones en la piel, por contacto con animales e instrumentos infectados, aunque recientemente se ha encontrado ADN viral en distintos fluidos corporales, incluyendo sangre; y en otros órganos y células como útero, oocitos y espermatozoides. Los animales más afectados son los bovinos jóvenes, menores a los 2 años de edad, pero todos los animales son susceptibles a la infección. Dependiendo del tipo de virus se provocan lesiones de distinta conformación y tamaño. Además, que en algunos casos, las lesiones papilomatosis pueden sufrir una transformación maligna, y convertirse en neoplasias y posteriormente en carcinoma. Las pérdidas económicas por papilomatosis no son muy significativas. En el Ecuador no existen estudios acerca de la enfermedad, y no se conocen datos de prevalencia, incidencia y como afecta la enfermedad a los productores. El presente estudio tiene por objetivo conocer un poco mejor como afecta la papilomatosis a la ganadería lechera en el cantón Pedro Vicente Maldonado, en la provincia de Pichincha. Se muestrearon 36 animales con manifestaciones clínicas de papilomatosis y se realizaron análisis sanguíneos de hemograma, conteo diferencial, proteínas totales, albumina y globulinas; y se llevó a cabo el estudio histopatológico de algunas lesiones. Se analizó la influencia del manejo y el clima en la presentación de la enfermedad. Los resultados mostraron linfocitosis y monocitosis, relacionados con una infección crónica de papilomatosis; y la presencia de células inmaduras, incluyendo neutrófilos banda, mielocitos y granulocitos juveniles, fue relacionada con una probable presencia de neoplasias asociadas al problema de la papilomatosis; que coincide con el resultado histopatológico. El clima ejerce un papel importante en la presentación de la enfermedad, principalmente en razas *Bos taurus*

## ABSTRACT

The bovine papillomatosis is a viral disease, specie-specific, caused by more than 10 types of Bovine Papillomavirus (BPV). These viruses cause injuries in different anatomic areas in the animal body. The virus enters into the organism through cuts and lacerations in the skin, through direct contact between animals, and through infected instruments. Recently, viral DNA has been found into different body fluids, including blood; and in other organs and cells, such as uterus, oocytes, and sperm. The most susceptible animals are the calves, and animals under 2 years old; but all the animals, at any age, can be infected. The size and structure of the lesions depend on the type of virus that infects the animal. In some cases, the warts can progress to malignant transformation, and can develop into neoplastic lesions, and eventually into carcinoma. The economic losses caused by papillomatosis are not very important. In Ecuador, there are not any studies about the disease, and there is no data about prevalence, incidence and influence of the papillomatosis in milk production. The objective of this study is to know how the papillomatosis affects the Dairy Cattle in Pedro Vicente Maldonado. 36 animals with clinical lesions of papillomatosis were sampled, and these samplings were submitted to biometric, protein and histopathological analysis. The influence of the environment and the animal handling were also evaluated. The results showed lymphocytosis and monocytosis, related with chronical papillomatosis. The presence of immature white cells is related with neoplastic lesions caused by the virus and matches the histopathological result. The weather plays an important role in the development of the disease especially in *Bos Taurus* breeds.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>CAPÍTULO 1 .....</b>                                      | <b>4</b>  |
| <b>1.1.- ESTRUCTURA VIRAL .....</b>                          | <b>4</b>  |
| <b>1.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VIRUS .....</b>          | <b>6</b>  |
| 1.2.1.- Ácidos nucleicos .....                               | 6         |
| 1.2.2.- Proteínas .....                                      | 6         |
| 1.2.3.- Lípidos.....   | 7         |
| 1.2.4.- Carbohidratos.....                                   | 7         |
| <b>1.3.- REPLICACIÓN VIRAL .....</b>                         | <b>8</b>  |
| 1.3.1.- Acercamiento.....                                    | 8         |
| 1.3.2.- Adsorción.....                                       | 8         |
| 1.3.3.- Entrada del virión .....                             | 8         |
| 1.3.4.- Denudamiento .....                                   | 9         |
| 1.3.5.- Transcripción.....                                   | 9         |
| 1.3.6.- Traslación .....                                     | 9         |
| 1.3.7.- Replicación del genoma .....                         | 10        |
| 1.3.8.- Síntesis proteica tardía .....                       | 10        |
| 1.3.9.- Ensamblaje .....                                     | 10        |
| 1.3.10.- Liberación .....                                    | 10        |
| <b>CAPÍTULO 2 .....</b>                                      | <b>11</b> |
| <b>2.1.- GENERALIDADES DE LA PAPILOMATOSIS.....</b>          | <b>11</b> |
| <b>2.2.- HISTORIA Y AVANCES EN EL ESTUDIO DEL VIRUS.....</b> | <b>13</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.3.- FILOGENIA Y TAXONOMÍA DE LOS PAPILOMAVIRUS .....</b>                | <b>17</b> |
| 2.3.1.- Géneros en la taxonomía del papilomavirus .....                      | 18        |
| 2.3.2.- Especies y tipos de Papilomavirus.....                               | 19        |
| 2.3.3.- Subtipos de PV .....   | 20        |
| 2.3.4.- Variantes de PV .....  | 21        |
| 2.3.5.- Investigaciones sobre los tipos virales y evolución de los PV        | 22        |
| <b>CAPÍTULO 3 .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>3.1.- CICLO DE VIDA DEL VIRUS .....</b>                                   | <b>23</b> |
| 3.1.1.- Organización genética y expresión de genes de los PVs.....           | 25        |
| <b>3.2.- TRANSCRIPCIÓN DEL HPV .....</b>                                     | <b>28</b> |
| 3.2.1.- Organización del nucleosoma y regulación de la cromatina ...         | 30        |
| <b>CAPITULO 4 .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4.1.- REPLICACIÓN VIRAL .....</b>   | <b>31</b> |
| 4.1.1.- Mecanismos y regulación de la replicación del ADN de los<br>PVs..... | 32        |
| 4.1.2.- Proteínas que regulan la replicación del ADN de los PVs .....        | 34        |
| <b>CAPÍTULO 5 .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>5.1.- PROTEÍNAS VIRALES DE REPLICACIÓN Y<br/>TRANSCRIPCIÓN.....</b>       | <b>36</b> |
| 5.1.1.- Proteína E1.....   | 36        |
| 5.1.2.- Proteína E2.....   | 36        |
| 5.1.3.- Proteína E4.....   | 39        |
| 5.1.4.- Proteína E5.....   | 41        |
| 5.1.5.- Proteína E6.....   | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.1.6.- Proteína E7.....  | 42        |
| 5.1.7.- Proteína L1.....  | 42        |
| 5.1.8.- Proteína L2.....  | 43        |
| <b>5.2.- RESPUESTA SEROLÓGICA.....</b>                          | <b>44</b> |
| 5.2.1.- Respuesta Inmune a los PV.....                          | 44        |
| 5.2.2.- Patogenicidad vs. Latencia .....                        | 45        |
| <b>CAPÍTULO 6 .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>6.1.- PAPILOMAVIRUS BOVINO.....</b>                          | <b>47</b> |
| 6.1.1.- Heterogeneidad del BPV.....                             | 47        |
| 6.1.2.- Virión, genoma y transcripción.....                     | 48        |
| 6.1.3.- Transcripción viral .....                               | 49        |
| 6.1.4.- Proteínas BPV en Papilomas y células transformadas..... | 50        |
| <b>CAPÍTULO 7 .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>7.1.- GENERALIDADES DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA .....</b>     | <b>53</b> |
| <b>7.2.- ETIOLOGÍA.....</b>                                     | <b>53</b> |
| <b>7.3.- EPIDEMIOLOGÍA.....</b>                                 | <b>54</b> |
| <b>7.4.- FACTORES DE RIESGO .....</b>                           | <b>57</b> |
| 7.4.1.- Factores animales .....                                 | 57        |
| 7.4.2.- Edad .....  | 58        |
| 7.4.3.- Parásitos .....   | 58        |
| 7.4.4.-Factores inmunosupresores .....                          | 59        |
| <b>7.5.- PATOGENIA .....</b>                                    | <b>59</b> |
| <b>7.6.- PRESENTACIÓN CLÍNICA.....</b>                          | <b>60</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 7.7.- PATOLOGÍA CLÍNICA.....  | 63        |
| 7.8.- DIAGNÓSTICO .....   | 64        |
| 7.9.- TRATAMIENTO .....   | 65        |
| 7.10.- CONTROL.....   | 65        |
| 7.11.- CÁNCER Y PAPILOMATOSIS.....  | 65        |
| <b>CAPÍTULO 8 .....</b>   | <b>70</b> |
| 8.1.- TÉCNICAS NO MOLECULARES DE DETECCIÓN DEL VIRUS .....                                | 70        |
| 8.1.1.- Citología e Histología.....   | 70        |
| 8.1.2.- Histología.....   | 70        |
| 8.2.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES EN TEJIDOS INFECTADOS .....                          | 73        |
| 8.3.- DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....   | 74        |
| 8.3.1.- Métodos basados en PCR .....  | 74        |
| 8.3.2.- Métodos de hibridación de ácidos nucleicos (Hybrid Capture 2 <sup>TM</sup> )..... | 74        |
| 8.3.3.- Hibridación southern and northern blot.....                                       | 75        |
| 8.3.4.- Hibridación in situ .....   | 75        |
| 8.4.1.- Detección de anticuerpos de la cápside .....                                      | 76        |
| 8.4.2.- Neutralización.....   | 76        |
| 8.4.3.- Detección de anticuerpos contra E2, E4, E6 y E7 .....                             | 76        |
| 8.5.- CULTIVOS ORGANOTÍPICOS Y XENOINJERTOS .....   | 77        |
| 8.6.- IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO TIPO DE BPV.....   | 78        |
| <b>CAPÍTULO 9 .....</b>   | <b>79</b> |
| 9.1.- TRATAMIENTO DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA.....   | 79        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>9.2.- VACUNAS PARA BPV .....</b>              | <b>79</b> |
| 9.2.1.- Autovacuna.....                          | 80        |
| 9.2.2.- Vacunación profiláctica .....            | 81        |
| 9.2.3.- Vacunación terapéutica .....             | 82        |
| <b>9.3.- MHC- I y E5.....</b>                    | <b>82</b> |
| <b>9.4.- OTROS TRATAMIENTOS.....</b>             | <b>82</b> |
| <b>CAPÍTULO 10 .....</b>                         | <b>84</b> |
| 10.1.- IMPORTANCIA DE LA PAPILOMATOSIS .....     | 84        |
| 10.2.- IMPORTANCIA ECONÓMICA .....               | 85        |
| <b>CAPÍTULO 11: METODOLOGÍA.....</b>             | <b>86</b> |
| 11.1.- SELECCIÓN DE LAS HACIENDAS.....           | 86        |
| 11.2.- VISITA A LAS HACIENDAS .....              | 86        |
| 11.3.- TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....          | 87        |
| 11.4.- TOMA DE MUESTRAS DE PAPILOMAS .....       | 87        |
| 11.5.- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS ..... | 88        |
| 11.6.- ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....            | 89        |
| <b>CAPÍTULO 12: RESULTADOS .....</b>             | <b>90</b> |
| 12.1.- MANEJO .....                              | 90        |
| 12.1.1.- Hacienda “El Porvenir” .....            | 90        |
| 12.1.2.- Hacienda “Cochamora” .....              | 92        |
| 12.1.3.- Hacienda “Bernabé” .....                | 95        |
| 12.1.4.- Hacienda Solánica.....                  | 96        |
| 12.1.5.- Propiedad N° 5.....                     | 98        |
| 12.2.- HEMOGRAMA Y QUÍMICA SANGUÍNEA .....       | 99        |
| 12.2.1.- Hacienda “Cochamora” .....              | 100       |

|   |            |
|---|------------|
| 12.2.2.- Hacienda “El Porvenir” .....                   | 100        |
| 12.2.3.- Hacienda “Bernabé” .....                       | 101        |
| 12.2.4.- Hacienda “Solánica” .....                      | 101        |
| 12.2.5.- Propiedad N°5 .....                            | 102        |
| <b>12.3.- HISTOPATOLOGÍA .....</b>                      | <b>103</b> |
| <b>CAPÍTULO 13: DISCUSIÓN .....</b>                     | <b>104</b> |
| <b>13.1.- MANEJO DE LAS HACIENDAS .....</b>             | <b>104</b> |
| 13.1.1.- Hacienda “El Porvenir” .....                   | 104        |
| 13.1.2. Hacienda “Cochamora” .....                      | 107        |
| 13.1.3.- Hacienda “Bernabé” .....                       | 110        |
| 13.1.4.- Hacienda Solánica.....                         | 112        |
| 13.1.5.- Propiedad N° 5.....                            | 113        |
| <b>13.2.- ANÁLISIS DEL HEMOGRAMA Y PROTEINAS .....</b>  | <b>114</b> |
| <b>13.3.- EFECTOS DEL CLIMA SOBRE LOS BOVINOS .....</b> | <b>119</b> |
| <b>CAPÍTULO 14 .....</b>                                | <b>124</b> |
| <b>14.1.- CONCLUSIONES.....</b>                         | <b>124</b> |
| <b>CAPÍTULO 15 .....</b>                                | <b>130</b> |
| <b>15.1.- RECOMENDACIONES.....</b>                      | <b>130</b> |
| <b>REFERENCIAS.....</b>                                 | <b>132</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                     | <b>136</b> |

## INTRODUCCIÓN

La papilomatosis es una enfermedad causada por un virus ADN de la familia *Papillomaviridae*, que afecta a varias especies animales provocando el desarrollo de lesiones a nivel cutáneo, conocidas comúnmente como verrugas. Existen más de 300 tipos de papilomavirus (PV), que se caracterizan por infectar a una especie determinada, y por tener especificidad por tejidos; y aunque la mayoría de papilomas causan lesiones de tipo benigno, muchas de estas pueden sufrir transformación y terminar en procesos neoplásicos y cáncer. (Saveira M, 2006; Murphy F, 1999)

Los BPV son virus sin envoltura, que contienen un ADN de cadena doble cerrado circularmente, que contiene alrededor de 8000 nucleótidos o bases y que se encuentra dividido en 3 regiones encargadas de la codificación de proteínas o genes tempranos (E); de proteínas estructurales o tardías (L) y una región que contiene los reguladores de la replicación y transcripción del genoma. (Saveira M, 2006)

Se han identificado alrededor de 10 tipos de Papilomavirus bovino (BPV), aunque se siguen realizando nuevos estudios para la tipificación de nuevos tipos de virus. Los BPVs causan lesiones de diferentes formas y estructura en distintas regiones anatómicas del ganado bovino, y algunos de estos virus se caracterizan por inducir la transformación de lesiones en neoplasias y cáncer a nivel del tracto gastrointestinal (TGI) y a nivel de vejiga urinaria. Aunque los BPV afectan específicamente a los bovinos, se conoce que los tipos BPV-1 y BPV-2 pueden inducir la formación de sarcoide en los equinos. (Saveira M, 2006; Claus M y *et al*, 2009).

El BPV-1 y BPV-2 conocidos como delta-papilomavirus, causan lesiones de fibropapilomas que infectan tanto el epitelio como la dermis superficial; los virus BPV-3, BPV-4 y BPV-6 se conocen como xi-papilomavirus e infectan solamente al epitelio causando papilomas verdaderos. El BPV-5 ha sido clasificado dentro

de los épsilon-papilomavirus y puede causar fibropapilomas o papilomas verdaderos. (Saveira M, 2006)

Las lesiones causadas por los BPV son consideradas como tumores benignos, que experimentan regresión espontánea luego de algunos meses; sin embargo, se sugiere que las lesiones que no desaparecen espontáneamente, pueden sufrir una transformación y convertirse en carcinoma de células escamosas, causantes de cáncer en la vejiga y en el TGI. Los animales de cualquier edad son susceptibles a la infección, aunque los terneros suelen ser los más afectados. (Saveira M, 2006; Murphy F, 1999)

El virus normalmente ingresa por cortes o abrasiones en la piel, y cumple su ciclo de vida en células diferenciadas, ocasionando el desarrollo de las verrugas. El contagio se da por contacto directo con animales e instrumentos infectados; aunque recientemente se ha identificado ADN viral en otros fluidos corporales, incluyendo sangre, semen, orina y leche; y de acuerdo a estos estudios, se considera que los linfocitos actúan como sitios latentes de la infección viral y como vectores para la distribución del virus en todo el organismo y hacia otros animales. (Radostits O y *et al*, 2005; Lindsey CJ y *et al*, 2009)

El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en las lesiones clínicas típicas que presenta el animal, y que pueden ser sometidas a biopsias y exámenes citológicos e histopatológicos. Además, existen otras técnicas para el análisis y la determinación del virus, siendo el PCR, la más importante para el estudio genético y determinación de nuevos tipos virales. Es importante conocer, que los PVs son difíciles de cultivar a nivel experimental, lo que ha limitado el estudio completo de los virus; aunque con las nuevas técnicas se pretende conocer más acerca de los PVs. (Radostits O y *et al*, 2005; Saveira M, 2006; IARC, 2007)

Las lesiones de la papilomatosis generalmente experimentan regresión espontánea; pero existe una gran variedad de tratamientos que se han probado para hacerlas desaparecer más rápidamente. Existen vacunas comerciales que

son efectivas, siempre y cuando contengan el tipo de virus específico que afecta a los animales infectados; por lo que su uso no siempre tiene los resultados esperados. Es también común el uso de la autovacuna, que asegura que el tipo de virus es el infectante, pero sus resultados son variables. También se pueden remover quirúrgicamente las lesiones. Se han descrito también buenos resultados con el uso de Ivermectina, Levamizol, vacuna con cepa La Sota de Newcastle y *Parapoxvirus ovis*; y se recomienda siempre la aplicación de vitaminas, minerales y otros inmunoestimulantes. (Murphy F, 1999; Radostits O y *et al*, 2005; Avki S y *et al*, 2004; Martin S, 2010?; Borku M y *et al*, 2007; Salib F y Farghali, 2011; Saveira M, 2006)

Aunque en otros países se han realizado varios estudios sobre la enfermedad, en nuestro país, la papilomatosis no es considerada como una enfermedad importante; principalmente porque las implicaciones económicas de la misma no son muy significativas. Sin embargo, los animales con papilomatosis pueden presentar disminución de la condición corporal; si las lesiones son en pezones y en glándula mamaria, la producción de leche se ve afectada, y la presencia de verrugas a nivel general es antiestética en animales de exposición. Además, que una vez que ingresa el virus en el hato, es casi imposible su eliminación y siempre se van a presentar casos de animales infectados.

El objetivo de esta investigación es estudiar los casos de papilomatosis bovinas en 5 propiedades de ganadería lechera en la Provincia de Pichincha; mediante la realización de análisis sanguíneos, que incluyen hemograma completo y química sanguínea de proteínas, para determinar si el virus provoca alteración en estos parámetros. El estudio incluye también el análisis histopatológico de algunas lesiones; la evaluación de las formas de manejo y la influencia del clima en la presentación de la enfermedad.

## CAPÍTULO 1

### 1.1.- ESTRUCTURA VIRAL

Los virus se definen como un acúmulo de macromoléculas orgánicas, que al ingresar a una célula huésped actúan como organismos vivos, capaces de reproducirse y transmitir su genoma. Los virus tienen la capacidad de evolucionar, de autoreplicarse, de experimentar variaciones y transmitirlas a su progenie, y tienen especificidad de interacción con células hospedadoras. (Vargas M, 2002)

Los virus contienen los elementos necesarios para empacar genomas virales de manera específica y eficiente, pueden escapar de una célula infectada, sobreviven la transferencia a una nueva célula huésped, y se unen, penetran e inician un nuevo ciclo de replicación. Los virus están formados a manera de una concha, para poder proteger los ácidos nucleicos virales. (Knipe D y P Howley, 2007)

Al describir la estructura viral, existen varios términos relacionados que valen mencionar. El virión se denomina a la partícula viral completa; que contiene subunidades proteicas o protómeros, que corresponden a la cadena polipeptídica. Los virus poseen también una unidad de ensamblaje, que es el conjunto de protómeros que forman un bloque de ensamblaje mayor llamado capsómero. El capsómero es la unidad morfológica del virus y se encuentra en la superficie del virión. Finalmente, la cápside es el caparazón proteico que rodea al genoma viral, para protegerlo del medio externo. Algunos virus más complejos presentan una nucleocápside que corresponde a la unión de proteínas con ácidos nucleicos que empacan al genoma. Algunos virus presentan una envoltura o membrana, de tipo lipídica asociada a glicoproteínas que rodean a toda la partícula viral. (Vargas M, 2002) ANEXO 1

Los virus pueden o no tener una cubierta, la cual está formada por una membrana de una doble capa de lípidos. Los virus con cubierta la obtienen al “echar raíces” a través de membranas de las células hospedadoras, que puede ser la membrana plasmática, la del retículo endoplasmático (RE) o del aparato

de Golgi. Esta formación de membranas es el último paso en el ensamblaje viral y muy importante para la salida de los virus de la célula infectada. (Knipe D y P Howley, 2007)

La cantidad de material genético que poseen los virus es limitada y por lo tanto, existe un número limitado de proteínas virales. Por esta razón, la estructura viral se forma a partir de un número reducido de subunidades proteicas, y por eso deben organizarse de forma simétrica, usando varias copias de una misma proteína, o varias proteínas con distintas conformaciones. (Vargas M, 2002)

La envoltura viral está compuesta de muchas subunidades idénticas, y la interacción entre estas subunidades es específica y bien definida. La cobertura proteica que envuelve a los virus se denomina cápside, del latín *capsa*, que significa caja; y que se encarga de empacar directamente al ARN o ADN de los virus. La mayoría de proteínas de la envoltura son llamadas proteínas de membrana tipo I, y contienen una hélice alfa transmembrana único, un ectodominio y “cola” de citoplasma. El contacto entre la glicoproteínas de la envoltura y sitios diana de las subunidades de la matriz determina una envoltura específica para la incorporación de proteínas. (Knipe D y P Howley, 2007; Vargas M, 2002)

Las proteínas de superficie de los virus con envoltura cumplen dos funciones importantes: actúan como receptores de unión y como receptores de fusión. Además, pueden existir enzimas destructoras de receptores, que facilitan la liberación de los virus de la célula huésped. (Knipe D y P Howley, 2007)

En los virus sin envoltura, la cápside tiene una conformación conocida como barrilete beta, formada por ocho hojas beta-plegadas, dispuestas antiparalelamente, y dos hélices alfa que dan una estructura en forma de cuña. Las subunidades tienen un tamaño de 20 - 40 kDa. (Vargas M, 2002)

En los virus con o sin envoltura, las estructuras más superficiales juegan un papel más importante en cuanto a estímulos al sistema inmune. En la parte externa del virión existen además antirreceptores, que son proteínas

encargadas de unirse a los receptores de membrana de las células huésped. (Vargas M, 2002)

## **1.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VIRUS**

### **1.2.1- Ácidos nucleicos**

Los virus mantienen su genoma en forma de ARN o ADN, que puede ser de cadena única, doble, helicoidal, doble cadena circular (PV), molécula única o segmentada. Algunos virus tienen la capacidad de transformar su ARN en ADN e incorporarlo a las células del huésped, a través de la enzima transcriptasa inversa. De esta forma, los virus transforman las células normales en células tumorales. (Vargas M, 2002)

El tamaño del genoma varía en 3 a 300 kb (kilobases), considerando que un gen es equivalente a 1 kb. Además algunos virus pueden aumentar el potencial de codificación del genoma y aumentar la diversidad de proteínas virales, mediante mecanismos de splicing, una sola región del genoma puede codificar varias proteínas, a través de marcos abierto de lectura (ORF). (Vargas M, 2002)

### **1.2.2.- Proteínas**

Se sintetizan en base al material genético. La síntesis proteica se lleva a cabo en los polirribosomas de las células huésped, que se encuentran unidos al retículo endoplasmático (RE) o en los ribosomas libres en el citoplasma. (Vargas M, 2002)

La función principal de las proteínas es de proteger al ácido nucleico viral, mediante la formación de una estructura estable. Estas proteínas pueden cambiar y mutar constantemente, como protección frente al sistema inmune. Dentro de estas proteínas también se encuentran las proteínas de unión que actúan como antirreceptores. Otras funciones incluyen: (Vargas M, 2002)

- ✓ Reguladora: alteran la actividad de síntesis de la célula, para beneficiar al virión; frenan la producción de macromoléculas para la célula huésped tan pronto como ingresan en ella. (Vargas M, 2002)
- ✓ Nucleoproteínas: sirven para empacar el genoma viral en forma de enzimas celulares, conocidos como histonas y protaminas. Regulan la expresión de genes y forman estructuras parecidas a la cromatina. (Vargas M, 2002)
- ✓ Estructural: forman las unidades proteicas o protómeros de la cápside y membrana virales; se unen en la superficie de forma ordenada dando una estructura regular y estable. Establecen interacción con el huésped mediante receptores que facilitan su ingreso a la célula y el transporte del virión. Incluye proteínas como la proteína hemoaglutinante (H), neuraminidasa (N), proteína de fusión (F), y proteína HN. (Vargas M, 2002)
- ✓ Enzimática: pueden actuar como catalizadores de ciertas funciones virales.

### **1.2.3.- Lípidos**

Forman parte de la envoltura viral y provienen de las membranas de las células hospedadoras, durante el ensamblaje del virus. Son importantes para la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. (Vargas M, 2002)

Los lípidos son también importantes para el anclaje de las proteínas en la membrana viral, en la membrana externa se anclan proteínas mediante radicales de glicosilfosfatidilinositol, y en la membrana interna mediante radicales de ácido miristílico. (Vargas M, 2002)

### **1.2.4.- Carbohidratos**

Son importantes para formar la estructura viral, y forman glicoproteínas y glicolípidos. Se unen al RE (retículo endoplasmático) mediante un proceso de translocación, adicionando residuos de polisacáridos a residuos de

aminoácidos; y en el aparato de Golgi, ayudan a terminar el empaquetamiento. En algunos virus, los carbohidratos ayudan a ocultar los epítomos antigénicos. (Vargas M, 2002)

### **1.3.- REPLICACIÓN VIRAL**

En el ciclo de replicación, también llamado ciclo lítico, hay producción y liberación de la progenie viral, y destrucción de la célula hospedadora y daño tisular. La fase inicial se conoce como período de eclipse o de latencia, que comprende desde la captación de viriones infectantes hasta la aparición de un nuevo primer virión en el medio. (Vargas M, 2002)

Los pasos para la multiplicación viral incluyen:

#### **1.3.1.- Acercamiento**

La partícula viral infecciosa se aproxima hacia la superficie de la célula hospedadora. En esta etapa son importantes las cargas eléctricas del virión y de la célula, al igual que la fluidez de la membrana tanto celular como viral. (Vargas M, 2002)

#### **1.3.2.- Adsorción**

Corresponde a la unión entre el virión y la célula diana, por acción de elementos complementarios: las proteínas de unión virales se unen a los receptores de membrana de las células. En esta unión interviene la afinidad y especificidad entre virión y célula, que puede estar dada por determinadas secuencias de aminoácidos que reconocen solamente un sitio específico de la membrana celular. (Vargas M, 2002)

#### **1.3.3.- Entrada del virión**

En los virus bacteriófagos la cápside queda en la superficie y solo ingresa el ácido nucleico. En organismos más complejos, el virus debe pasar una serie de barreras biológicas para entrar en contacto con la célula diana; y poder ingresar en ella. Para la entrada, ocurre un proceso de englobamiento endocítico o

viropexis, que consiste en la fusión de membranas en virus con envoltura; o un proceso de traslocación o penetración directa en virus sin envoltura. La unión da lugar a la formación de un fagosoma, que inhibe la unión de los lisosomas protegiendo así al genoma. (Vargas M, 2002) ANEXO 2

#### **1.3.4.- Denudamiento**

Consiste en la remoción de la cápside y envolturas virales para liberar el ácido nucleico, de tal forma que pueda interactuar con el metabolismo celular. Hay una pérdida de estabilidad estructural de la cápside, o se fusionan las membranas viral y celular. Las señales para que esto ocurra son dadas al unirse el virión al receptor o si el virus está en un ambiente con pH bajo como el de los endosomas. (Vargas M, 2002)

#### **1.3.5.- Transcripción**

En esta etapa se transfiere la información genética de una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN o ADN, a otra. Para esto, es necesario que se forme ARNm (Mensajero) a partir de una molécula de ADN, o la formación de una cadena de ARN complementario. Para producir el ARNm, se utilizan las enzimas virales ARN polimerasas ARN dependientes, las cuales cumplen con la función de transcripción al producir el ARNm, aunque también cumplen funciones de replicación, es decir, que copian el ARN viral para formar nuevos genomas. La mayor parte de virus ADN se replican en el núcleo y dependen de las ARN polimerasas celulares. Intervienen tanto genes tempranos o de lectura rápida, y genes tardíos o de lectura en fase final del ciclo. (Vargas M, 2002)

#### **1.3.6.- Traslación**

En esta fase se sintetiza una cadena de polipéptidos a partir del ARNm. El ARNm sintetiza proteínas durante dos periodos de tiempo simultáneos: la traslación de proteínas tempranas, en las que se producen proteínas con funciones enzimáticas y reguladoras de la función celular; y la traslación de proteínas tardías o estructurales, que conforman el virión. (Vargas M, 2002)

### **1.3.7.- Replicación del genoma**

Aquí ocurre la síntesis de ADN o ARN viral. Los virus de ADN utilizan las ADN polimerasas de la célula que se encuentran en el núcleo; mientras que los virus ARN usan replicación para formar ARN a partir de cadenas complementarias que actúan como molde. (Vargas M, 2002)

### **1.3.8.- Síntesis proteica tardía**

Las proteínas se sintetizan en la célula infectada luego de que se han replicado los genomas virales. Durante esta fase se sintetizan las proteínas estructurales del virus. (Vargas M, 2002)

### **1.3.9.- Ensamblaje**

Se produce una organización de las proteínas y ácidos nucleicos virales, para la formación de viriones maduros. En los virus con envoltura, se organiza y se ensambla la nucleocápside debajo de la membrana celular; y en los virus si envoltura, la cápside se forma alrededor del genoma. En esta fase hay gran expresión de antígenos virales en la superficie de la membrana celular; y las proteínas sintetizadas en la célula hospedadora, se procesan en los proteosomas y se presentan a través del MHC I (Complejo mayor de histocompatibilidad I) para que puedan ser identificados por los linfocitos T. (Vargas M, 2002)

### **1.3.10.- Liberación**

Los nuevos viriones infecciosos son liberados al medio externo a través de procesos de citólisis o gemación. (Vargas M, 2002) ANEXO 3

## CAPÍTULO 2

### 2.1.- GENERALIDADES DE LA PAPILOMATOSIS

La papilomatosis está causada por virus ADN oncogénicos, que infectan el epitelio cutáneo y mucoso en una gran variedad de animales, incluyendo humanos, bovinos, equinos, chimpancés, mono Rhesus, venados, perros, elefantes, ratones, loros entre otros. El virus ingresa a través de cortes, abrasiones y otras lesiones, e induce la formación de papilomas o verrugas, que generalmente no causan daño y tienen una regresión espontánea, aunque existen casos en los que progresan y pueden ser malignos. (Saveira M, 2006; Murphy F, 1999) ANEXO 4

En general existen más de 300 tipos de papilomavirus, incluyendo más de 200 tipos para el papilomavirus humano (HPV). Sin embargo, todos los papilomas tienen una organización genética muy similar. Están formados por un genoma viral con una doble hélice de ADN circular, que tiene aproximadamente 8 kilobases, que se dividen en tres regiones: (Saveira M, 2006)

- Región E: que codifica proteínas tempranas, de E1 a E7, responsables de la patogenicidad del virus.
- Región L: que codifica proteínas tardías estructurales, L1 y L2.
- Región LCR: que es una región no codificante, que contienen los elementos necesarios para la replicación y transcripción del genoma viral. Todos los genes se localizan en un solo sitio del ADN y la transcripción es unidireccional.

El ciclo de vida del virus está estrechamente relacionado con el proceso de diferenciación de las células epiteliales: el virus infecta a los queratinocitos basales, luego expresa parte de sus genes en la capas basales y suprabasales, después replica su genoma en las capas espinosa y granular que están diferenciándose, expresa sus genes estructurales y empaca su ADN en las capas escamosas, y entonces nuevos virus son finalmente liberados con las escamas queratinizadas. Durante todo este ciclo, el genoma del

papilomavirus permanece en las células infectadas como un episoma. (Saveira M, 2006) ANEXO 5

Sin embargo, el virus no siempre cumple su ciclo de vida completo; pues en ocasiones, los tumores benignos se tornan crónicos y pueden transformarse en carcinoma de células escamosas. Esta progresión neoplásica, desde el punto de vista viral, es considerada como un accidente. La transformación celular es un proceso de muerte para el virus, pues ya no tiene la capacidad de producir nuevos viriones, el genoma viral o bien es incorporado en el genoma celular, como en el caso de carcinoma de células escamosas anogenitales en humanos; o se mantiene como un elemento extracromosomal que replica junto con el ciclo celular, por ejemplo, en el caso de cáncer urotelial en el ganado; o puede también perderse en células transformadas, como en carcinoma de células escamosas del TGI superior del ganado. (Saveira M, 2006)

Otra característica importante del PV, es su especificidad por especie, incluso en condiciones experimentales, el virus solamente infecta a su huésped natural; a excepción del papilomavirus bovino tipo 1 o 2 (BPV-1 o -2) que puede infectar a caballos y otros équidos. (Saveira M, 2006)

Al ingresar a un huésped específico, el PV causa respuestas hiperproliferativas del epitelio cutáneo o mucoso, provocando la formación de verrugas, condilomas o papilomas. Aunque existen ocasiones en los que el huésped puede suprimir la actividad viral y mantenerse en un estado subclínico de enfermedad, que puede reactivarse por estados de inmunosupresión o constantes procesos de enfermarse y curarse. (Saveira M, 2006)

Los virus son resistentes a múltiples factores ambientales, incluyendo solventes lipídicos, detergentes, bajo pH y altas temperaturas. (Murphy F, 1999)

## **2.2.- HISTORIA Y AVANCES EN EL ESTUDIO DEL VIRUS**

Las lesiones por papilomas, conocidas generalmente como verrugas, han sido reconocidas en animales por varios siglos; por ejemplo, ya en el siglo IX, se habían descrito verrugas en equinos en Bagdad; y en 1907 se reconoció la etiología viral de estas lesiones, aunque recién en 1978 se conoció que las verrugas eran causadas por varios tipos diferentes de virus. (Murphy F, 1999)

La naturaleza del agente infeccioso causante de las verrugas fue investigada en un principio por Strauss y colaboradores, a finales de 1940 e inicios de 1950; quienes lograron describir estructuras cristalinas similares a un virus mediante microscopía electrónica, dentro de cuerpos de inclusión intranucleares de verrugas de piel. Estas características fueron observadas posteriormente en verrugas genitales y papilomas laríngeos (reportes de Boyle *et al*, 1973; Dun y Ogilvie, 1968). Gracias a los avances de la microscopía electrónica, se pudo realizar una mejor caracterización de los virus de las verrugas, que posteriormente fue clasificado por su morfología, como un pariente de los virus polio. Sin embargo, con el paso de los años, se determinó las pocas similitudes biológicas y estructurales moleculares entre estos dos virus; hasta que finalmente los papilomavirus fueron clasificados como una familia independiente de virus, llamada actualmente *Papillomaviridae*. (Saveira M, 2006)

Ya en los años 30 se había observado, que los PV eran la segunda clase de virus, después de los retrovirus, que podían inducir lesiones tumorales, a través de experimentos con el PV de conejo cola de algodón (CRPV). También se observó, que mientras algunos papilomas desaparecían con el tiempo, otros persistían sin progresar pero con el riesgo de terminar como carcinoma. Esto fue observado por Peyton Rous en 1935 al observar los papilomas en los conejos. (Garcea R, 2007; Murphy F, 1999)

Investigaciones posteriores empezaron a demostrar la especificidad del virus, pues se observó que el CRPV solo producía infección en epitelio no genital; y para mediados de la década de los 30, se pudo aislar el virus de la

mucosa oral del conejo (ROPV), que solo infectaba a la mucosa oral y no tenía potencial oncogénico. Por otro lado, se observó también que los animales podían desarrollar resistencia únicamente frente a virus homólogos, mientras que aún eran susceptibles a virus heterólogos. Es decir, que más de un virus podía infectar a una sola especie. (Garcea R, 2007)

En otros estudios durante la misma época, se observó que el virus del papiloma oral canino (COPV) solamente producía lesión a nivel de boca, aunque este fuera inoculado en otras zonas del cuerpo; y tenía una regresión espontánea. También se pudo identificar al virus del papiloma bovino 1 (BPV-1) y se observó que causaba fibropapilomas, pues afectaba a fibroblastos y a células epidérmicas epiteliales, a diferencia de otros PV que solo causaban lesión a nivel epitelial. Y a principios de los años 50, se observó que el BVP-1 podía causar tumores fibroblásticos benignos en caballos, similares al sarcoide equino, pero que contenían ADN del BVP. (Garcea R, 2007)

Durante los años 50 y 60, los estudios sobre los PV se limitaron debido a su dificultad en el cultivo y a su falta de importancia médica. Sin embargo, con el avance en la microscopía de anticuerpos fluorescentes y microscopía electrónica, se pudieron observar mejor a estos patógenos. (Garcea R, 2007)

Se sospechaba inicialmente, que debido a la cronicidad del virus, éste debería estar presente en las capas de células basales, que es en donde ocurre la división de células epiteliales. Sin embargo, se pudo observar que los antígenos estructurales y otras partículas del CRPV se encontraban solamente en el núcleo de queratinocitos diferenciados en las capas superiores de la lesión; por lo que se sospechó que en las células basales se encontraban formas inmaduras del virus. Estos resultados además llevaron a la conclusión de que la replicación de los PV estaba muy relacionada al proceso de diferenciación de las células epiteliales escamosas estratificadas, lo cual explicaba el porqué el virus no crecía en cultivos de una sola capa celular. (Garcea R, 2007)

Durante los años 60 y 70, se realizaron investigaciones relacionadas con el ADN del virus, y se determinó, que la regresión de los papilomas en conejos enfermos, estaba mediada inmunológicamente; pues la frecuencia de regresión disminuía en animales con inmunosupresión inducida con metilprednisolona; mientras que la regresión aumentaba cuando los animales eran inmunizados sistemáticamente con tejidos molidos de papilomas; aunque no desarrollaban regresión por transferencia pasiva de suero de conejos con papilomas persistentes. Además, en otros estudios se observó que los anticuerpos neutralizantes no son suficientes para inducir la regresión de las lesiones, llegando a la conclusión de que este proceso estaba mediado por inmunidad celular no humoral. (Garcea R, 2007)

Durante finales de los años 70 y principios de los 80, las investigaciones de los PV se enfocaron en el estudio experimental de PV animales, y en el estudio clínico de los HPV. De acuerdo a estos estudios, se determinó que los BPV-1 tenían dos propiedades importantes: la primera era que el virus tenía una fácil fuente renovable de viriones, pues podía propagarse seriamente *in vivo* a partir de extractos de grandes lesiones en ganado. La segunda propiedad, era que el BVP-1 podía inducir transformaciones morfológicas y formación de focos de tejido específico en líneas de cultivos celulares; a diferencia del CRPV y de los HPV, y que se relacionaba con un mayor rango de huéspedes para el virus *in vivo*. (Garcea R, 2007)

El BPV-1 ha sido uno de los virus más estudiados, y fue el primer PV del que se completó el genoma en 1982; seguido posteriormente por HPV-1, HPV-6 y CRPV. Esto demostraba que los distintos tipos de PV compartían organización genética similar y homología en la secuencia. Combinando esta información con análisis de transcripción, se determinó que el virus podía dividirse en 3 segmentos: una región no codificante; una región codificante los genes no estructurales (genes tempranos E); y una región codificante de las dos proteínas de la cápside (genes tardíos L). (Garcea R, 2007)

Hacia finales de los 70, se desarrolló un modelo de infección del esófago por BPV-4, cuyas lesiones se localizaban en superficies mucosas, y que podían

transformarse en cáncer en el ganado infectado; situación que fue relacionada con el consumo de hebrecho. Este era un evento totalmente natural en el que un agente no viral contribuía a la progresión del papiloma en carcinoma. (Garcea R, 2007)

Hacia los años 1980, se reconoció que existían muchos genotipos de HPV que causaban lesiones genitales y no genitales. Además, se determinó que algunos genotipos de PV estaban relacionados con lesiones cutáneas de la epidermodisplasia verruciformis (EV), y que algunas de estas lesiones se transformaban en carcinoma de células escamosas, específicamente, las lesiones tumorales que contenían HPV-5 y HPV-8. Esta fue la primera evidencia que el HPV se relacionaba con el cáncer en humanos. (Garcea R, 2007)

Se le empezó entonces a dar mayor importancia médica a los efectos de los PV y se determinó que la apariencia histológica de la displasia cervical, el precursor celular del cáncer celular, se parecía mucho a la apariencia de papilomas viral; y se sugirió que el HPV jugaba un papel importante en la carcinogénesis cervical. Se aislaron los tipos HPV-6 y HPV-11 de verrugas genitales benignas, y luego se determinó la presencia de HPV-16 y HPV-18 en cáncer cervical, y que sus genes jugaban un papel importante en el desarrollo de cáncer. (Garcea R, 2007)

Hasta recientemente, el estudio de las partículas de PV y su interacción con las células del huésped, se basaba en el aislamiento de partículas virales de epitelios naturales infectados, en los distintos tipos de verrugas; pues en 1975 se había reportado que la replicación en un cultivo celular simple no era posible. Esto limitó la caracterización viral, su ciclo de vida, su forma de infección y su clasificación. Incluso hoy en día la mayoría de estudios se basan en ADN clonado de los virus y los conocimientos acerca de la estructura y antigenicidad de las cápsides virales, son el resultado de virología en reversa. Aunque el hallazgo de que los BVP-1, podían transformar a las células de roedores en cultivos, permitió realizar estudios posteriores, que han permitido

conocer la acción de las oncoproteínas de los virus. (Saveira M, 2006; Murphy F, 2007)

### **2.3.- FILOGENIA Y TAXONOMÍA DE LOS PAPILOMAVIRUS**

Las características del genoma de los virus han sido las bases para su nomenclatura y taxonomía, pues no existen sistemas de cultivo confiables ni marcadores serológicos para estos virus. Los papilomavirus (PV) tienen una organización del genoma muy similar, pues al compararlos se encuentran al menos 5 genes homólogos, aunque la secuencia nucleótida puede variar en más del 50%. Los estudios filogenéticos sugieren que normalmente estos virus han evolucionado junto con sus especies hospedadores mamíferas o aviares, no cambian de especie hospedadora, no se recombinan y han mantenido su organización genética básica por un periodo mayor de 100 millones de años. (Garcea R, 2007; Saveira M, 2006)

Mediante la comparación de secuencias, se ha establecido una taxonomía para los papilomavirus, reconocida por el Comité de Taxonomía de Virus. Inicialmente los ADN aislados de los PV que eran muy diferentes de otros eran llamados tipos, y todos los PVs actualmente forman parte de la familia *Papillomaviridae*. Las ramas mayores del árbol filogenético son considerados como “géneros” identificados con letras griegas. Las ramas filogenéticas menores son consideradas como “especies”, y unen a tipos de PV que son genómicamente distintos sin exhibir diferencias biológicas. Son considerados “tipos”, los virus cuya secuencia de nucleótidos en L1 difiere en al menos 10% con otros tipos; mientras que los “subtipos” solo varían en su secuencia en un 2-10%. Los virus aislados del mismo tipo y con mínimas diferencias, son conocidos como variantes. Este nuevo sistema taxonómico no afecta a la identificación y caracterización tradicionales de los tipos de PV; y clasifica a los subtipos y variantes de los virus, dentro de niveles menores al de “especies”. (Garcea R, 2007; Saveira M, 2006) ANEXO 6

Inicialmente, los papilomavirus fueron clasificados junto con los polyomavirus, dentro de la familia *Papoviridae*. Esto se basaba en las

similitudes electromicroscópicas de sus cápsides virales, sin envoltura y con doble hélice circular de ADN. Esta clasificación fue difícil de mantener, cuando a mediados de los 80 se empezó a conocer que los polyoma y lo papilomavirus tenían distintos tamaños de genoma (5kb y 8kb respectivamente), diferentes estrategias de transcripción; y que sus proteínas no eran homólogas. Esto llevó a la determinación de la familia *Papillomaviridae*. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007)

No se han encontrado parientes a los virus de la familia *Papillomaviridae*, y se ha observado que los virus aislados de animales muy poco relacionados con los humanos, tampoco se relacionan con los HPVs, lo que afirma que cada especie de virus evolucionó junto con sus huéspedes. (Saveira M, 2006)

ANEXO 7

### **2.3.1.-Géneros en la taxonomía del papilomavirus**

Inicialmente a los genomas de los papilomavirus se los describió como “tipos”, pero en la actualidad la taxonomía de estos virus se basa en algoritmos filogenéticos, que analizan las similitudes entre secuencias de nucleótidos. Durante las investigaciones se hizo claro que la comparación de genomas completos de PVs, homología individual de genes de PV o incluso pequeños segmentos de genes de PVs, llevaban a árboles filogenéticos muy similares. Se concluyó entonces que los genomas de los PV no se recombinan y que cada virus homólogo prueba la evolución histórica de cada virus. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007)

Cuando se empezó a comparar las secuencias de un número mayor de tipos de PV, se observó que la mayoría de los virus formaban ensamblajes jerárquicos, por lo que se empezó a usar expresiones como ramas mayores y menores, o supergrupos y grupos. Por ejemplo, una rama mayor estaba formada por todos los tipos de HPV que originalmente fueron descritos de lesiones genitales, y por lo tanto se lo llamó los HPV genitales; mientras que otro estaba formado de PVs de animales con casco que presentaban lesiones en células epiteliales y mesenquimáticas, y se los conocía como

fibropapilomas. Sin embargo, con el tiempo se observó que esta clasificación no tenía mucha consistencia biológica, porque no todos los virus producían las mismas lesiones en los mismos lugares, por lo que los virus no podían clasificarse únicamente mediante una taxonomía fenotípica. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007)

Por esta razón, se decidió introducir “géneros” dentro de la clasificación taxonómica de los papilomavirus, para nombrar a los previamente conocidos como “supergrupos o ramas mayores; y debido a que dar un nombre específico a cada género resultaba complicado, se decidió utilizar letras griegas para nombrarlos. De tal forma que en la actualidad, por ejemplo, todos los papilomavirus genitales, formaron el grupo alfa-papilomavirus; mientras que tipos de PVs asociados a EV, se les nombra como beta-papilomavirus. Otros virus cutáneos pertenecen a los gama-papilomavirus. La mayoría de fibropapilomas pertenece a los delta-papilomavirus; y los de la mucosa de ungulados, a los Xi-papilomavirus. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007) ANEXO 8

### **2.3.2.- Especies y tipos de Papilomavirus**

Anteriormente, debido a que no se podía identificar, mantener y describir cultivos celulares de distintos PVs, más que el aislamiento de sus genomas; a aquellos cuyo ADN aislado era diferente se les conocía como tipos. Sin embargo, en la actualidad se considera que dos genomas de PV son de distintos tipos, cuando la secuencia de nucleótidos de sus genes L1, que codifican las proteínas de la cápside, tienen menos del 10% de semejanzas. Debido a las grandes variaciones tanto fenotípicas como genotípicas de distintos tipos de virus, se determinó, que cada tipo sea considerado como una especie; dependiendo de clusters (grupos) filogenéticamente relacionados en distintos tipos de PV; que son identificados con un sistema numérico. (Garcea R, 2007; Saveira M, 2006)

En condiciones naturales, un tipo de PV tiene un huésped específico, aunque múltiples especies de animales con cascos pueden ser infectados por

un mismo tipo de virus. Pero no se conoce todavía cuales son los factores que limitan la transmisión de un tipo de PV entre varias especies. En la actualidad existen más de 118 tipos de PV humanos y animales descritos, además de que hay observaciones de cientos de genomas de PV adicionales, que aún tienen que ser aislados y descritos formalmente para considerarse como tipos. (Garcea R, 2007)

No se ha encontrado genomas intermedios entre dos tipos distintos de PV, ni tampoco se ha observado recombinación; y a excepción de algunos BPV que pueden infectar a otras especies, la mayoría de tipos de PV tienen un solo huésped específico; y no se conoce como se han desarrollado nuevos tipos de PV. No hay indicación que la selección inmune pueda contribuir significativamente al proceso filogenético; y todavía no se comprende bien ciertos detalles de la respuesta inmune contra células infectadas con PV; sin embargo, la ausencia de respuesta inflamatoria a una infección de PV sugiere procesos de evolución para evadir el reconocimiento inmune. (Saveira M, 2006)

### **2.3.3.- Subtipos de PV**

Los subtipos son definidos como genomas de PV que difieren de otro tipo en su secuencia de nucleótidos en un 2-10%. Existen muy pocos genomas que se encuentran dentro de esta clasificación, por ejemplo, HPV-67 es un subtipo de HPV-34; HPV-46 de HPV-20; HPV-55 de HPV-44 y el PV del chimpancé, y el PV del chimpancé pigmeo (Bonobo). No se conoce la razón exacta de por qué hay tan pocos subtipos, pero se sugiere, que muchos pueden haberse extinguido con los años, a la vez que las distintas especies continuaban evolucionando. (Garcea R, 2007; Saveira M, 2006)

El PV del chimpancé y del bonobo son subtipos de un tipo de PV dentro de la misma especie, que también incluye al HPV-6 y HPV-11, lo cual sugiere, que luego de un periodo de algunos millones de años, en el cual se diferenciaron los humanos de los simios, los tipos de PV se diversificaron a un nivel que hizo a los PVs de los simios, miembros de las especies de HPV. Todos los PV de distintas especies de monos forman ramas dentro de los HPVs genitales. De la

misma forma, la poca relación entre PVs de aves y mamíferos, sugiere que los virus se separaron en la época en la que los reptiles empezaron a dar origen a las distintas líneas de aves y mamíferos; y que los reptiles pueden tener algún tipo de PV que aún no ha sido encontrado. (Saveira M, 2006)

Muchos de los aislados virales, que inicialmente fueron considerados como subtipos, son ahora clasificados dentro de la categoría de variantes. (Garcea R, 2007)

#### **2.3.4.- Variantes de PV**

Con el aislamiento constante de genomas de HPV, se observó, que a diferencia de lo que sucede con los subtipos, que llegan a ser muy pocos, existe una gran población de variantes de estos tipos de HPV. Las variantes se definen como genomas virales que tienen una variación menor al 2% comparada con los tipos virales originales. La diversidad genómica se presenta con mayor frecuencia en las regiones no codificantes, especialmente en la región de control larga (LCR). (Garcea R, 2007)

Se define la variación como un intercambio o supresión de nucleótidos, que ocurren en un corto segmento del genoma. Las variantes de cada tipo de HPV dan origen a alrededor de 2-6 ramas filogenéticas. Se sabe además, que algunas de las variantes de cada tipo de HPV evolucionaron en poblaciones humanas de regiones geográficas específicas, por lo que prevalecen en algunos grupos étnicos. (Garcea R, 2007)

En algunos casos, las variantes de los tipos de HPV se expanden en forma de genes inherentes cromosómicamente, y la carga viral de una población refleja su composición étnica. Se cree además, que algunas de las variantes virales de un mismo tipo de virus pueden ser más carcinogénicas que otras; por ejemplo, se ha observado que variantes no-europeas de HPV están más asociadas a lesiones malignas. (Garcea R, 2007)

### **2.3.5.- Investigaciones sobre los tipos virales y evolución de los PV**

Los primeros tipos de PV en ser aislados a partir de tejidos con una alta carga viral fueron: verrugas de conejo (CRPV), de ganado (BPV-1) y de verrugas planas de humanos (HPV-1). Usando el ADN de estos virus junto con las nuevas técnicas de investigación, se empezaron a identificar y nombrar nuevos tipos clonados de PV. (Garcea R, 2007)

Existen numerosos datos que sugieren que los PVs evolucionaron conjuntamente con su especie huésped; y se considera que la evolución de un nuevo taxón de PV empezaba con los cambios evolutivos de su huésped. Aunque no se conoce aún cuales son los procesos que desencadenaron la formación de tantos tipos de PV, se considera que variaciones genéticas, cuellos de botella genéticos y falta de selección podrían haber ayudado a este proceso, gracias a la inserción, supresión o intercambio de nucleótidos del genoma viral. (Garcea R, 2007)

En cuanto a la selección de los tipos de PVs, se considera que esta resulta de la evasión inmune; pues la ausencia de respuesta inflamatoria en infecciones con PV sugiere una ausencia de procesos evolutivos en curso para evadir el reconocimiento inmune. (Garcea R, 2007)

Los cambios moleculares de los genomas de los PVs ocurren en un índice muy corto, y nunca han podido ser observados *in vitro*. Por lo tanto, la velocidad de los cambios del genoma debe ser estimada a partir de comparaciones de genomas de origen natural y suposiciones acerca de su origen. Se ha sugerido que el genoma del virus cambió a una velocidad tan lenta, como a la que cambian los genomas de sus huéspedes vertebrados, aproximadamente cambian máximo un 1% cada 100 mil o 1 millón de años. Esto sugiere por ejemplo, en el caso de papilomatosis humana, que ésta siempre estuvo presente. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007)

Hasta el momento no se conoce de PVs que afecten a vertebrados menores o a invertebrados, y por eso no se puede definir todavía cuál es el origen de la familia *Papillomaviridae*. (Garcea R, 2007)

## CAPÍTULO 3

### 3.1.- CICLO DE VIDA DEL VIRUS

El establecimiento claro del ciclo de vida del PV resultaba bastante complicado, debido a la incapacidad de replicación del virus en cultivos celulares e inicialmente el estudio incluía la descripción de la distribución de los genomas virales y la producción de genes en lesiones naturales de humanos y animales. Las células transformadas en cultivo por los BPV eran considerados modelos de la fase temprana de la infección, mientras que las capas epiteliales y las verrugas infectadas se consideraban como la fase tardía. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007)

Actualmente se cuenta con varios modelos de cultivos tisulares que inducen líneas celulares que mantienen la estabilidad de los genomas virales y los plásmidos, y métodos para inducir la diferenciación epitelial, necesaria para la producción de viriones hijos; de esta forma se han podido reproducir *in vitro* viriones auténticos, pseudoviriones y partículas de virus no infecciosas (VLP). (Garcea R, 2007; Saveira M, 2006)

Además, se han utilizado genomas de HPV con mutaciones específicas para evaluar el papel de los productos de genes virales en el ciclo de vida del virus en las células epiteliales diferenciadas. Se han estudiado también genes virales y proteínas individuales en ensayos celulares y bioquímicos, para el estudio de la transformación, transcripción y replicación viral. (Garcea R, 2007)

El ciclo de vida del PV se desarrolla en 3 etapas: (Saveira M, 2006)

1. Entrada del virus y establecimiento de la replicación del genoma viral.
2. Mantenimiento del genoma extracromosomal en las células epiteliales basales en división.
3. Amplificación del genoma en queratinocitos diferenciados, expresión de genes tardíos y construcción de nuevos viriones.

El ciclo de vida del PV está íntimamente ligado al proceso de diferenciación del tejido epitelial del huésped. Aunque todavía no se sabe exactamente cuál

es el receptor celular para la entrada del virus, se conoce que el sulfato de heparina puede facilitar la unión del virus. Se cree que los objetivos de la infección inicial son las células epiteliales basales, que son expuestas como resultado de microheridas al epitelio estratificado. (Garcea R, 2007)

Luego de la unión del virus a los receptores y su entrada en la célula, los viriones migran hacia el núcleo, en donde establecen sus genomas a manera de múltiples copias de plásmidos extracromosomales, que llegan a ser entre 20-100 copias por célula basal infectada. La replicación de los genomas virales ocurre en la fase S del ciclo celular por acción de las proteínas virales E1 y E2, junto con proteínas de replicación celular. (Garcea R, 2007)

Luego de que se ha replicado el genoma y se ha producido la división celular, una de las células hijas migra lejos de la capa basal e inicia con el proceso de diferenciación. Normalmente, los queratinocitos sanos se retiran del ciclo celular después de haber salido de la capa basal, y sus núcleos son degradados en muchas de estas células diferenciadas. Sin embargo, las células infectadas con PV sufren procesos de diferenciación, pero permanecen activas en el ciclo celular, lo que les permite a las células suprabasales altamente diferenciadas, reiniciar la fase S y así estimular la replicación en altos niveles de ADN viral productivo. La habilidad que les permite a las células diferenciadas continuar con el ciclo celular, se encuentra mediada por la proteína viral E7. (Garcea R, 2007)

Por otro lado, la amplificación de los genomas virales en células suprabasales diferenciadas, coincide con la activación del promotor viral tardío, encargado de codificar las proteínas de la cápside viral L1 y L2, y de dos mediadores de las funciones virales E1-E4 y E5. Los viriones hijos son distribuidos en células altamente diferenciadas, y luego son liberados al ambiente extracelular. (Garcea R, 2007)

La cápside viral juega un papel importante en el proceso de establecimiento de la infección. En el caso de virus sin envoltura, como los PV, un abrigo proteico rodea los ácidos nucleicos virales y los protege de la degradación por

factores externos. Esta permite además, la interacción con la superficie celular, media la adsorción y es interiorizada. Luego de ingresar en el huésped, el virus debe eliminar ese abrigo proteico para liberar el genoma, de tal forma que pueda ser transcrito y replicado en el ciclo celular. (Saveira M, 2006)

De acuerdo a las investigaciones se sugiere que los PV se unen a un receptor celular de superficie, proceso en el que participan L1, L2 y múltiples receptores. Se ha sugerido, que la infección como tal, necesita una interacción de especificidad baja mediada por la unión de L1, seguida de una interacción de una proteína más específica, que forma parte de L2. (Saveira M, 2006)

#### ANEXO 9

Entre los compuestos con los que mayor afinidad tiene la partícula viral para la unión, se encuentran los glicoproteicos (GAG): heparina y sulfato de heparina; sulfato de condroitina y sulfato de dermatina; sulfato de queratina y ácido hialurónico. Se considera que los GAG son los receptores celulares de superficie sensibles a tripsina que permiten la interacción entre el virus y la célula del huésped. (Saveira M, 2006)

#### **3.1.1.- Organización genética y expresión de genes de los PVs**

Los viriones de los PVs tienen un diámetro de 55 nm y están conformados por 72 capsómeros. La organización genética de los distintos tipos de PV es bastante similar, pues contienen una única molécula de ADN en forma circular y de doble hélice, de 8 kb con regiones codificantes tempranas y tardías similares, al igual que las secuencias que regulan la transcripción y la replicación. Los PV codifican entre 6-8 marcos de lectura abiertos (ORF) que contribuyen a que el ciclo de vida viral sea productivo. El ADN viral tiene terminaciones cerradas de tipo covalente, se encuentra superenrollado y es infeccioso. (Garcea R, 2007; Murphy F, 1999) ANEXO 10

Todos los PVs tienen una región no codificadora conocida como LCR o región de control larga, que se encuentra entre los genes L1 y E6, y que incluye a la mayoría de elementos encargados de la transcripción viral. Esta

transcripción, es unidireccional, desde uno o varios promotores localizados en LCR o en los genes E6 y E7. (Saveira M, 2006)

La función de la mayoría de los genes es ejecutada por las proteínas que codifican. La cantidad de una proteína funcional está determinada por la frecuencia de transcripción de los genes, mediante ensamblaje, estabilidad de los transcriptores resultantes y la eficacia de traslación. En los PVs, los sitios de inicio de la transcripción, llamados promotores, están localizados en LCR y los genes E6 y E7; y la intensidad de uso de estos promotores está determinada por elementos reguladores dentro y alrededor de LCR. (Saveira M, 2006)

La transcripción de cualquier proteína codificadora de un gen es muy compleja, y en ésta intervienen más de 100 proteínas distintas. Las proteínas codificadoras de genes son transcritas por la ARN polimerasa II, que debe cumplir con 4 objetivos: (Saveira M, 2006)

- Identificar el inicio del gen, es decir el promotor.
- Iniciar la ARN polimerización en este sitio.
- Elongar el ARN a una velocidad razonable
- Terminar la transcripción en los sitios finales.

La ARN polimerasa II no puede, por sí misma, identificar a los promotores, sino que necesita la ayuda de factores generales de transcripción, que reconocen una secuencia de nucleótidos específicos, conocidos como TATA box, e inician el ensamblaje de factores complejos, junto con la ARN polimerasa II. (Saveira M, 2006)

Este proceso es catalizado por diversos factores, que incluyen el establecimiento de un complejo de factores generales de transcripción, y que tienen además efectos sobre la elongación. Estos factores de transcripción pueden unirse cerca de un promotor (factores promotores) o lejos del mismo (factores potenciadores). La composición de éstos determina la expresión de cada gen, así como el tipo de célula específico o la expresión en la respuesta a estímulos fisiológicos. (Saveira M, 2006)

En los mamíferos el ADN se encuentra empacado a manera de nucleosomas (cromatina), que son importantes herramientas para regular la accesibilidad de los genes a la maquinaria transcripcional. Bajo la influencia de acetilasas histónicas (HATS), los nucleosomas tienen una conformación que favorece la transcripción. Bajo la acción de deacetilasas histónicas (HDAC), los nucleosomas tienen una conformación que reprime la transcripción. (Saveira M, 2006)

Los productos genéticos virales tempranos, E6 y E7 son importantes para la inmortalización y transformación de las células por PV de alto riesgo; pues se unen e inactivan varias proteínas celulares que inhiben la progresión del ciclo viral, y crean el ambiente propicio para la replicación viral. La E6 forma un complejo con p53, que es una proteína supresora de tumores, e induce su degradación proteosomal inmediata. E7 se une a las proteínas de la familia de retinoblastomas (pRb) degradándolas y facilitando así la progresión del ciclo celular, pues evita la represión de los genes necesarios para entrar en la fase S. Además, E6 y E7 son importantes para mantener los genomas virales y otras funciones virales. (Garcea R, 2007)

Las proteínas E1 y E2 regulan la transcripción y replicación viral. La unión de E1 y E2 a sitios específicos de LCR es necesaria para reclutar a la ADN polimerasa y otras proteínas de replicación del ADN celular hacia el sitio de origen viral para la replicación. La ATPasa y helicasa de E1 son necesarias para la separación del ADN que permita la replicación viral, pero su acción es débil, por lo que se une a E2 formando un complejo, que les permite unirse a estructuras hexámeras, con mayor afinidad por el ADN, y que incrementan la actividad helicasa. (Garcea R, 2007)

La E2 es necesaria para el control de la transcripción, expresión de los genes virales y replicación del ADN viral; regula la transcripción iniciada en el promotor viral temprano, localizado por encima del ORF de E6, que controla el número de copias. (Garcea R, 2007)

Las proteínas L1 y L2 son las proteínas de la cápside, y se expresan durante la fase tardía del ciclo de vida viral, solamente en células epiteliales diferenciadas. El ensamblaje de L1 y L2 en las cápsides icosaédricas se realiza alrededor de una sola copia del genoma viral, asociada a histonas celulares. (Garcea R, 2007)

Las proteínas que son más expresadas durante la fase productiva de la infección, es una fusión E1-E4, que se sintetiza durante la fase tardía del ciclo de vida del virus, a partir de transcritos ensamblados; y que precede a la síntesis de las proteínas de la cápside durante la amplificación del genoma. Luego estas proteínas son procesadas y se asocian al citoplasma en donde se unen a citoqueratinas. Estas proteínas son importantes en el ciclo de vida del virus, pues su ausencia evita que se produzcan nuevos viriones hijos y disminuyen la transcripción viral. (Garcea R, 2007)

La sobreexpresión de E1-E4 ocasiona el colapso de las redes de citoqueratinas y de esa forma facilita la salida de los virus. Además, hace que ciclo celular se detenga y permanezca en fase S, bloqueando el avance de la mitosis. (Garcea R, 2007)

### **3.2.- TRANSCRIPCIÓN DEL HPV**

La expresión genética de los distintos tipos PVs está mediada por dos promotores mayores y varios promotores menores; que se encuentran activos tanto en células basales no diferenciadas, como en células suprabasales diferenciadas. Estos promotores dirigen la transcripción de las proteínas tempranas. (Garcea R, 2007) ANEXO 11

El gen promotor E6 contiene una TATA-box, precedida por un hexámero que sirve de sitio de unión para los factores activadores del promotor y que contribuyen a la especificidad epitelial en la transcripción del PV. (Saveira M, 2006)

Se sugiere que la transcripción de los papilomavirus ocurre en tres etapas: (Saveira M, 2006)

- Poca transcripción, detectable en células basales no diferenciadas.
- Aumento de la transcripción de los genes tempranos en células suprabasales.
- Transcripción de los genes tardíos en capas celulares cercanas a la superficie epitelial.

El cambio basal - suprabasal de los genes virales reprimidos a una activación de los genes tempranos, ha sido ligeramente comprendido, pero todavía no se puede explicar el cambio a genes tardíos. (Saveira M, 2006)

Los ARNm de los promotores E6 también codifican las proteínas L1 y L2, por lo que se sugiere, que las proteínas tardías pueden ser traducidas del mismo ARNm que las proteínas tempranas. Los BPV-1 tienen promotores en varias partes del genoma, concretamente en la parte 5' de LCR, por encima del promotor E6 y todos los genes tempranos. Esto permite la transcripción de genes tempranos, que después pueden ser removidos para generar ARNm tardíos. (Saveira M, 2006)

Los promotores E6 de los alfa-PV tienen una actividad baja, que es mejorada por potenciadores en la región central de LCR, La fuerza de estos potenciadores depende del tipo de epitelio infectado y la modulación de los estímulos fisiológicos; y además son específicas de células epiteliales. (Saveira M, 2006)

Un segmento entre el potenciador y el promotor de E6 no contiene sitios para activadores de la transcripción; sino que actúa más bien como un sitio de inicio de la replicación y reprime la transcripción, actuando como un silenciador transcripcional a través de factores específicos. En el caso de que estos factores no existan o no cumplan con su función adecuada, el proceso puede terminar en la aparición de tumores y procesos de cáncer. (Saveira M, 2006)

Estos factores que actúan como silenciadores, pueden ser encontrados en exceso dentro de células epiteliales no-diferenciadas; y van disminuyendo sus concentraciones a medida que avanza el proceso de diferenciación. Los silenciadores trabajan secuencialmente con los potenciadores, para reducir la

expresión de genes virales en células no diferenciadas, y para estimular la expresión de los mismos durante la diferenciación. (Saveira M, 2006)

### **3.2.1.- Organización del nucleosoma y regulación de la cromatina**

El ADN cromosomal de los PVs se encuentra en forma de cromatina, asociado con histonas, que forman nucleosomas y que juegan un papel importante en la regulación de expresión de genes. Esto lo logran mediante cambios en su conformación por procesos de acetilación, desacetilación y metilación asociados a activadores y represores específicos de transcripción. (Saveira M, 2006)

La cromatina cumple un papel importante en la transcripción, pues los procesos realizados por los silenciadores, si bien son iniciados por factores específicos, son finalmente ejecutados a nivel viral por la cromatina. Además, que se considera que cumple el mismo papel en el cambio de expresión de genes tempranos a tardíos; pues la reconfiguración de la cromatina ocurre durante la activación de la transcripción de los genes tardíos. (Saveira M, 2006)

Se sugiere que en procesos de infección de células no diferenciadas, el ADN del virus es reconocido y su transcripción es reprimida por procesos de metilación. Esto puede inducir un estado de replicación latente, pues el sitio de inicio de la replicación no sufre metilación y se mantiene funcional. Luego, el genoma viral se torna activo para la transcripción durante los procesos de diferenciación epitelial, e induce la transformación y completa el ciclo de vida viral. Estos procesos explican las infecciones virales subclínicas. En procesos de tumoración, muchos genomas virales son metilados durante su unión con el ADN celular, y se reprimen; y las células que retienen genomas transcripcionalmente activos se transforman en tumores. (Saveira M, 2006)

En el caso de HPV, la transcripción sólo ocurre cuando el genoma viral se encuentra en una posición nuclear definida, mientras que los genomas en otros sitios se mantienen inactivos. Las verrugas o lesiones de papilomas comunes, no recombinan el ADN viral con el de la célula, contrario a lo que ocurre en caso de carcinomas. (Saveira M, 2006)

## CAPITULO 4

### 4.1.- REPLICACIÓN VIRAL

La replicación viral está altamente relacionada con el crecimiento y la diferenciación de las células infectadas en el epitelio estratificado escamoso y mucoso, desde su origen en las capas basales hasta su salida en la superficie epidérmica de la piel o membranas mucosas. Inicialmente se infectan las células basales en división en el estrato germinativo, y mantienen al virus en estado de latencia durante la diferenciación. (Murphy f, 1999) ANEXO 12

La presencia del virus determina una hiperplasia inducida por genes virales tempranos, que estimulan la división de células basales, y de esa forma, retrasan la maduración del estrato espinoso y granuloso de la piel. Estas células forman masas que dan lugar a los papilomas. Luego, los genes virales tardíos son expresados en el estrato espinoso, y los viriones se hacen visibles. A medida que se diferencian las células, aumenta el número de viriones en el estrato granuloso, y luego en el estrato córneo de la piel, o en células no queratinizadas de mucosas. (Murphy F, 1999)

Los viriones unidos a receptores celulares, ingresan hacia el núcleo por medio de endocitosis, y ahí su cubierta es retirada para liberar su ADN. Durante la infección productiva, la transcripción del genoma viral se divide en etapas tempranas y tardías, que son controlados por promotores específicos y en la misma rama de ADN. Primero se transcribe la mitad del genoma, que contiene los genes tempranos, que forma ARNm que determina la síntesis de enzimas que participan en la replicación viral. El ARNm que determina la síntesis de las proteínas virales estructurales es transcrito desde la otra mitad del genoma, luego de que ha empezado la síntesis de ADN. Estas nuevas moléculas de ADN ayudan a aumentar la producción de proteínas estructurales. (Murphy F, 1999)

La replicación del ADN inicia en un único sitio de origen y continúa bidireccionalmente, terminando a 180° del origen. Al sitio de origen se une un complejo de iniciación, que desenrolla el ADN, permitiendo la formación de

nuevas cadenas a medida en que esto ocurre y en la dirección en la que se desarrolla. Luego, la cadena formada durante la separación del ADN se libera por la acción de enzimas virales específicas. (Murphy F, 1999)

Los viriones luego son ensamblados en el núcleo y son liberados durante la muerte celular, como consecuencia del reemplazo celular en el epitelio. Una célula infectada puede producir entre 10 mil a 100 mil viriones. Pero a diferencia de otros virus, el ADN de los PVs permanece de manera episómica, y no se integra al genoma celular. Los genes expresados codifican proteínas relacionadas con la replicación y transcripción viral, y que intervienen en la transformación celular a neoplasias. (Murphy F, 1999)

#### **4.1.1.- Mecanismos y regulación de la replicación del ADN de los PVs**

Para iniciar la síntesis de ADN desde los sitios de origen de la replicación conocidos como ori, los virus codifican una proteína E2 de reconocimiento y una helicasa E1 ADN replicativa. El resto de proteínas y otros sistemas anabólicos que sintetizan sustratos deoxinucleótidos, son provistas por el huésped. En las células que se encuentran cumpliendo su ciclo, la replicación del ADN viral mantiene una copia de números constantes de genomas virales por célula. En queratinocitos diferenciados que están en fases post-mitóticas, los PVs inducen a que las células del huésped regresen a la fase S y el ADN viral experimenta varias rondas de replicación para la producción de viriones. (Saveira M, 2006)

La organización del genoma, los patrones de transcripción, el procesamiento de ARN y los programas de reproducción, están bien conservados dentro de los PVs. Dentro de los queratinocitos basales y parabasales del epitelio escamoso, el ADN y ARNs viral están por debajo de la sensibilidad de detección. Por el contrario, en células espinosas, la amplificación del ADN viral es exitosamente bloqueada por las defensas del huésped. (Saveira M, 2006)

Las proteínas E1 y E2 están directamente involucradas en la replicación viral; y la E6 es utilizada para el mantenimiento de plásmidos virales

extracromosomales. El mecanismo de replicación de HPV y BPV-1 es similar. (Saveira M, 2006)

Las secuencias de origen de replicación viral están formadas por un sitio de unión (BS) a la proteína E1 (E1BS), rodeada por varias copias de E2BS; y la replicación depende de la codificación viral de E1 y E2. La E2 es la proteína primaria de reconocimiento ori, y juega un papel importante en el reclutamiento de E1 al ori. La E1 es la ADN helicasa replicativa. (Saveira M, 2006)

Para que se lleve a cabo la replicación se necesita de una maquinaria celular de replicación, que incluye una serie de factores, que interactúan entre sí para desenrollar el ADN e iniciar la replicación. (Saveira M, 2006)

Para que empiece la replicación se necesita del complejo de reconocimiento ori (ORC) y de una helicasa replicativa MCM, compuesta de dos subunidades mcm; además de otros factores. La replicación del ADN del papilomavirus es similar, pero más simple, que la replicación celular. (Saveira M, 2006)

Las secuencias de origen de los PV se localizan en la LCR o URR (upstream regulatory region). Estas bases solapan los elementos del promotor E1 al gen E6. Están además formadas por varios E2B, que rodean a E1BS, que es en donde las proteínas E1 se ensamblan formando la helicasa replicativa. (Saveira M, 2006)

Un eficiente inicio de la replicación necesita de la existencia de E1 y E2. La proteína E1 tiene poca afinidad y especificidad con el E1BS, por lo que para que su reclutamiento sea efectivo, se necesita la interacción con la proteína E2; pues bajo su acción, E1 deja de ser tan específico en sus ori, y la unión del ADN a oris no específicos se suprime. Esto conlleva a un gran mejoramiento del inicio de la replicación en oris específicos y a la desaparición de la replicación de oris no específicos. (Saveira M, 2006)

Las proteínas E1 y E2 de cualquier PV pueden iniciar la replicación de los oris de papilomavirus homólogos y heterólogos, debido a la conservación de las secuencias ori y de las proteínas virales de la replicación. Aunque si se

mezclan pares distintos de estas proteínas, su acción ya no es tan eficiente. En los genomas de todos los PVs, la terminal carboxilo de E1 siempre recubre la terminal amino de E2; y de esa forma permanecen compatibles para su interacción. (Saveira M, 2006)

Sin embargo, a pesar de que E2 es necesaria para la formación del complejo de replicación, esta proteína no forma parte del complejo; y en el caso de BPV-1 se requiere de ATP para desplazar E2 del complejo E1/ori. (Saveira M, 2006)

Para el desdoblamiento de las hélices de ADN son necesarios factores como la topoisomerasa I, proteínas de unión a una sola hélice de ADN (RPA o SSB); ATP y un sistema de regeneración de ATP. El desdoblamiento genera dos hélices solas en forma de lazo que salen de un complejo proteico central y que se van separando a medida que avanzan por los dos puertos de la helicasa bidireccional. La separación da como resultado un ADN en forma de U, compuesto por hebras libres circulares de ADN con algunas porciones de ADN lineal. (Saveira M, 2006) ANEXO 13

#### **4.1.2.- Proteínas que regulan la replicación del ADN de los PVs**

La p53 es una proteína supresora de tumores, y puede inhibir la amplificación de BPV en plásmidos. Todavía no se conoce exactamente como logra la inhibición de la replicación viral, pero se sabe, que ésta no es causada por una reducción en la expresión de proteínas virales, por suspensión del ciclo celular o apoptosis. (Saveira M, 2006)

Las funciones de las proteínas E1 y E2 son controladas por otras proteínas, conocidas como cdks, específicamente por la ciclina E/cdk2 y la ciclina A/cdk2. La ciclina E/cdk2 es muy importante durante el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, que determina el inicio de la replicación del ADN. Por otro lado, la ciclina A/cdk2 permanece activa durante la fase S, y es importante para el paso a la fase G2. La ciclina E/cdk2 es esencial para el inicio de la replicación, pues en el caso de BPV-1, el E1 se une y es estabilizado por esta ciclina; y luego de la replicación, E1 pierde estabilidad y se degrada. (Saveira M, 2006)

Dentro de la estructura de E1 existe una región conocida como LRR (Región reguladora de localización), que es la que controla la localización núcleo-citoplasmática de la proteína y que contiene elementos regulatorios que se encargan de la exportación e importación nuclear de los genes tempranos. (Saveira M, 2006)

La pérdida de las ciclinas A y E cuando regresan a la fase G o la senescencia, es seguida por la defosforilación de la helicasa E1, y es exportada del núcleo; lo cual determina el cese de la replicación viral de ADN. Por esta razón, el bajo nivel de expresión de genes virales junto con la fosforilación y defosforilación de E1 son factores claves para el mantenimiento de un estado latente durante infecciones permanentes. Por otro lado, durante la fase productiva en células diferenciadas, los altos niveles de expresión viral, y la retención nuclear de E1 durante la fase S, permiten la amplificación del ADN viral. (Saveira M, 2006) ANEXO 14

## **CAPÍTULO 5**

### **5.1.- PROTEÍNAS VIRALES DE REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN**

#### **5.1.1.- Proteína E1**

Es una proteína viral de 73k-Da necesaria para la replicación. Se une a secuencias específicas de ADN en el origen de la replicación viral y se ensambla a manera de complejos hexaméricos, con la ayuda de E2. Este complejo tiene una actividad helicasa e inicia el desenrollamiento del ADN para permitir así la base para la posterior síntesis de ADN. (IARC, 2007) ANEXO 15

La E1 interactúa además con la proteína de la replicación A (RPA), que permite la rápida estabilización de una hebra simple de ADN, generada por la actividad helicasa de E1. La interacción con la histona H1 juega un papel importante en el desenredamiento de la cromatina viral. (IARC, 2007)

#### **5.1.2.- Proteína E2**

El gen E2 de los PVs codifica una proteína de 40-45 kDa. Se utiliza como un factor de reconocimiento de origen viral. Es esencial para la regulación de la transcripción y replicación de ADN viral, mediante interacción con E1. La región media de E2, llamada “bisagra”, es importante para regular la estabilidad de algunas proteínas E2. (Saveira M, 2006; IARC, 2007) ANEXO 16

Luego de la interacción con el ADN, la E2 puede activar o reprimir la transcripción, dependiendo del tipo de promotores que actúan, el tipo de célula y el nivel de E2. La expresión de E2 está relacionada con una represión en la transcripción desde el promotor viral, pues se ha observado que bajos niveles de la proteína activan la transcripción viral del LCR, mientras que niveles más altos actúan como represores. Esta acción también ejerce un feedback negativo para el control de E6 y E7, pues la falta de E2 permite el aumento de los niveles de E6 y E7 que se observan típicamente en procesos de transformación celular. Por otro lado, se demostró que E2 solo activa la transcripción específicamente a nivel epitelial. (IARC, 2007; Saveira M, 2006)

Luego de la infección, los niveles bajos de E2 pueden activar la transcripción, seguido de una interacción con secuencias en el LCR. Sin embargo, a medida que avanza el ciclo de infección, la E2 ya no puede activar la transcripción desde el LCR, y actúa solamente como un represor transcripcional; además, que de esa forma actúa como un feedback negativo, y ayuda al control de las oncoproteínas E6 y E7. (Saveira M, 2006)

Además, la E2 juega un papel importante en la segregación del nuevo ADN viral replicado, para una distribución equitativa en las células hijas. Durante la mitosis, E2 se asocia con el ADN viral y con los centrosomas celulares, y de esta forma puede repartir el genoma viral a las células hijas. Por otro lado, al interactuar con L2, se produce la inactivación de función de transactivación de E2, aunque esta sigue cumpliendo con su función de replicación. Este es el mecanismo por el cual, durante la fase tardía del ciclo viral, la E2 deja de cumplir las funciones de transcripción, y se concentra más bien en la amplificación del ADN viral para facilitar la producción de la progenie. (IARC, 2007)

La E2 interactúa también con varias proteínas celulares, que están relacionadas con la respuesta del ADN frente a daños, por ejemplo, con la topoisomerasa I, con proteínas supresoras de tumores, y polimerasa I. Estas interacciones tienen relación con la replicación del ADN viral y en la protección del genoma viral cuando hay daño celular. (IARC, 2007)

E1 y E2 interactúan entre sí y con otros factores celulares, para poder replicar el genoma viral luego de una infección, y de esa forma, cumplir con el ciclo de vida del virus (Saveira M, 2006)

De acuerdo a varios estudios, se ha demostrado que la sobre-expresión de E2, determina la supresión de E6 y E7, lo cual estimula una reactivación de las vías de p53 y Rb, que conllevan a la detención del ciclo celular en la fase G1. Las proteínas E6 y E7 son muy necesarias para la proliferación de las líneas celulares infectadas, y su disminución puede ser útil para el tratamiento de infecciones. (Saveira M, 2006)

La pérdida de la proteína E2 provoca que deje de existir la represión para la codificación de los genes E6 y E7. Al aumentar la expresión de estos genes, se produce una interferencia con las proteínas p53 y Rb, lo cual desencadena una proliferación celular potencializada, y la pérdida de la estabilidad genética. Esta inestabilidad del genoma del huésped se relaciona con la integración viral. (Saveira M, 2006)

Además, la E2 tiene la propiedad de ser antiproliferativa y determinar la apoptosis; por lo que si se pierde su expresión, se provoca una proliferación celular y la supervivencia de mayor número de células. Estas acciones en conjunto pueden determinar que el papiloma llegue a convertirse en carcinoma. (Saveira M, 2006)

Por otro lado, la E2 actúa como mediador en la segregación del genoma en células hijas. En el caso de BPV-1, la E2 se asocia con la cromatina mitótica e interactúa con los genomas virales, actuando como un puente entre el genoma viral y la cromatina mitótica, de tal forma, que para la siguiente mitosis, los genomas virales están igualmente distribuidos en las células hijas. (Saveira M, 2006)

La E2 interactúa con varios tipos de proteínas cumpliendo diversas funciones al hacerlo. Estas proteínas incluyen: proteínas virales (E1, E2) con las que facilita la encapsidación del genoma; factores de transcripción basal (TFIIB, TBP) que activan o reprimen la transcripción; coactivadores transcripcionales (HATS, p300, pCBP, pCAF) con las que activa la transcripción, proteínas involucradas en la transcripción/replicación y otros factores de función no significativa. (Saveira M, 2006) ANEXO 17

Debido a la acción de E2 que permite la asociación del genoma viral con los cromosomas mitóticos, cualquier alteración en la E2 y su función, puede descontinuar el ciclo de vida viral, y por esta razón, los estudios se enfocan en esto para desarrollar tratamientos contra la infección. Sin embargo, al alterar la E2 se aumenta el riesgo de la presentación de cáncer. Lo que se busca es evitar la replicación del ADN en primer lugar, para así no permitir la formación

de sustratos para la integración viral, y por eso la E2 es el principal blanco. (Saveira M, 2006)

### **5.1.3.- Proteína E4**

La E4 es una proteína de fusión (E1-E4), y es la que más se expresa durante las infecciones por PV. Se considera que actúa como un regulador durante las fases productivas del ciclo de vida, es decir, durante la amplificación del genoma viral. El gen E4 se localiza en la región temprana, sin embargo, esta proteína se expresa principalmente durante las etapas tardías del ciclo viral. (Saveira M, 2006; IARC, 2007)

Esta proteína permanece presente durante todas las etapas de la morfogénesis del virión, pues se la encuentra durante el inicio de la amplificación del genoma, y persiste en las células, a medida que estas migran hacia capas superiores de las verrugas. La E4 es necesaria en el comienzo, progresión y finalización de las fases productivas del ciclo del PV. (Saveira M, 2006) ANEXO 18

La expresión de la E4 coincide con el inicio de la replicación vegetativa del genoma, durante la fase productiva del ciclo de vida. Estos eventos ocurren en las células que se han movido desde la capa celular basal y que han comenzado a diferenciarse. La presencia de E4 persiste a medida que las células migran de capas, y se la puede encontrar en células altamente diferenciadas, que expresan los genes de la cápside y sintetizan nuevos viriones. (Saveira M, 2006; IARC, 2007)

Se sugiere que la E4 puede ser expresada a niveles relativamente bajos durante la fase temprana de infección, y que puede regular negativamente la proliferación celular durante esta etapa. La E4 no interviene en el proceso de transformación del papiloma, y su expresión va disminuyendo progresivamente desde lesiones neoplásicas a cáncer. (Saveira M, 2006)

Esta proteína es encontrada fácilmente en verrugas y tumores mediante análisis inmunohistoquímicos. Su distribución en la célula es variable,

generalmente se localizan en el citoplasma, pero pueden encontrarse también en el núcleo. En lesiones cutáneas, la E4 se ensambla en inclusiones granulares, cuyo tamaño y forma dependen del tipo de virus. Sin embargo, la asociación de E4 con cuerpos de inclusión no es típica en infecciones de superficies mucosas, excepto en conejos. (Saveira M, 2006)

La E4 tiene la capacidad de asociarse al citoesqueleto de queratina, unirse a la mitocondria, y la habilidad para interferir con el progreso de la fase G2 a M del ciclo celular. (Saveira M, 2006) ANEXO 19

Entre las funciones de E4 se incluyen la de favorecer y mantener la amplificación del genoma viral, regular la expresión de genes, control de la maduración de virus y mediar la liberación de virus. La expresión de E4 va disminuyendo en lesiones neoplásicas que van transformándose en cáncer. (Saveira M, 2006; IARC, 2007)

Por otro lado, como ya se mencionó antes, la E4 interviene en la conformación del citoesqueleto. La E4 se asocia con la queratina de los filamentos intermedios (IF) de células epiteliales; también se asocia con microfilamentos de actina en los fibroblastos. La queratina cumple funciones de mantenimiento de la integridad celular, protección de tejidos epiteliales de estrés mecánico; interviene en procesos de migración celular, modulación de la apoptosis y regulación del crecimiento celular. (Saveira M, 2006)

Al alterar el citoesqueleto cambia la integridad estructural de las células infectadas en las capas más superficiales de la verruga, permitiendo que se rompan fácilmente liberando así las nuevas partículas virales en el ambiente. Además, que las células con un citoesqueleto alterado, son más sensibles a las señales de apoptosis. La E4 también interfiere con el crecimiento celular, pues induce el cese del ciclo celular en G2. (Saveira M, 2006; IARC, 2007)

La E4 también altera la estructura de la mitocondria, que puede ocasionar una disminución del potencial de membrana, que termina eventualmente en apoptosis. Y se une también a una serie de proteínas (CCE) que forman una estructura bastante resistente debajo de la membrana plasmática de los

queratinocitos diferenciados; y disminuye la fuerza de esta barrera, para que las partículas virales pueden salir más fácilmente al ambiente. (IARC, 2007)

La expresión de E4 provoca un paro en la fase G2 del ciclo celular de los queratinocitos y aunque todavía no se ha determinado bien el efecto de esta acción en la maduración y producción del virus, se sugiere que las células suprabasales, que son llevadas a fase S por E7, son mantenidas en la misma por E4 para maximizar la amplificación del genoma viral, y E4 provee los factores necesarios para la replicación del ADN viral. Es decir, que E4 mantiene a la célula infectada metabólicamente activa, sin competir con la síntesis del ADN del huésped, y estimula la replicación del virus. (IARC, 2007)

#### **5.1.4.- Proteína E5**

Es el gen de transformación más grande de BPV-1, pero la oncoproteína viral más pequeña conocida. Esta proteína puede ocasionar transformación oncogénica en cultivos celulares de tejidos inmortalizados de roedores, y en cultivos mortales de humanos en donde transforma los fibroblastos en focos, que luego se convierten en tumores; aumenta el potencial de E6 y E7, y junto con E7 estimula la proliferación de células primarias de ratón. Además, al unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico, puede intervenir en las señales y vías de transducción. (Saveira M, 2006; IARC; 2007)

En animales, la presencia de E5 está relacionada con la transformación de fibroblastos y células epiteliales a tumores de carácter benigno o maligno. En el sarcoide equino, las lesiones contienen transcriptores de E5 y expresan esta proteína. Además, en bovinos se relaciona con la formación de tumores en la vejiga. (Saveira M, 2006)

Otra función de E5 es que inhibe la comunicación intercelular mediante uniones gap y de esa forma, retira a las células transformadas del control homeostático de las células vecinas. También impide el transporte de proteínas importantes en las defensas orgánicas como el MHC I y II. Además, está en la capacidad de inhibir la apoptosis inducidas por ligandos Fas y por el factor de necrosis tumoral (TNF), y por luz UV. (IARC, 2007)

### **5.1.5.- Proteína E6**

La principal característica de la E6 es la capacidad para unirse y degradar la proteína supresora de tumores p53, lo que provoca la inhibición de su actividad transcripcional y la supresión total de la apoptosis. Además, la E6 se une a muchas otras proteínas celulares: coactivadores transcripcionales (p300,myc); proteínas involucradas en la polaridad y motilidad celular (paxilin, PD2); supresores tumorales e inductores de apoptosis (p53), y factores de replicación y reparación de ADN (mem7) (IARC, 2007)

La E6 induce la expresión y la actividad de la telomerasa, que conlleva a la inmortalización celular, mediante un mecanismo todavía no bien definido. La E6 puede cambiar las vías de transcripción celular, romper la adhesión celular y su arquitectura, inhibir la apoptosis, suprimir las respuestas frente a daños del ADN, inducir la inestabilidad del genoma e inmortalizar células. (IARC, 2007)

### **5.1.6.- Proteína E7**

La función principal de E7 se relaciona con la inhibición de la proteína supresora de tumores p105Rb, mediante la degradación y pérdida de esta proteína. Además, forma complejos con ciclinas e inactiva a los inhibidores de cinasas asociados a ciclinas, para la inmortalización celular y para suprimir las respuestas frente a daños en el ADN. (IARC, 2007)

Interactúa con reguladores negativos del ciclo celular causando una proliferación celular no programada; y puede desestabilizar a los centrosomas, provocando defectos mitóticos e inestabilidad en el genoma. (IARC, 2007)

### **5.1.7.- Proteína L1**

L1 es la proteína mayor de la cápside viral, formada por 72 pentámeros; tiene la capacidad de auto ensamblarse en partículas similares a virus (VLP), con los que se han realizado estudios a nivel experimental. Los viriones o VLPS se unen a las células, pero los capsómeros disociados no lo hacen, lo que sugiere que es necesaria la interacción entre capsómeros para unirse al receptor. (IARC, 2007; Freitas A y *et al*, 2007) ANEXO 20

Debido a que los viriones y los VLPs pueden unirse a líneas celulares de distintos orígenes, se ha sugerido que el receptor celular para los PVs está ampliamente expresado, y que la especificidad viral se relaciona con un segundo receptor epitelial al que se une L2. (IARC, 2007)

Aunque no se conoce claramente la naturaleza del receptor celular, se cree que es un componente proteico, pues al tratar la superficie celular con tripsina, los VLPs dejan de unirse. Se ha sugerido la participación de la integrina alfa-6-beta-1, integrina alfa-6-beta-4, el receptor de inmunoglobulinas Fc-gama-RIII; la CD16 y los glicosaminoglicanos, como los receptores primarios del virus. (IARC, 2007)

#### **5.1.8.- Proteína L2**

Es una proteína de unión a ADN, muy importante para la encapsulación del genoma viral. Es la proteína menor de la cápside de los PV, y tiene otras funciones además de papel estructural. Contribuye a la unión de los viriones a los receptores celulares, facilita el ingreso del virión y su transporte hacia el núcleo, entrega el ADN viral a los centros de replicación, ayuda a empaquetar el ADN viral dentro de las cápsides y, debido a que los L2 de varios PV tienen un epítipo común de neutralización, puede actuar como un instrumento para dar inmunidad hacia varios tipos de virus. (IARC, 2007; Freitas A y *et al*, 2007)

L2 interactúa con la superficie celular luego de que la cápside se ha unido. Esto sugiere, como ya se mencionó antes, que existen varios receptores celulares para el virus, y que luego de la interacción de baja especificidad entre L1 y los receptores celulares, ocurre un cambio en la conformación de la cápside, que le permite a L2 exponer sus epítopos e interactuar con el receptor secundario más específico. (IARC, 2007)

Después del ingreso del virus, la L1 permanece ampliamente distribuida en el citoplasma, mientras que L2 tiene una distribución radial alrededor del citoplasma y se acumula en la región perinuclear, lo cual sugiere que L2 ayuda en el transporte de las cápsides a través del citoplasma, por medio de cables de actina. (IARC, 2007)

La L2 deposita el ADN viral en los ND10s, acción muy importante para una transcripción y replicación del genoma viral eficiente; y recibe el apoyo de E2. En etapas más tardías del ciclo de vida del virus, la unión de la recién sintetizada L2 al ADN viral, y la dispersión de los ND10s por acción de E4 facilitan el ensamblaje de la cápside. (IARC, 2007)

## **5.2.- RESPUESTA SEROLÓGICA**

En recientes estudios se ha demostrado que existe una sero-reactividad pequeña hacia viriones o proteínas virales denaturalizadas, lo que sugiere que los anticuerpos producidos en paciente infectados solamente reconocen a los epítomos conformacionales en la superficie del virus. (IARC, 2007)

La proteína L1 puede ensamblarse en sí misma formando capsómeros o VLPs. La estructura repetitiva de las cápsides es altamente inmunogénica, y la vacunación con VLPs de L1 da un alto título de anticuerpos neutralizantes que protegen contra la infección. Estos anticuerpos reaccionan con epítomos conformacionales de L1, que son tipo-específicos. (IARC, 2007)

Por otro lado, la L2 está incorporada dentro de las cápsides, y aunque no es necesaria para formación de la cápside, es esencial para la encapsidación del genoma y su infectividad. La L2 en su mayoría permanece dentro de la cápside viral, pero existe un pequeño segmento que está expuesto en la superficie y puede inducir la formación de anticuerpos neutralizantes; aunque estos suelen ser menos potentes que los generados por L1. (IARC, 2007)

### **5.2.1.- Respuesta Inmune a los PV**

La respuesta inmunológica a los virus ha sido mejor estudiada en HPV, en los que no se observa una reacción cruzada de anticuerpos contra PV, es decir, que la respuesta inmune es tipo-específica. Se ha observado que el suero reacciona de distinta forma a distintos tipos de PV, y que puede contener múltiples anticuerpos tipo-específicos en una sola reacción, más que anticuerpos de reacción cruzada. Además, existe una mayor correlación entre

la seropositividad a un determinado PV y la detección del ADN de este tipo de virus, que la detección de un ADN distinto al virus específico. (IARC, 2007)

Según las investigaciones, se ha planteado la hipótesis de que los anticuerpos frente a E6 y E7 se desarrollan como consecuencia de una exposición prolongada al tumor; pues estas proteínas se encuentran presentes en carcinomas de células escamosas. En humanos se ha detectado la presencia también de anticuerpos contra E2 y E4 asociados con cáncer cervical; mientras que en conejos infectados con CRPV, se han detectado anticuerpos frente a E2 pero no E4. (IARC, 2007)

La exposición prolongada o repetida hacia los antígenos de los PV es necesaria para poder desarrollar una respuesta humoral detectable; y según algunos estudios realizados en humanos, se ha observado que hay una expresión más abundante y frecuente de L1 en lesiones premalignas, lo cual sugiere que las neoplasias intraepiteliales expresan mayores niveles de L1 determinando así una respuesta humoral más cuantificable. (IARC, 2007)

En infecciones por HPV, específicamente por el HPV 16 causante de cáncer cervical, se ha observado inicialmente la producción de inmunoglobulina (Ig) G, que es un proceso lento, con una latencia de 6 a 12 meses, y con títulos bajos; y la adquisición de anticuerpos se relacionada con infecciones persistentes. Luego de la IgG, aparece la IgA, que es detectable alrededor de 10 meses en secreciones cervicales o 19 meses en el suero, luego de la infección por HPV-16; y que se pierden rápidamente. Sin embargo, la producción de anticuerpos frente a los PVs todavía no está bien comprendida. (IARC, 2007)

### **5.2.2.- Patogenicidad vs. Latencia**

Las infecciones por PV son una de las causas más importantes para la presencia de verrugas genitales y el desarrollo de cáncer cervical. Pero aún así, no se puede clasificar a estos virus como agentes neoplásicos agresivos; pues existen un gran número de tipos de HPV en la piel de individuos asintomáticos, de la misma forma que hay tipos de virus en pacientes sanos, que pueden ocasionar lesiones más serias en pacientes susceptibles. Incluso

los tipos de PV considerados de alto riesgo, solamente dan lugar a la formación de neoplasias, bajo contextos de transformaciones en zonas corporales específicas, mientras ocasionan infecciones subclínicas en otras zonas. (Garcea R, 2007)

Todas estas circunstancias han determinado que el PV posee un ciclo de vida, que no necesariamente lleva a neoplasias clínicamente detectables, sino que más bien se trata de un ciclo de vida comensal “episódico”. (Garcea R, 2007)

## **CAPÍTULO 6**

### **6.1.- PAPILOMAVIRUS BOVINO**

Existen diferentes tipos del virus del papiloma bovino (BVP) que causan lesiones específicas con características histopatológicas diferentes. Son microorganismos especie-específicos, incluso durante condiciones experimentales, e infectan solamente a su huésped natural. El único caso que se ha reportado de contaminación cruzada es la infección de caballos y otros équidos con BVP-1 y BVP-2. El estudio del BVP ha permitido conocer más acerca de la biología del virus, la relación directa entre la infección y la neoplasia, la relación entre virus, huésped y ambiente, la respuesta inmune del huésped frente al virus y en el desarrollo de las primeras vacunas. (Saveira M, 2006)

#### **6.1.1.- Heterogeneidad del BPV**

Se han reconocido al menos 6 tipos bien definidos de BVP, los cuales han sido clasificados en 2 subgrupos, A y B, dependiendo de la estructura del genoma y su patología. (Saveira M, 2006)

El subgrupo A incluye BVP-1, BVP-2 y BVP- 5; que son definidos generalmente como virus de fibropapilomas, es decir que infectan tanto el epitelio así como la dermis superficial, dando origen a los fibropapilomas. El subgrupo B incluye a BVP-3, BVP-4 y BVP-6, que son solamente epiteliotropos, infectando solo al epitelio y produciendo papilomas verdaderos. (Saveira M, 2006)

Estos subgrupos han sido reclasificados, de tal forma que el subgrupo B son conocidos como Xi-papilomavirus; y BVP-1 y BVP-2 son delta-papilomavirus. El genoma de BVP-5 comparte características de los XI y delta papilomas, y tiene una patología dual causando tanto fibropapilomas como papilomas epiteliales; por lo que este tipo de virus forma el grupo Epsilon-papilomavirus. Además se han reportado recientemente 13 nuevos BPV que aún no han sido clasificados dentro del grupo xi, delta o épsilon. (Saveira M, 2006)

En los últimos años se han estado investigando alrededor de 15 nuevos tipos de BPV; y se han aceptado cuatro nuevo tipos obtenidos de aislados japoneses, cuyas secuencias genómicas han sido completadas, y se les ha dado la clasificación de BVP-7, -8, -9 y -10. Además, se han identificado 4 nuevos posibles tipos en lesiones cutáneas del ganado en Brasil (BPV-BR/UEL2 a 5). (Claus M y *et al*, 2009) ANEXO 21

En el año 2007 se completó la secuencia genética del BPV-8, que fue inicialmente detectado en papilomas y en piel sana de la ubre del ganado en Japón. Se ha identificado también una variante de este tipo, el BPV-8EB, en lesiones del visón europeo de Eslovaquia; y hace 2 años se realizó un estudio para identificar este tipo de BPV en el ganado de Brasil. (Claus M y *et al*, 2009)

De acuerdo a las investigaciones, los genomas de los PV parecen ser muy estables, por lo que es poco común que se presenten mutaciones o recombinaciones. La identificación del BPV-8 en 3 continentes distintos y en tan poco tiempo, sugiere que este tipo de virus ya existía previamente; y que puede tener una diversidad tan grande como la de los HPV. (Claus M y *et al*, 2009)

### **6.1.2.- Virión, genoma y transcripción**

Independientemente del lugar o tipo de lesión, el virión del BPV tiene una morfología y estructura constantes. Se trata de un virus sin envoltura, de estructura icosaédrica de alrededor 55-60 nm de diámetro, que forma despliegues paracrystalinos en el núcleo de las células que infecta. Contiene ADN doble circular que se une a histonas celulares. La cápside viral está formada en su mayoría por las proteínas L1 mayor y L2 menor. (Saveira M, 2006)

El genoma de BPV-1, BPV-2 y BPV-5 está formado por una doble hélice cerrada circularmente, y que contiene alrededor de 8000 nucleótidos (nt); mientras que en BPV-3, BPV-4 y BPV-6 solamente presentan alrededor d 7300 nt. (Saveira M, 2006)

BPV-1, BPV-2 y BPV-5 tienen una configuración de genes muy similar, mientras que los delta papilomas carecen del gen E6, que es reemplazado por el gen E8, cuyas acciones y funciones son muy similares a la E5 de BPV-1. (Saveira M, 2006) ANEXO 22

El gen E2 es el regulador de la transcripción viral, y su unión a LCR activa o suprime la transcripción de los genes virales. En el caso de BPV-4, que puede cambiar la presentación del papiloma a formas neoplásicas, E2 tiene afinidades diferentes en sus sitios de unión, y la unión a estos sitios diferentes tiene distintos resultados. Por ejemplo al unirse E2 con los partes distales de los sitios 3 y 4, produce una activación de la transcripción; mientras que al unirse a la zona proximal de los sitios 1 y 2 se suprime la transcripción epitelial de manera específica. (Saveira M, 2006)

El LCR de BPV-4 contiene también elementos reguladores positivos y negativos que interactúan con diferentes factores de transcripción celular. La regulación de la transcripción de BPV-4 es un circuito muy bien equilibrado, en el que actúan elementos de control positivos y negativos, virales y celulares que contribuyen a la expresión de los genes virales de manera regulada temporal y espacialmente. Si este equilibrio no se mantiene, el resultado generalmente es la transformación de las células a un estado neoplásico. (Saveira M, 2006)

### **6.1.3.- Transcripción viral**

La expresión de los genes virales ocurre a través de una serie compleja de ensamblaje de patrones de ARN, que procesan el ARNm maduro a partir de precursores policistrónicos de ARN en delta y xi papilomavirus. De manera general, las transcripciones tardías que codifican las proteínas estructurales son encontradas solamente en capas más diferenciadas de las verrugas y otras lesiones productivas; mientras que el ARN que codifica las proteínas tempranas, es encontrado tanto en verrugas así como en células transformadas. (Saveira M, 2006)

#### **6.1.4.- Proteínas BPV en Papilomas y células transformadas**

Los delta-BPV codifican tres oncoproteínas: E5, E6 y E7; mientras que los xi-BPV carecen del gen E6, y solo codifican E5 y E7. La importancia relativa de cada proteína en la transformación de células varía entre los distintos tipos de BPVs. Por ejemplo, en el caso de BPV-1, la principal y mayor oncoproteína es E5, seguida de E6, y con un papel menos importante E7. En el caso de BPV-4, E5 y E7 son las proteínas transformadoras. E5 promueve la adquisición de un crecimiento independiente de anclaje, y E7 induce una ventaja de crecimiento y aumenta el tiempo de vida. (Saveira M, 2006)

E6 es un activador de la transcripción, pues interactúa e inhibe la transcripción del coactivador CBP/p300, e inhibe así también la función de p53; que conducen a la inactivación de la detención del ciclo celular y de apoptosis. E6 se une a las proteínas de adhesión focal y bloquea la interacción entre ellas, provocando crecimiento y ruptura del citoesqueleto. Además, el gen E6 interactúa con AP-1, el complejo adaptado específico de clathrina, que afecta a los procesos y vías celulares. (Saveira M, 2006)

E7 trabaja conjuntamente con E6 y E5 en el proceso de transformación celular; aunque aún no se ha definido exactamente la función específica que cumple. En BPV-4 la proteína tiene un dominio específico en su estructura, que puede mutar e influir en la transformación celular. (Saveira M, 2006)

Las proteínas de E5 en BPV-1 y -4, son las oncoproteínas más estudiadas de este virus. Es una proteína muy hidrofóbica con un alto contenido de leucina, que se ubica principalmente en el aparato de Golgi, y se une a la subunidad 16k c de la ATPasa H<sup>+</sup> vacuolar, inhibiendo la comunicación intercelular por medio de uniones gap, y la falta de acidificación de los endosomas y el aparato de Golgi. (Saveira M, 2006)

La falta de comunicación en las uniones gap en células transformadas de papilomavirus es probablemente un evento temprano en la transformación, y mediante el aislamiento de las nuevas células infectadas de sus células

vecinas, pueden desarrollarse otros eventos de transformación. (Saveira M, 2006)

La inhibición en la acidificación de los endosomas y el aparato de Golgi, lleva a la ruptura del procesamiento y tipificación de proteínas celulares, que resulta en la retención y reciclaje de receptores de factores de crecimiento activados de los compartimientos endosomales. Además, la E5 de BPV-1 interactúa con receptores específicos, que potencializan la respuesta de la mitosis, inhibiendo los receptores de regulación. E5 activa varias proteincinasas involucradas en el control del ciclo celular, causando así, una desregularización general del programa normal de control de proliferación celular. (Saveira M, 2006)

La proteína E5 de BPV-5 interactúa con el factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-b). Esta interacción ocurre en casos de tumores de la vejiga urinaria, es decir, que E5 cumple un rol importante durante la carcinogénesis. Por otro lado, se ha observado que en cultivos celulares, puede transformar los fibroblastos, sin que se active el factor de crecimiento, y esto lo hace a través de la activación de un no receptor llamado PRK c.Src, que actúa como regulador de la proliferación y supervivencia celular. (Saveira M, 2006; Borzacchiello G y *et al*, 2006)

BPV-1 puede transformar por sí misma células primarias fetales bovinas (PaIF), y de esa forma codificar todo la información genética necesaria para la transformación celular, BVP-4 no puede hacerlo. Sin embargo, E5 y E7 de BPV-4 cooperan con la actividad oncogénica para la transformación morfológica de las células PaIF, aunque estas células no son inmortales ni tumorosas. En los Xi-BPV no es necesario el gen E6 para el ciclo de infección ni para la transformación del papiloma en un carcinoma. La tumorigenicidad se logra mediante una inducción en las células PaIF de un gen mutante de p53; es decir que se requiere una disfunción de p53 para la transformación celular. (Saveira M, 2006)

La consecuencia de la falta de E6 en la abrogación de las funciones de p53 necesarias para la transformación celular, es resaltada por la capacidad del

ADN de BPV-4 de transformar fibroblastos sin p53 por sí solos. Es decir, que en casos de ausencia de E6 o de sus funciones, el control de la p53 es realizado por cofactores, durante el proceso de desarrollo del papiloma hacia neoplasia y finalmente carcinoma. Se ha observado la mutación del gen de p53 en algunos papilomas y carcinomas. (Saveira M, 2006)

## **CAPÍTULO 7**

### **7.1.- GENERALIDADES DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA**

La papilomatosis bovina es el tipo de papilomatosis animal con mayor estudio. Esta enfermedad induce a la presentación de papilomas del epitelio cutáneo y mucoso del ganado. Son considerados como tumores benignos y muchos tienen regresión espontánea antes de causar problemas al huésped; aunque existen casos en los que se tornan crónicos y pueden actuar como un foco para transformaciones malignas a carcinoma de células escamosas, influenciado por otros factores. Los BPV son los causantes de tumores y cáncer en la vejiga urinaria y en el del tracto digestivo superior, principalmente en ganado alimentado con helecho común. Aunque pueden presentarse a cualquier edad, los animales más afectados suelen ser los terneros. (Saveira M, 2006; Murphy F, 1999)

### **7.2- ETIOLOGÍA**

Las verrugas cutáneas en el ganado, caballos, ovejas y cabras son causadas por tipos virales especie específicos. Los distintos tipos de BPV son asociados con diversas lesiones corporales. (Murphy F, 1999) ANEXO 23

BPV-1, -2 y -5 producen lesiones “teat frond”, verrugas cutáneas comunes y fribropapilomas en forma de “granos de arroz”. Estas lesiones presentan una cubierta fibrosa de profundidad variable en el epitelio escamoso estratificado, cuyas capas más superficiales están hiperqueratinizadas. Las verrugas pueden variar en tamaño, pues pueden ser desde pequeños nódulos firmes hasta grandes crecimientos en forma de coliflor. Son de color grisáceo o negro, y son duras y espinosas al tacto. Las lesiones más grandes son susceptibles a abrasión y pueden sangrar. Comúnmente se desarrollan en la ubre y pezones, en cabeza, cuello y hombros; y en otros casos han sido encontradas en el omaso, vagina, vulva, pene y ano. (Murphy F, 1999)

Los BPV-3, -4 y -6 producen en cambio, lesiones cutáneas y epiteliales sin proliferación de fibroblastos. Las verrugas causadas por BPV-3 suelen ser

persistentes, planas y de base ancha; a diferencia a los Fibropapilomas, que protruyen y son pedunculadas. Las lesiones por BPV-4 se desarrollan solamente a nivel de mucosas gastrointestinales y vesicales, y pueden terminar como carcinoma de células escamosas. (Murphy F, 1999)

Los virus no pueden ser cultivados, y la diferenciación se basa en el tipo de lesión, análisis de ADN, hibridación y PCR. En el ganado bovino, se conocen mejor 6 tipos de virus, aunque recientemente se han identificado nuevos. Estos tipos incluyen: (Radostits O y *et al*, 2005) ANEXO 24

- BPV-1: papiloma frondoso de la piel de pezones, y fibropapiloma en el pene
- BPV-1 y -2: fibropapiloma de la piel de la zona anteroventral del cuerpo, incluyendo la frente, cuello y espalda. Verrugas comunes.
- BVP-2: Fibropapilomas en forma de coliflor en la piel ventral del abdomen y región anogenital. Se asocia con Cáncer de vejiga en el ganado.
- BPV-3: papiloma cutáneo
- BPV-4: papiloma de esófago, estómagos e intestino delgado. Puede ser maligno, sobre todo en animales que consumen helecho. Tiene especificidad por el TGI superior y ocasiona papilomas orales, principalmente en animales adultos.
- BPV-5: fibropapiloma en forma de granos de arroz en la ubre.
- BPV-6: papilomas epiteliales frondosos, en la ubre y pezones.

Los virus ocasionan lesiones a nivel de laringe y puede terminar en carcinoma de células escamosas. En otros animales, se relacionan a los virus con la presencia de sarcoide equino, y cáncer de oreja en las ovejas. (Radostits O y *et al*, 2005)

### **7.3.- EPIDEMIOLOGÍA**

La papilomatosis se presenta en una gran variedad de especies animales, y en todo el mundo. El virus se transmite entre los animales, por el uso de sogas contaminadas, narigueras, equipo de areteado, postes y otros elementos

contaminados. Es común que los animales que son sometidos a grooming para exposiciones, puedan desarrollar lesiones extensas. Se sugiere además, que la transmisión sexual es posible, pero las lesiones por inseminación artificial son raras. La enfermedad es más común en animales estabulados, en donde también ocurre el contagio a caballos. (Murphy F, 1999; Radostits O y *et al*, 2005)

La ruta de transmisión de los BPV no está aún bien definida, pero de acuerdo a los patrones de infección, el virus puede encontrarse en el ambiente, en los postes de madera de las cercas, o en las manos humanas, y se transmiten a través de piel lesionada. Las lesiones genitales sugieren que puede haber transmisión durante procesos reproductivos. (Niece K, 2010)

El contagio se da por contacto directo con animales infectados, principalmente a través de lesiones a nivel cutáneo. El virus puede permanecer en objetos inanimados en las instalaciones, e ingresar en los animales que se rascan o entran en contacto con ellos. Las verrugas pueden aparecer alrededor de los aretes, en sitios de marcaje o a lo largo de abrasiones causadas por las cercas; y puede transmitirse la enfermedad por el uso de tatuajes, instrumentos de descorne, y por procedimientos médicos, como la prueba de tuberculosis. (Radostits O y *et al*, 2005)

A nivel perianal, la transmisión ocurre por examen rectal en chequeos ginecológicos, sobre todo en vaconas. Existe una alta prevalencia de papilomas en la laringe en lotes de terneros de engorde que tienen úlceras a través de las cuales ingresa el virus, y por donde también pueden ingresar otros patógenos como *Fusobacterium nodosus*, ocasionando más de una enfermedad. (Radostits O y *et al*, 2005)

Se ha encontrado ADN viral infeccioso en tejidos reproductivos del ganado y también en tejidos embrionarios. También se ha encontrado ADN de BPV en otros fluidos corporales y tejidos no epiteliales. Los linfocitos de la sangre periférica de animales infectados con BPV tienen un alto índice de aberraciones cromosómicas que tienen un potencial oncogénico. Esto

demuestra que puede haber co-infección de otros tejidos y células, y que los linfocitos, líquido seminal y espermatozoides son potenciales transmisores de la papilomatosis. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

Recientemente se ha observado que las infecciones por BPV y sus tumores asociados, pueden transmitirse a través de suspensiones de lesiones hemangiomas de la vejiga urinaria; y que la sangre de los animales infectados transmite el virus a animales sanos y al ambiente. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

Se ha podido identificar ADN de BPV-2 y BPV-4 en tejidos embrionarios y en tejidos del tracto reproductor femenino de vacas enfermas, demostrado que el virus puede encontrarse en otros tejidos además del epitelio cutáneo. En la leche, orina y semen se han encontrado altos contajes de linfocitos y células similares a epitelio, al igual que señales de restos celulares. El semen de toros altamente infectados presenta azoospermia. En estas muestras y en otras de sangre periférica se ha identificado ADN de BVP-2 y BPV-4. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

La presencia de ADN viral en fluidos corporales como leche, sangre y semen ha demostrado que la transmisión del virus se da por otros mecanismos, además del contacto directo con epitelio o instrumentos contaminados. La monta y la lactancia son los principales medios para el intercambio directo de fluidos corporales entre el ganado, por lo que son mecanismos muy importantes para la transmisión del virus. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

Además, se han analizado muestras de semen congelado usado en reproducción, y en ellas se ha encontrado también ADN viral, por lo que la inseminación artificial puede ser también un mecanismo para la transmisión de la papilomatosis; al igual que los PV de orina que contaminan los pastos, sobre todo los BPV-2; que además de contagiar a otros bovinos, puede infectar también a los equinos. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

Se ha detectado también ADN de BPV-2 en espermatozoides de toros infectados, que puede ocasionar infección a nivel embrionario durante la concepción, característico de una transmisión de tipo vertical; que ha sido confirmada por el hallazgo de ADN de BPV-2 en la sangre de terneros neonatos, incluso en aquellos que han nacido por cesárea. La transmisión intrauterina del virus puede ocurrir durante la concepción o a lo largo de todo el desarrollo embrionario y fetal. Además, que la azoospermia de los toros infectados determina que el virus afecta directamente a la producción espermática al infectar las células germinales de las gónadas. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

En los linfocitos de sangre periférica se ha identificado altos títulos de ADN de BPV-2, y se sugiere que estas células sanguíneas pueden albergar PV y actúan como sitios latentes de la infección viral y potenciales vectores para la diseminación de la enfermedad, en un mismo individuo y entre varios animales. En los fluidos corporales, como leche, orina y semen, los PV pueden estar dentro de los linfocitos o en células epiteliales exfoliadas. Experimentalmente se ha contagiado a animales sanos mediante la inoculación de sangre de animales infectados con BPV-2, confirmando que el genoma viral en la sangre es infeccioso. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

Los linfocitos son considerados los principales vectores para la diseminación del virus dentro de un organismo hacia distintos tejidos, y actúan como portadores del virus en fluidos corporales. Además, que recientemente se ha encontrado la expresión de L1 de BPV-2 en los linfocitos, sugiriendo que parte del ciclo biológico del virus se lleva a cabo en estas células. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

## **7.4.- FACTORES DE RIESGO**

### **7.4.1.- Factores animales**

Aunque todos los animales pueden ser susceptibles a la enfermedad, la papilomatosis se presenta con mayor frecuencia en caballos y principalmente en vacas. Se han reportado casos en ovejas y cabras pero con muy poca

incidencia. La enfermedad es poco común en cerdos, en los que afecta sobre todo en la región genital. (Radostits O y *et al*, 2005)

#### **7.4.2.- Edad**

La presencia de lesiones en la cabeza y cuello ocurre principalmente en animales jóvenes que son menos inmunocompetentes; se considera que los adultos son menos sensibles a la infección debido a una inmunidad adquirida por infecciones aparentes e inaparentes cuando fueron jóvenes. La cantidad de lesiones y su severidad son influenciadas por factores que ocasionan inmunosupresión, que pueden determinar que una infección latente se manifieste clínicamente. Se han registrado casos de infección congénita tanto en potros como en terneros, pero son infrecuentes. Los papilomas en la región del sistema gastrointestinal asociado a BPV-4 y en la zona de glándula mamaria asociado a BPV-5 persisten y se presentan en cualquier edad. (Radostits O y *et al*, 2005)

#### **7.4.3.- Parásitos**

De acuerdo a un estudio llevado a cabo en Egipto, las garrapatas juegan dos papeles importantes en el desarrollo de la papilomatosis: primero, estas perforan la piel y crean puntos de entrada directos en el tejido cutáneo para el ingreso de los virus y su infección. Y segundo, las garrapatas absorben grandes volúmenes de sangre de animales infectados y secretan sustancias específicas con sus glándulas salivales que dañan la barrera de la piel e impiden la coagulación, y que tienen efectos inmunosupresores: sobre todo disminuyen la producción de la IL-6 e IL-10 por parte de los Th2; lo cual promueve la infección viral. (Salib F y Farghali H, 2011)

Además los nemátodos gastrointestinales y las fasciolas hepáticas actúan también como mecanismos inmunosupresores facilitando la infección viral; pues disminuyen los niveles normales de Fe, Mo, Cu y Zn; mientras que la fasciola afecta a la respuesta de Th1. (Salib F y Farghali H, 2011)

#### **7.4.4.-Factores inmunosupresores**

Los factores inmunosupresivos juegan un papel importante en la progresión de la papilomatosis, incluyendo los parásitos internos y externos. De la misma forma, la presencia de sustancias inmunosupresoras del hebrecho, favorece el desarrollo de cáncer. (Salib F y Farghali H, 2011)

#### **7.5.- PATOGENIA**

El proceso de patógeno de la enfermedad se relaciona directamente con una débil respuesta inmunológica. Las lesiones papilomatosas ocurren luego de que el virus ha ingresado en el huésped, a través de abrasiones o heridas en la piel. La infección de las células epiteliales lleva al desarrollo de hiperplasia, seguida de degeneración epitelial e hiperqueratinización. Estos cambios generalmente se presentan entre 4 a 6 semanas después de la infección inicial. Las lesiones hiperplásicas iniciales se describen como verrugas, papilomas o condilomas; que usualmente son benignas, pero pueden experimentar una transformación neoplásica, influenciada principalmente por factores ambientales. (Murphy F, 1999; Freitas A y *et al*, 2007)

El virus infecta los queratinocitos basales, y replican su genoma en las capas diferenciadas espinosa y granular, causando el crecimiento excesivo típico de la formación de verrugas. El tumor contiene tejido epitelial y conectivo, y puede ser un papiloma o un fibropapiloma, dependiendo si contiene poco tejido conectivo o más bien tejido fibroso con poco tejido epitelial, respectivamente. Los papilomas ocurren como resultado de una hiperplasia celular sin producción de antígenos virales. Puede desarrollarse una infección latente a nivel cutáneo y de linfocitos. (Radostits O y *et al*, 2005)

Las lesiones de Fibropapilomas persisten por al menos 4 o 6 meses antes de que ocurra la regresión espontánea, y muchas de las verrugas suelen tener una regresión simultánea. Las fases en los patrones de desarrollo de los papilomas todavía no han sido establecidas claramente; sin embargo, se sugiere que en la fase 1, los papilomas aparecen como placas ligeramente

elevadas después de 4 semanas de la exposición al virus. En la fase 2, las lesiones se caracterizan por ser citopatológicas, con replicación viral y con agregados cristalinos de viriones; que se pueden observar a las 8 semanas luego de la infección. En la fase 3, los papilomas se caracterizan por tener bases pedunculadas y fibróticas, con superficies duras, lobulares y fungiformes, que aparecen a las 12 semanas. El nivel de anticuerpos neutralizantes parece estar relacionado con la regresión de lesiones y con la protección contra la reinfección. (Murphy F, 1999)

Las transformaciones neoplásicas y las acciones virales oncogénicas incluyen la expresión de oncogenes virales dentro de la célula del huésped, que corresponden a los genes tempranos. Estas oncoproteínas alteran el control del ciclo celular, mediante la interacción con p53 y pRb, determinando anomalías genéticas. (Freitas A y *et al*, 2007)

Se ha mencionado que los virus no se diseminan por la sangre y que no existe una fase de viremia; sin embargo, se ha en el ganado se ha detectado ADN de BPV en la sangre periférica de animales infectados. En cultivos de linfocitos de bovinos infectados se han observado también anomalías cromosomales, lo que es una evidencia de la presencia del genoma viral en los linfocitos; aunque se ha sugerido que estos linfocitos pueden ser el sitio para la latencia del virus. (Freitas A y *et al*, 2007)

Aunque el virus BPV se ha caracterizado por ser un virus epiteliotropo, se sugiere que también puede encontrarse la presencia del virus en otros fluidos corporales como sangre completa, plasma, leche, calostro, placenta y líquido amniótico. (Freitas A y *et al*, 2007)

## **7.6.- PRESENTACIÓN CLÍNICA**

El desarrollo de la papilomatosis ocurre principalmente en el ganado joven, y los animales a medida que maduran, desarrollan una respuesta inmune hacia el virus, de tal forma que las lesiones desaparecen sin dejar señales. La enfermedad se da sobre todo en animales jóvenes de exposición o toros de pura raza listos para la venta; debido a que su sistema inmune se encuentra en

una etapa en la que pierden la inmunidad maternal calostrada y se encuentra en desarrollo su propia inmunidad frente a los virus y bacterias del ambiente. Debido a las características virales, el sistema inmune no recibe una estimulación suficiente, y por eso tarda tanto la desaparición de las lesiones. (Pence M, 2008?) ANEXO 25

Las verrugas se observan como sobrecrecimientos sólidos de la epidermis, que se desarrollan en cualquier zona corporal. En el ganado, las lesiones se observan sobre todo en animales menores de 2 años, en la zona de la cabeza, alrededor de los ojos; en el cuello y en los hombros. Las lesiones varían en tamaño, desde 1 cm de altura, y son secas, con cuernos y tienen una apariencia típica con forma de coliflor. En la mayoría de animales la regresión es espontánea, aunque las lesiones persisten por varios meses, desde 5 hasta 18 meses, con grave pérdida de condición corporal. (Radostits O y *et al*, 2005)

Los PVs infectan las células epiteliales basales, estas células proliferan y el genoma viral se mantiene como un episoma dentro del núcleo. A medida que las células se diferencian y migran hacia capas superiores, empieza la replicación vegetativa del ADN viral. En el estrato granuloso se expresan los antígenos de la cápside y se ensamblan las partículas del virión. La capa más externa del epitelio, el estrato córneo, contiene partículas del virión que son expuestas desde la epidermis. (McBride A y *et al*, 2000)

**Verrugas en pezón:** Se presentan de formas diferentes, según el tipo de papilomavirus, y pueden aumentar en frecuencia con la edad. La forma frondosa tiene proyecciones filiformes y su forma alargada de 1 cm puede deberse a la máquina de ordeño. Pueden ser arrancadas fácilmente. (Radostits O y *et al*, 2005)

También existe de forma tipo plano y redondeado de hasta 2 cm de diámetro y en forma de grano de arroz. Los papilomas en el pezón pueden desaparecer y permanecer latente en el tiempo que se seca la vaca pero pueden patogenizarse y reaparecer en la siguiente lactancia. (Radostits O y *et al*, 2005)

**Verrugas genitales:** Las verrugas en la zona perianal son antiestéticas, pero no influyen significativamente en la producción; sin embargo, las lesiones a nivel genital tanto en hembras como en machos, dificultan la reproducción, pues las lesiones suelen ser de gran tamaño, friables y sangran fácilmente, además que generalmente se infectan y se complican con miasis. Las verrugas en esta región deben ser tratadas inmediatamente. (Radostits O y *et al*, 2005)

Se realizó un estudio en Brasil para comprobar la presencia de PV, específicamente BPV-2 en ovarios, útero, oocitos y secreciones. Este estudio se realizó por medio de análisis de PCR con primers específicos del BPV-2, y en él, se evaluaron dos vacas que se encontraban en una región con alta incidencia de papilomatosis, pero que clínicamente no mostraban verrugas. Una de las dos vacas dio positivo a la presencia de ADN de BPV-2 en muestras de útero, ovarios y oocitos. Este es el primer caso en el que se identifica papilomavirus en este tipo de tejidos y células. En otros estudios se ha encontrado ADN del virus en muestras de sangre, lo cual puede explicar la presencia del virus en los tejidos mencionados, ya que si el virus está en la sangre, puede llegar a cualquier tejido que tenga irrigación. (Carvalho C y *et al*, 2003)

Al papilomavirus se lo ha identificado como un virus epiteliotropo, pero al encontrar ADN viral en útero, ovarios, oocitos y fluidos, se puede considerar que la infección viral no es tan específica. (Carvalho C y *et al*, 2003)

**Verrugas en tubo digestivo:** Clínicamente se observa en muy pocos casos, y generalmente se los encuentra cuando los animales ya han sido faenados en los mataderos. Se ha encontrado lesiones en lengua, paladar blando, orofaringe, esófago, surco esofágico, rumen, retículo, intestinos. Los papilomas encontrados en surco esofágico y retículo son causantes de timpanismo ruminal crónico. Los animales con BPV-4 en el TGI y alimentados con hebrecho son susceptibles a desarrollar carcinoma de células escamosas. (Radostits O y *et al*, 2005)

Las lesiones papilomatosas menos comunes en ganado se presentan a nivel de la vejiga urinaria, y no causan signos clínicos; aunque actúan como factores predisponentes para hematuria enzoótica. (Radostits O y *et al*, 2005)

La hematuria enzoótica crónica (CEH) está relacionada con el desarrollo de cáncer de vejiga causado por BPV-2. La CEH es un síndrome severo que se debe a la ingestión prolongada de hehecho, relacionado con la producción de cáncer en animales. El BPV-2 infecta la mucosa vesical, y produce una infección latente abortiva, pues no se encuentra viriones ni proteínas virales estructurales en la mucosa de la vejiga. Los factores carcinogénicos del hehecho interactúan con las proteínas virales, y ocasionan el desarrollo de neoplasias. (Borzacchiello G y *et al*, 2006)

Clínicamente, los animales infectados tienen la temperatura corporal dentro de los rangos para la especie; y no presentan alteraciones en el apetito. Los animales más afectados clínicamente tienden a presentar una menor condición corporal. (Salib F y Farghali H, 2011)

No siempre la ausencia del papiloma significa que el animal está sano, ya que existen portadores sanos, en los que el ADN viral se encuentra latente en el epitelio, y se patogeniza el momento de una inmunosupresión o algún trauma que desencadena factores inflamatorios. (Borzacchiello G y *et al*, 2006)

### **7.7.- PATOLOGÍA CLÍNICA**

No se han reportado cambios específicos a nivel de hemograma o química sanguínea, pero el ganado infectado tiene menor número de linfocitos CD2 y CD4; y un mayor número de linfocitos T gama-delta; y linfocitos B que expresan IgM. (Radostits O y *et al*, 2005)

Normalmente no es necesaria la biopsia, pues las lesiones clínicas son evidentes. Microscópicamente, en los papilomas se observa una epidermis hiperplásica con tejido dérmico escaso; mientras que en los Fibropapilomas el componente dérmico es predominante. La identificación del tipo específico de virus se realiza mediante pruebas histológicas y serológicas; se puede utilizar

ELISA, pero es más recomendable el uso de PCR de muestras de biopsias o raspados tisulares. (Radostits O y *et al*, 2005)

La infección por PV se caracteriza por producir papilomatosis, acantosis (hiperplasia en la capa espinosa) y gránulos prominentes de queratohialina, en el estrato granuloso del epitelio. Además, se puede observar vacuolización perinuclear (koilocitosis), con núcleos marginales en forma de hoz. Hay también hiperqueratosis y paraqueratosis en el epitelio córneo. (McBride A y *et al*, 2000)

En los fibropapilomas causados por BPV, se puede observar una reacción fibroblástica dentro de la 1ra semana post infección, pero la proliferación del epitelio se hace recién evidente a las 4-6 semanas luego de la infección. (McBride A y *et al*, 2000)

Histopatológicamente, las lesiones muestran una marcada hiperqueratosis con proyecciones superficiales en forma de cuernos, largas, gruesas y similares a pelos; además de hiperplasia epidermal con áreas de erosión, ulceración e infiltración de neutrófilos. La capa dermal del papiloma muestra una moderada infiltración de neutrófilos, eosinófilos y algunos linfocitos. En las lesiones de regresión natural el examen histológico revela un infiltrado intenso de linfocitos, tanto en la dermis como en el epitelio (Salib F y Farghali H, 2011; Freitas A y *et al*, 2007)

## **7.8.- DIAGNÓSTICO**

Debido a que las lesiones clínicas son características de la enfermedad, el diagnóstico mediante técnicas de laboratorio, casi nunca es necesario. Sin embargo, mediante el uso de microscopía electrónica, se pueden observar viriones. Se realizan también pruebas de hibridación y de PCR para detectar el ADN de los papilomavirus, pero estos estudios no corresponden a pruebas de rutina de la enfermedad. (Murphy F, 1999; Radostits O y *et al*, 2005)

## **7.9.- TRATAMIENTO**

La prevención y el tratamiento son difíciles de evaluar, debido a que la enfermedad es autolimitante y su duración es variable. Se han utilizado a lo largo de los años una gran variedad de tratamientos, pero ninguno completamente efectivo; por ejemplo, se ha utilizado el interferón alfa bovino pero sin muchos efectos positivos. Otros tratamientos también incluyen el uso de terapias fotodinámicas y de la autovacuna mediante inoculación de tejidos de verrugas tratados con formalina. La vacunación con proteínas de la cápside viral ha sido más efectiva pero sólo para un tipo específico de virus. (Murphy F, 2009)

## **7.10.- CONTROL**

No es posible el establecimiento de normas específicas de seguridad para el control de la papilomatosis, debido a la naturaleza tan impredecible de la misma, y debido a que no es muy significativa económicamente. Sin embargo, la aplicación de vacunas puede ser efectiva para la prevención y para preparar a los animales frente a desafíos naturales. Sin embargo, esta vacuna debería contener todos los tipos de BPV para ser completamente efectiva. (Radostits O y *et al*, 2005)

Es recomendable el evitar el contacto directo entre animales infectados y sanos, para limitar las posibilidades de transmisión; y el equipo para manejo de ser adecuadamente utilizado. (Radostits O y *et al*, 2005)

Debido a la presencia de ADN viral en fluidos corporales, como mecanismo de prevención y control es recomendable el análisis de los bancos de semen para evitar la transmisión vertical. (Lindsey CJ y *et al*, 2009)

## **7.11.- CÁNCER Y PAPILOMATOSIS**

Como se ha mencionado antes, las lesiones de papilomas puede eventualmente desarrollarse en cáncer, aunque esta es una enfermedad multifactorial y se requieren de muchos pasos antes que se logre la

transformación neoplásica. Se ha observado, sin embargo, que los animales que consumen helecho (*Pteridium aquilinum*) son más susceptibles a desarrollar cáncer, debido a sus factores inmunosupresores y mutagénicos. (Saveira M, 2006)

La inmunosupresión causada por el helecho se relaciona con dos cambios hematológicos muy marcados. Primero, se observa una disminución de leucocitos polimorfonucleares (PMN), que puede terminar con una inmunodepresión severa, que permite el ingreso de bacterias al torrente sanguíneo, que puede ocasionar septicemia. El segundo cambio, es la disminución crónica de linfocitos circulantes. Además, los animales con demasiada exposición a helechos, pueden desarrollar hematuria enzoótica, cáncer de vejiga urinaria y anomalías en los cromosomas. (Saveira M, 2006)

Los animales que desarrollan papilomas en el TGI y que además tienen acceso a helechos, corren mayor riesgo de desarrollar cáncer. Se ha observado que los papilomas de los animales alimentados solamente con pasto y heno, desaparecían luego de un año; pero en los animales que consumían heno, los papilomas se expandieron a lo largo de la nariz y orofaringe, fusionándose en forma de grandes lesiones que terminaron en cáncer. Estas lesiones permanecen por el resto de la vida del animal, pues por ejemplo, en un experimento, un animal que había sufrido la infección 13 años atrás, al momento de morir todavía tenía lesiones en el TGI. Otro en cambio, con carcinoma a nivel de esófago, desarrolló además otros pólipos, adenomas y adenocarcinomas en el duodeno, yeyuno y colon. (Saveira M, 2006)

De acuerdo a los estudios moleculares y epidemiológicos, en el proceso de carcinogénesis, además de la acción de las oncoproteínas, se produce un aumento del número de receptores celulares para factores de crecimiento epidérmicos; hay activación de genes específicos y el gen p53 sufre una mutación. (Saveira M, 2006)

Ciertos factores mutagénicos del helecho como la quercentina y ptaquilosida, son importantes durante el desarrollo de cáncer, y además son encontrados en la orina, suero y leche de ganado alimentado con helecho. Los flavonoides y quercentines contienen propiedades inmunosupresoras y mutagénicas, que tienen acción sinérgica con los BPV, que llevan al desarrollo de lesiones malignas. Se han observado anomalías cromosómicas en líneas celulares obtenidas de fibroblastos bovinos previamente sometidos a BPV-4 y a quercentina. (Freitas A y *et al*, 2007; Saveira M, 2006)

Los papilomas que se presentan a nivel de TGI, son producidos por el BPV-4, que puede causar lesiones desde la lengua hasta el estómago. En animales con buen estado de salud, estos papilomas son pocos, y normalmente experimentan regresión luego de unos doce meses. Sin embargo, en animales inmunodeprimidos, no hay regresión y los papilomas persisten y pueden diseminarse. (Saveira M, 2006)

Los animales que desarrollan papilomas en el TGI tienen dificultades en la alimentación y en la respiración, y generalmente deben ser descartados. Si las lesiones son pocas, los animales pueden sobrevivir, pero corren el riesgo de desarrollar posteriormente carcinoma de células escamosas. (Saveira M, 2006)

El cáncer que afecta a la vejiga urinaria del ganado con acceso a helechos puede ser un carcinoma de urotelio, o hemangioendotelioma de los capilares subyacentes; y los dos tipos pueden ocurrir en una misma vejiga. El virus infecta el epitelio vesical, y establece una infección de tipo abortiva, pues no hay producción de virus; pero el ADN de las lesiones de la vejiga aún es infeccioso y puede iniciar un ciclo de replicación en un ambiente permisivo, como la piel. Se expresa la oncoproteína E5 se activan genes específicos y disminuye la regulación en la expresión de supresores tumorales. La inmunodepresión por el helecho evita que se controlen los tumores, los factores mutagénicos provocan desestabilización del genoma, permitiendo el desarrollo de cáncer. (Saveira M, 2006)

Clínicamente, la presentación de cáncer está asociada a la hematuria enzoótica en animales que han consumido helecho (*Pteridium spp*), pues éstos se encuentran inmunodeprimidos; y se facilita la propagación y patogenización del PV. Además, la combinación de los mutágenos del helecho causa la transformación neoplásica de las células papilomatosas. (Sánchez A y *et al*, 2008)

La patología causada por el consumo del helecho de los pastos tiene dos presentaciones: agudas o crónicas. Entre las crónicas se describe la hematuria enzoótica bovina y el síndrome digestivo anterior, mientras que la aguda incluye al síndrome hemorrágico. (Sánchez A y *et al*, 2008)

Debido a que el género *Pteridium* no tiene un ordenamiento taxonómico completo, los investigadores lo identifican de una forma genética, la cual incluye a todas las formas existentes de este género, denominándolos como genotipo. Esto implica que la definición de genotipos de *Pteridium*, se refiere a cualquiera de las múltiples variaciones morfológicas, de plasticidad ecológica y diferencias químicas encontradas. (Sánchez A y *et al*, 2008)

Cuando los animales han consumido pequeñas cantidades de maleza (<10g/Kg/día) por un largo tiempo, se desarrolla la presentación de la forma crónica de la enfermedad, en la cual el PV juega un papel importante; mientras que los casos agudos, se presentan por un alto consumo de helecho. (Sánchez A y *et al*, 2008)

En estudios realizados en Paraná, Brasil, sobre las patologías producidas por la intoxicación por el consumo de *Pteridium*, se describe que en las diferentes lesiones encontradas en animales con síndrome digestivo anterior, la ubicación está determinada, por las propiedades químicas del ptaquilósido que es el principal metabolito tóxico del helecho, que en condiciones alcalinas da origen a un conjugado llamado dienona, que es capaz de asociarse a varios tipos de proteínas con terminales aminos, como el ADN, ya que atraviesa la membrana celular y nuclear de las células. Cuando ingresa al núcleo causa una alteración permanente e irreparable en varios genes con función

reguladora como el proto-oncogen H-ras y el gen supresor p53. (Sánchez A y *et al*, 2008) ANEXO 26

En este estudio se describe que la participación viral del papilomavirus está asociada a síndromes crónicos de la toxicosis, y ya que se ha encontrado lesiones papilomatosas en cercanía de otras malignas, se sugiere, que el BPV-4 tiene un papel importante en la patogénesis de los carcinomas celulares del tracto digestivo anterior, y el PVB-2 está asociado a tumores benignos de vejiga urinaria. (Sánchez A y *et al*, 2008)

Estas proyecciones papilares benignas inducidas por PV, pueden sufrir transformaciones malignas como consecuencia de la inmunosupresión causada por los metabolitos del hebrecho. Se considera que el aumento de la actividad viral de los BPV-4 y BPV-2, producen mutación del gen p-53 que conlleva a la detención del ciclo celular en fase G, regulación de la apoptosis y aumento de la angiogenesis siendo estos eventos los que producen la transformación maligna de la célula epitelial. (Sánchez A y *et al*, 2008)

## **CAPÍTULO 8**

### **8.1.- TÉCNICAS NO MOLECULARES DE DETECCIÓN DEL VIRUS**

Este tipo de técnicas no detectan la presencia directa del virus, sino que indirectamente detectan las secuelas clínicas de la infección viral. (IARC, 2007)

#### **8.1.1.- Citología e Histología**

El mejor signo para la detección de infecciones por PV a nivel citológico es la presencia de koilocitosis o atipia koilocítotica, que es una combinación de una alteración nuclear y la formación de un halo perinuclear. Aunque estas son características típicas de las infecciones por PV, ni la citología ni la histología son indicadores sensibles frente a la presencia de los virus; pues existen casos en los que existe la presencia de ADN viral sin cambios histológicos o citológicos importantes. (IARC, 2007)

A nivel histológico, resulta complicado el diagnóstico de presencia de Coilocitos, pues los artefactos de fijación y la mala deshidratación pueden ocasionar la presencia de halos perinucleares que confunden el diagnóstico. (IARC, 2007)

#### **8.1.2.- Histología**

Para realizar el estudio histológico se usa tejido muerto, que se mantiene mediante soluciones químicas después de su extracción, para luego realizar los cortes histológicos. En la preparación de los cortes histológicos se debe mantener, en lo posible, el aspecto en las estructuras del organismo vivo. (Geneser F, 2000)

#### *Preparación de tejidos para microscopia óptica*

1. **Fijación:** El objetivo principal de la fijación es matar las células para detener los procesos celulares dinámicos con la mayor rapidez posible y con mínimas modificaciones. Este proceso se logra mediante la insolubilización de los componentes estructurales de la célula, con la formación de enlaces cruzados, estabilizando las proteínas por la acción

de agentes químicos llamados fijadores. A parte de lograr mantener todas las relaciones entre las estructuras como en una célula viva, se logra una fuerza mecánica, que va a facilitar los procesos siguientes de la preparación del tejido. (Geneser F, 2000)

Entre los fijadores más efectivos en formar enlaces transversales tenemos el formaldehído, glutaraldehído y tetróxido de osmio. (Geneser F, 2000)

La fijación también interrumpe otros procesos celulares, como la autólisis celular, causada por diferentes enzimas; y de igual manera destruye cualquier microorganismo que podría dañar el tejido. El procedimiento de la fijación se realiza con la inmersión del tejido extraído en uno de los fijadores. La extracción del tejido se debe realizar con instrumental quirúrgico para evitar cualquier daño mecánico al tejido. (Geneser F, 2000)

2. **Inclusión y corte:** El tejido ya fijado se somete a cortes histológicos, que deben ser delgados para permitir el paso de luz del microscopio. Deben tener un espesor promedio de alrededor de 5-10 micrómetros, lo cual se consigue con el uso de un micrótomo. (Geneser F, 2000)

Para poder realizar los cortes con el micrótomo, el tejido debe ser sometido a otros procesos para que adquiera consistencia y dureza; esto se consigue, con la utilización de soluciones de inclusión, generalmente parafina. Antes de realizar el proceso de inclusión, el tejido debe ser deshidratado mediante la inmersión del tejido en soluciones acuosas de etanol en concentraciones crecientes hasta llegar al anhídrido. Entonces se sumerge el tejido en una solución miscible en etanol y parafina, por ejemplo xileno, proceso denominado aclaramiento. Después del aclaramiento, se coloca el tejido en parafina líquida para disolver el xileno, y así logra penetrar en el tejido. Al enfriarse, la parafina se solidifica formando un taco, que es sometido a cortes histológicos. (Geneser F, 2000)

A pesar de que se realice el proceso con mucho cuidado y exactitud, se producen ciertas modificaciones en el taco. Esto se da por que el alcohol

y el xileno extraen grasas y el aclaramiento de la inclusión desactiva muchas enzimas y el tejido sufre una contracción considerable. A diferencia de cuando se prepara el tejido por medio de técnicas de corte por congelamiento lo que evita estos problemas, y la muestra puede estar con o sin fijador. (Geneser F, 2000)

Esta técnica es muy rápida y se obtienen cortes en pocos minutos. Se utiliza por ejemplo, para determinar si el material de una biopsia extraída en un acto quirúrgico es canceroso. El resultado se recibe mientras el paciente sigue anestesiado lo cual permite a ciertos cirujanos a tomar decisiones de extracción de órganos. (Geneser F, 2000)

#### *Método de congelación-desección*

El objetivo de usar este método es lograr que la variación estructural y la extracción química sean mínimas, para conservar la actividad enzimática. Para congelar con rapidez, la muestra es colocada en una cámara de vacío a baja temperatura y después se deshidrata por evaporación lenta del agua. (Geneser F, 2000)

#### *Congelación-sustitución*

Esta técnica se realiza por medio de una fijación moderada y un tratamiento con sacarosa; seguida por una congelación rápida del tejido, y a continuación una deshidratación a  $-85^{\circ}\text{C}$  en metanol puro. Una vez eliminada el agua, el tejido es colocado en una inclusión adecuada, que se infiltra mientras se incrementa gradualmente la temperatura hasta alrededor de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se procede entonces, a polimerizar por irradiación con luz UV el medio de inclusión que se seca, y está listo para realizar los cortes del taco. (Geneser F, 2000)

#### *Coloración*

La mayoría de colorantes histológicos son utilizados en solución acuosa, por lo que, los cortes incluidos en parafina deben ser desparafinados mediante el uso de xileno, rehidratados con concentraciones decrecientes de alcohol en agua antes de proceder a la tinción. Los cortes por congelación pueden ser

sometidos a soluciones acuosas inmediatamente después de los cortes. (Geneser F, 2000)

El método de tinción más común es el de hematoxilina y eosina, que colorean los componentes nucleares de azul violáceo, mientras que casi todas las estructuras citoplasmáticas adquieren una tonalidad rosada. Después de la tinción se deshidrata y se aclara nuevamente la muestra de tejido y se coloca una gota de medio de montaje transparente. (Geneser F, 2000)

## **8.2.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES EN TEJIDOS INFECTADOS**

La detección inmunológica de proteínas virales en células o tejidos es complicada, pues las proteínas tardías solamente se expresan en las infecciones productivas, y las proteínas tempranas se expresan en pequeñas cantidades en los tejidos infectados. (IARC, 2007)

Se han podido generar anticuerpos a partir de proteínas virales recombinantes expresadas en sistemas heterólogos, y estos anticuerpos se pueden usar para demostrar la expresión de proteínas virales en muestras biológicas mediante inmunquímica, pruebas de western blots y ensayos de inmunoprecipitación. (IARC, 2007)

Sin embargo, la mayoría de anticuerpos se consiguen mediante el uso de L1, pues la detección de proteínas tempranas en células o tejidos infectados es mínima. Existen anticuerpos frente a E5, E6 y E7 pero se los usa solamente para pruebas *in vitro*; aunque recientemente se creó un antisuero policlonal de conejo que permite la identificación de E7 mediante la tinción inmunohistoquímica de secciones de biopsias en parafina. (IARC, 2007)

Se ha utilizado la detección de proteínas celulares diferentes, expresadas solo en células infectadas, como un marcador de tumores y su prognosis, por ejemplo, la expresión de la p16 inhibidora de cinasa dependiente de ciclina y la pRb. Se ha usado un anticuerpo monoclonal para p16 para detectar esta proteína en tejidos infectados, con resultados buenos para la detección de lesiones de cáncer cervical en etapas más tempranas. (IARC, 2007)

### **8.3.- DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La detección de genomas virales específicos y sus transcriptores se lo realiza mediante diversos procedimientos, que incluyen southern y northern blots, hibridación *in situ*, secuencia de ADN, captura híbrida y PCR; siendo estos dos últimos los más utilizados en la actualidad, aunque el PCR es más útil para el reconocimiento de tipos y variantes de PV, aunque todavía con algunos inconvenientes. (IARC, 2007)

#### **8.3.1.- Métodos basados en PCR**

El ADN viral puede amplificarse selectivamente para incrementar las secuencias virales presentes en la muestra biológica. La sensibilidad y especificidad de los métodos de PCR es variable. (IARC, 2007)

La mayoría de protocolos utiliza primers dirigidos a una región altamente conservada del gen L1. Existen varios tipos de PCR para la detección de transcriptores virales, como el PCR reverso transcriptasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativo, y PCR en tiempo real; y el uso de cualquiera de estos métodos es más efectivo en casos en los que existe más de un tipo de PV en la muestra. (IARC, 2007)

Recientemente se ha desarrollado un método que amplifica los transcriptores oncogénicos de los PV, y que permite diferenciar a un genoma episomal de un genoma integrado. El genoma viral suele estar integrado dentro de los cromosomas del huésped en los casos de lesiones cancerosas, mientras que en tejidos normales o premalignos, el ADN viral se mantiene en forma de episomal. (IARC, 2007)

#### **8.3.2.- Métodos de hibridación de ácidos nucleicos (Hybrid Capture 2™)**

Este método se basa en la hibridación de secuencias de ARN sintético complementarias a las secuencias de varios tipos de PV, y que sirven para la preparación de “cocteles”. El ADN de la muestra biológica se hibrida en solución con cada uno de los cocteles, para observar la formación de híbridos

de ADN-ARN específicos, que luego son capturados por anticuerpos colocados en los platos de microtítulos, y que se reconocen específicamente. Los híbridos inmovilizados son reconocidos por varias reacciones que dan lugar a un producto luminoso que puede ser medido en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida es proporcional a la cantidad de ADN detectado en la muestra, y permite una medida semicuantitativa de la carga viral. (IARC, 2007)

### **8.3.3.- Hibridación southern and northern blot**

Este tipo de pruebas de hibridación en fase sólidas son buenas para el análisis de los genomas virales y para obtener información de alta calidad, pero requieren de una gran cantidad de ácidos nucleicos altamente purificados y bien preservados; por lo que no se usa en estudios de poblaciones grandes (IARC, 2007)

El ADN es digerido controladamente por endonucleasas y sometido a electroforesis en geles de agarosa. Luego de la denaturación, las moléculas de ADN se transfieren a nitrocelulolosa, y se someten a hibridación produciendo señales específicas. (IARC, 2007)

La prueba del southern blot es una de las más importantes para la evaluación de los genomas virales, pues puede identificarlos certera y específicamente en las muestras, y determina si el genoma es episomal o si está integrado, y da una medida semicuantitativa de la carga viral. (IARC, 2007)

### **8.3.4.- Hibridación in situ**

Es una técnica mediante la cual, se identifican secuencias de nucleótidos en células o cortes tisulares con morfología conservada, que permite la localización espacial de los genomas buscados en las muestras biológicas. La ventaja de este método es que puede aplicarse a tejidos fijados y procesados, aunque tiene menor sensibilidad y puede haber errores al determinar el tipo de PV. (IARC, 2007)

## **8.4.- ANÁLISIS SEROLÓGICOS PARA DETECCIÓN DE INFECCIONES POR PV Y CÁNCER.**

Las respuestas de anticuerpos a la cápside viral se usan generalmente como un marcador de exposición constante al virus, mientras que E6 y E7 actúan como marcadores de enfermedades malignas. (IARC, 2007)

### **8.4.1.- Detección de anticuerpos de la cápside**

Los VLPs se han usado para desarrollar ELISAs para la detección de anticuerpos en suero y en secreciones mucosas, y actualmente constituye el método más usado para el análisis de anticuerpos específicos de cápside de PV. (IARC, 2007)

Se ha observado que L1 expresado por bacterias como la proteína de fusión glutatión S transferasa (GST) forma capsómeros espontáneamente que muestra epítomos definidos en los VLPs y sirven como antígeno para detectar anticuerpos de la cápside de los PV. (IARC, 2007)

Los anticuerpos en su mayoría reconocen a los epítomos de la superficie de la cápside, la cual al ser tratada con soluciones buffer de carbonato destruye los epítomos tipo específicos, que ocasiona la pérdida de reactividad serológica tipo específica, mientras que la respuesta humoral cruzada no se afecta.

### **8.4.2.- Neutralización**

Estas pruebas son consideradas más tipo específicas que las pruebas de unión de anticuerpos; y se basan en pseudoviriones infecciosos. Los ensayos de neutralización permitieron la definición de los epítomos neutralizantes mediante el uso de anticuerpos monoclonales. (IARC, 2007)

### **8.4.3.- Detección de anticuerpos contra E2, E4, E6 y E7**

Los anticuerpos de E6 y E7 se consideran como marcadores asociados a enfermedades malignas, pero no son considerados diagnósticos pues no todos los pacientes con tumores muestran estos anticuerpos. (IARC, 2007)

Mediante el uso de ELISA y western blot, se ha observado que los anticuerpos frente a E2 y E4 o frente a secuencias lineales específicas de estas proteínas, se asocian con la presencia de cáncer. (IARC, 2007)

### **8.5.- CULTIVOS ORGANOTÍPICOS Y XENOINJERTOS**

El desarrollo de nuevas técnicas de cultivo, surgió de la necesidad de crear cultivos con células diferenciadas, que permitieran el crecimiento de los virus, para poder realizar mejores estudios y establecer claramente el ciclo de vida del virus. (McBride A y *et al*, 2000)

Se usa un equivalente dérmico, que consiste en una matriz de colágeno con fibroblastos, en donde se cultiva una capa de queratinocitos en la superficie de tal forma que pueden diferenciarse y estratificarse. (McBride A y *et al*, 2000)

El BPV-1 es el prototipo molecular de los PV, pues tiene ventajas para servir como un modelo de estudio del ciclo viral; por ejemplo, producen grandes lesiones proliferativas, de las que pueden aislarse grandes cantidades de viriones, que son utilizados experimentalmente. El BPV-1 produce fibropapilomas en su huésped natural, y puede transformar los fibroblastos en cultivo, que se usan para reproducir fibromas en ratones, y desarrollar una infección epitelial productiva. (McBride A y *et al*, 2000)

Además existen una gran variedad de mutaciones en las funciones específicas de sus genes, que facilitan el análisis del ciclo de vida viral. Por otro lado, los queratinocitos de bovinos se diferencian bien y se pueden identificar todas las capas de la epidermis. (McBride A y *et al*, 2000) En el año 1999 McBride y *et al*, desarrollaron una combinación de cultivos organotípicos y xenográficos en ratones, que permitieron la producción de epitelio bovino completamente diferenciado, en donde se pudo replicar el BPV.1, produciendo partículas virales. Se logró detectar el antígeno L1 de la cápside, mediante la coloración del tejido con un anticuerpo L1 específico y con peroxidasa. (McBride A y *et al*, 2000)

## **8.6.- IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO TIPO DE BPV**

Para la identificación de un nuevo tipo de virus, se toma una muestra de papiloma del animal afectado, se la tritura en una solución salina de fosfato (pH 7.2), y se centrifuga. El sobrenadante se trata con una solución tampón de lisis para la homogenización, y luego se incubado por 30 minutos. (Claus M y *et al*, 2009)

Para poder extraer el ADN de la muestra, la fracción sobrenadante es tratada con un volumen igual de alcohol feno-cloroforma-isoamil, homogenizada y calentada por 15 minutos. Se centrifuga la muestra, y la fase acuosa es mezclada con isotiacinato. El ADN es lavado con agua ultraesteril y guardado a -20°C. Posteriormente se realiza el análisis de PCR con primers específicos. El ADN amplificado se analiza mediante electroforesis luz UV. La amplificación obtenida por PCR es purificada y sujeta a clonación. Luego del análisis, se comprueba que el fragmento de L1 de la muestra en estudio coincida con una secuencia genética específica de un PV. (Claus M y *et al*, 2009)

## **CAPÍTULO 9**

### **9.1.- TRATAMIENTO DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA**

Las verrugas pueden ser removidas mediante cirugía o criocirugía; sin embargo, se ha observado que el aplastamiento de porciones de pequeñas verrugas o la remoción quirúrgica pueden ocasionar una regresión más apurada de las lesiones. Se recomienda que luego de la remoción quirúrgica, se aplique una autovacuna para mejores resultados; aunque tanto la cirugía como la vacuna en etapas tempranas de la enfermedad pueden incrementar el tamaño de verrugas residuales y prolongar el curso de la enfermedad. (Radostits O y *et al*, 2005)

Antiguamente se utilizaba la inyección de preparados con antimonio y bismuto dentro de las verrugas, o la inyección del bacilo Calmette Guérin (BCG), que son ahora obsoletos. (Radostits O y *et al*, 2005)

### **9.2.- VACUNAS PARA BPV**

Una de las mayores razones para la persistencia de la infección es la pobre respuesta inmune hacia los BPV, pues incluso en huéspedes inmunocompetentes, los papilomas permaneces por varios meses antes de que ocurra la regresión. El virus de la papilomatosis logra escapar de la respuesta inmune gracias a que su ciclo de vida está confinado al epitelio, además, que se ha sugerido, que el virus ha desarrollado diversas formas para esconderse del sistema inmune, como por ejemplo, el limitar la regulación del MCH-I. (Saveira M, 2006)

El desarrollo de vacunas tanto terapéuticas como preventivas, es uno de los principales objetivos del estudio de la papilomatosis. Se ha observado, que a pesar de la pobre respuesta hacia la infección por BPV, se puede provocar una respuesta inmune rápida y prolongada, si se inmuniza al ganado con proteínas virales. (Saveira M, 2006)

Se ha logrado una vacunación profiláctica con viriones de BPV-1 y se han obtenido anticuerpos virales neutralizantes mediante el uso de L1 de BVP-1. De igual forma se han tratado de desarrollar otras vacunas a partir de BPV-2 y BPV-4 para papilomas de piel y de mucosa respectivamente. Estas vacunaciones consisten en la inoculación intramuscular de virus, que da como resultado la producción de anticuerpos neutralizantes y la protección completa para desafíos posteriores. Sin embargo, estas vacunas solo dan protección específica hacia el virus homólogo. (Saveira M, 2006)

A pesar de la especificidad de la vacuna, se ha utilizado una proteína L1 de BPV-2 para el control de BPV-1, la cual produce anticuerpos neutralizantes y protege de la infección, esto debido a la ubicación de L1 en la superficie del virión. Sin embargo, el uso de L2 BPV-2 no protege contra la infección ni contra nuevos desafíos, pero sí induce una regresión temprana de las verrugas; es decir, que induce la producción de anticuerpos no neutralizantes. En este caso, se puede observar largos infiltrados de linfocitos y macrófagos en las verrugas en regresión, lo que indica una respuesta inmune de tipo celular. (Saveira M, 2006)

La vacunación no siempre es efectiva, y las vacunas comerciales son mejores cuando contienen el tipo específico del virus causante de la infección. Al usar vacunas comerciales, se las debe aplicar de 3 a 4 veces en intervalos de dos semanas, y en animales de exposición la última vacuna debe aplicarse 30 días antes del show. (Pence M, 2008?)

### **9.2.1.- Autovacuna**

En el ganado, las autovacunas preparadas de tejidos afectados de los animales infectados suele ser efectivas en algunos casos, aunque también se ha comprobado que la administración de una doble dosis de la vacuna ayuda a prevenir nuevos casos de verrugas y sirve como tratamiento en animales enfermos. La autovacuna tiene la ventaja de ser preparada a partir del tipo de virus específico que infecta al ganado enfermo. (Radostits O y *et al*, 2005; Salib F y Farghali H, 2011)

Para la preparación de la autovacuna, se utiliza tejido de verrugas, el cual es homogenizado e inactivado con formalina. Debido a la variedad de tipos de BPV, lo más recomendable es usar una muestra de todas las lesiones de papilomas de un animal para la preparación de la vacuna. (Radostits O y *et al*, 2005)

La diferencia en la regresión de los papilomas entre animales infectados de un mismo hato se debe a los diversos tipos de virus. La fase de desarrollo de las lesiones es también importante, pues el virus se encuentra en mayor concentración en el tejido epitelial de verrugas viejas. (Radostits O y *et al*, 2005)

La vacuna se aplica de forma subcutánea, aunque se han reportado mejores resultados con la aplicación intradérmica. La dosis es variable, aunque lo más recomendable es la aplicación de 2 a 4 inyecciones cada 1 o 2 semanas. La recuperación ocurre alrededor de 3 a 6 semanas post aplicación en el 85% de los casos en los que las verrugas se localizan en el cuerpo o a nivel genital; pero solo en un 33% de verrugas en pezones. (Radostits O y *et al*, 2005)

### **9.2.2.- Vacunación profiláctica**

La vacunación con L2 de BPV-4 da protección frente al virus específico. Este tipo de inmunidad es de larga duración, y los animales se vuelven resistentes a nuevos desafíos del virus durante más de un año luego de la vacunación y los terneros vacunados pueden desarrollar anticuerpos neutralizantes. En la terminal N de L2 se han identificado 3 epítomos que son los que permiten la protección contra la infección. (Saveira M, 2006)

Por otro lado, los VLP presentan epítomos neutralizantes; de tal forma, que pueden ser utilizadas como vacunas profilácticas. Sin embargo, a pesar de que la vacunación con L1 o con L2 estimula la producción de anticuerpos neutralizantes, no todos los eventos de neutralización viral ocurren dentro de la célula; pues por ejemplo, no se conoce la forma en que BPV-4 es neutralizado a nivel intracelular. (Saveira M, 2006)

### **9.2.3.- Vacunación terapéutica**

Mediante el uso de E7 de BVP-4 en terneros, no se logra prevenir la infección, pero el desarrollo de los papilomas en estos animales es más lento, y la duración de la enfermedad es más corta que en animales no vacunados. En terneros inoculados, los papilomas no alcanzan su fase final de desarrollo, sino que empiezan su regresión en etapas más tempranas; además, hay una alta producción de anticuerpos direccionados a 3 epítomos inmunodominantes de células B, y una fuerte respuesta inmune celular hacia epítomos de células T. (Saveira M, 2006)

Los papilomas de regresión espontánea muestran un gran número de linfocitos activados, aunque no se sabe todavía contra que antígenos virales son dirigidos, o si la respuesta inmune celular en terneros vacunados es similar a la de la regresión natural. (Saveira M, 2006)

### **9.3.- MHC- I y E5**

El complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) juega un papel importante dentro de la respuesta inmune, pues es el encargado de presentar los péptidos antigénicos, hacia las células efectoras tipo T. (Saveira M, 2006)

La E5 además de ser la principal proteína transformadora de BPV, tiene la capacidad de alterar la regularización al MHC-I al reducir la transcripción de los genes de la cadena pesada (HC) de MHC-I; al degradar el péptido de la HC; y al secuestrar el MHC-I en aparato de Golgi, evitando que alcance la superficie celular. Esto determina la importancia de E5 en el establecimiento de una infección exitosa, que burle al sistema inmune (Saveira M, 2006)

### **9.4.- OTROS TRATAMIENTOS**

Se han experimentado una gran variedad de tratamientos para el control de las verrugas. Experimentalmente se ha utilizado una vacuna atenuada que contiene la cepa LaSota del virus de Newcastle (LS-NDV), debido a las propiedades antineoplásicas e inmunoestimulantes del virus. Se ha observado

que las vacas inoculadas presentan mayores títulos de anticuerpos; algunos animales experimenta resolución completa, otros no tienen alteraciones en la aparición clínica del tumor; y en otros, las verrugas experimentan regresión; por lo que se concluye que la vacuna con LS-NDV estimula la producción de anticuerpos y limita el aumento del factor de necrosis tumoral alfa, permitiendo la recuperación clínica de las animales infectados. (Avki S y *et al*, 2004)

Las verrugas pueden ser removidas manualmente o mediante cirugías, dependiendo del tamaño y tipo de papiloma. Es recomendable el uso de vacunas, que pueden ser inyectadas a los terneros en dosis de 10 ml IM, repitiendo a las 3 o 5 semanas. En algunos casos se han utilizado productos tópicos para humanos, en ganado de exposición para la remoción rápida de la verruga. (Martin S, 2010?)

Se recomienda la administración de una dieta rica en minerales para controlar la enfermedad; principalmente de Ca, P y sulfuro; para mejorar el sistema inmune. (Martin S, 2010?)

Se ha experimentado el tratamiento con Ivermectina para el control de las verrugas con resultados positivos. En estos estudios, la dosis administrada de Ivermectina es de 0.2 mg/kg SC, con dosis única o dos dosis cada 15 días. De los animales que recibieron una sola dosis, el 88,8% experimentó remisión, y el 77,7% de los animales con dos dosis se recuperaron completamente dentro de 3 meses. (Borku M y *et al*, 2007)

Se ha observado en otros estudios que el uso de Levamizol tiene un efecto inmunomodulador positivo aunque no elimina las verrugas de forma rápida. En cuanto al uso de un *Parapoxvirus ovis*, este es considerado como un fuerte inmunomodulador, aunque no específico, pero que si estimula la respuesta inmunitaria. (Salib F y Farghali H, 2011)

## CAPÍTULO 10

### 10.1.- IMPORTANCIA DE LA PAPILOMATOSIS

La papilomatosis bovina es una enfermedad de distribución mundial, y se presenta en todos los países a lo largo del mundo. Se ha reportado una mayor incidencia de la enfermedad en zonas semidesérticas y tropicales, y principalmente durante la época de verano, debido a la proliferación de insectos, clima desfavorable, parásitos externos, entre los factores más importantes. (REDEVET, 2010)

En países como Brasil, las infecciones por PV son consideradas endémicas tanto en ganado de carne como en lechero, pero a pesar de esto, la identificación del tipo de BPV es esporádica. (Claus M y *et al*, 2009)

En Brasil, se han utilizado primers específicos para la identificación, y el BPV- 1 fue descrito en verrugas en piel, en sangre periférica y en plasma de ganado con papilomatosis cutáneo; mientras que el BPV-2 se identificó en toda la sangre y en tumores de vejiga en ganado con hematuria enzoótica crónica y papilomatosis. (Claus M y *et al*, 2009)

En Egipto, la prevalencia de papilomatosis en los Oasis del Norte es del 4,86%; siendo mayor en hembras (2,99%) que en machos (1.87%); y también mayor en animales menores al 1 año (2.99%). Se observó también que alrededor del 75% de los animales con la enfermedad presentaban también infestación por garrapatas, el 30% presentaba fasciola hepática y el 38% tenía otros parásitos gastrointestinales principalmente nematodos. (Salib F y Farghali H, 2011)

En cuanto a edad, el 61,5% de los animales era menor a un año; el 23% menor a 2 años y 15,4% era mayor a los dos años de edad. La mayor afección en animales jóvenes se relaciona con el desarrollo de su sistema inmune y debido al pH alcalino de la piel de los animales más jóvenes y a que son más susceptibles a la infestación por parásitos. (Salib F y Farghali H, 2011)

## **10.2.- IMPORTANCIA ECONÓMICA**

La presencia de lesiones de tipo papilomatosas en el ganado interfiere en varios procesos. En animales de pura raza, las lesiones interfieren con las ventas o shows debido a su apariencia desagradable. Además, los animales con lesiones extensas van perdiendo condición corporal; y las verrugas pueden sufrir traumatismos que las hacen susceptibles a infecciones bacterianas de tipo secundarias. También hay pérdidas económicas en las ventas de los animales para el camal, y disminuye el valor de la piel del animal, debido a las lesiones. (Radostits O y *et al*, 2005)

Las lesiones en pezones de vacas en producción, interfieren en diferente grado con los procesos de ordeño. La presencia de papilomas en la región genital de cualquier especie animal, requiere de su tratamiento inmediato. Las verrugas son antiestéticas y disminuyen el valor de los animales en el mercado. (Radostits O y *et al*, 2005; Martin S, 2010?)

Aunque las lesiones papilomatosas no representan mayores pérdidas en el ganado de carne, son un problema importante en criadores de razas puras y expositores de ganado. En países como Estados Unidos, los animales que presentan verrugas no son considerados como animales sanos y no se les otorga el papel sanitario para la participación en cualquier tipo de exhibición o shows. (Pence M, 2008?)

En el caso del Ecuador, no existen estudios acerca de la enfermedad; no se conocen datos de que animales son los más afectados, o en que zonas climáticas se presenta con mayor frecuencia la patología. Los tratamientos que se aplican a los animales son muy variables; y aunque existe un reporte acerca de la existencia de una vacuna contra PV creada en la Universidad de Manabí (DiCYT, 2010), no existen datos concretos acerca de la papilomatosis bovina.

## **CAPÍTULO 11: METODOLOGÍA**

### **11.1.- SELECCIÓN DE LAS HACIENDAS**

Se realizó una entrevista a los alumnos de veterinaria de la Universidad de las Américas, para conocer quienes tenían haciendas lecheras dentro de la provincia de Pichincha, con problemas de papilomatosis bovina. ANEXO 27

Se realizó una primera visita a la zona de Pedro Vicente Maldonado, donde uno de los alumnos tenía problemas con la enfermedad; y se contactaron a los vecinos, que también tenían problemas con papilomatosis en sus animales de producción lechera. En esta zona, se seleccionaron 5 propiedades que permitieron el muestreo de sus animales para la realización de la investigación.

Se visitaron además otras haciendas en la región de la Sierra de la provincia de Pichincha, en las zonas de Machachi, Sangolquí y Pintag, y se consultaron algunos veterinarios acerca de la presencia de la enfermedad en esta zona; quienes manifestaron la ausencia de la enfermedad en estas zonas, y por eso se realizó el estudio únicamente en las 5 propiedades en el cantón de Pedro Vicente Maldonado.

### **11.2.- VISITA A LAS HACIENDAS**

Se realizó una primera visita a cada una de las propiedades, en la que se recolectó información acerca del número de animales en producción, el tipo de manejo de potreros, manejo sanitario de vacunas y desparasitaciones; y sobre los problemas que tenían con el papilomavirus. Se realizaron entrevistas a los propietarios para obtener la información más relevante de las haciendas, en lo relacionado con manejo sanitario, manejo nutricional, manejo reproductivo y control y tratamiento de la papilomatosis bovina en cada propiedad. ANEXO 28, 29, 30 y 31. (Las fichas con los datos de cada hacienda están en el CD)

Posteriormente, se realizaron 3 visitas a cada hacienda para la recolección de las muestras sanguíneas de los animales infectados.

### **11.3.- TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Se seleccionaron los animales enfermos de cada una de las haciendas, que presentaban manifestaciones clínicas de la enfermedad, y a cada uno se les tomó tres muestras de sangre con un intervalo de al menos quince días, para el estudio de los valores hematológicos de los mismos.

Las muestras se tomaron de la vena yugular en la mayoría de los animales; pero algunos presentaban muchas lesiones papilomatosas a nivel del cuello, por lo que las muestras fueron obtenidas de las venas caudales. Se utilizó una aguja y una jeringuilla por cada animal. Se utilizaron agujas de 18 G y jeringuillas de 10 ml. ANEXO 32

Las muestras fueron posteriormente colocadas en un tubo de tapa lila y un tubo de tapa roja para la realización de la biometría hemática y la determinación de proteínas sanguíneas. Cada tubo fue identificado con el nombre y/o arete de cada animal. Las muestras luego de ser tomadas, fueron colocadas en un cooler, a una temperatura de 4°C; y transportadas al laboratorio para su análisis.

En cada muestreo se realizó un examen clínico que incluía condición corporal, TLLC, mucosas, piel, deshidratación, presencia de parásitos externos y otras heridas y lesiones. Se realizaron fichas para cada animal, en donde se anotaron los datos más relevantes de cada visita, incluyendo la localización anatómica de las verrugas de cada animal. ANEXO 33 (Las fichas individuales puede observarse en el CD)

### **11.4.- TOMA DE MUESTRAS DE PAPILOMAS**

Se recolectaron muestras de verrugas para su estudio histopatológico. Se tomó una muestra de papilomas de los pezones, para lo cual no fue necesaria la sedación, pues la verruga salió solamente al jalarla. La muestra se colocó en formalina al 10% para su análisis.

Se tomó una muestra de otro tipo de verruga, de la zona del tórax. El animal fue colocado en una manga, y se le infiltraron 10ml de lidocaína al 2%, alrededor de la lesión; y se esperó hasta que el anestésico haga efecto. Luego se le extrajo la verruga de forma quirúrgica, realizando una incisión en la piel y alrededor del papiloma a 1 cm de distancia; se fue debridando la verruga hasta que se la extrajo completamente. Se suturó posteriormente la herida, utilizando vicryl 2.0, con una sutura en forma de candado, con puntos simples de refuerzo. La verruga fue colocada en formalina al 10% para su análisis. ANEXO 34

Se tomo una 3ra muestra de un papiloma localizado en el abdomen ventral de una vaca de producción, cerca de la glándula mamaria. Se tumbó al animal y se le infiltraron 10 cm de lidocaína al 2%; y después de que el anestésico hizo efecto, se extrajo el papiloma de la misma forma que la muestra anteriormente descrita. Se suturó al animal con vicryl 2.0 con puntos simples; y la muestra se colocó en formalina al 10%.

#### **11.5.- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Las muestras fueron analizadas en la clínica Veterinaria “Renacer”. El conteo total de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, hematocrito y hemoglobina se realizaron en el Analizador automático hematológica de impedancia PE-6300 VET Fully Auto-hematology Analyzer de PROCAN Electronics”.

La determinación de proteínas se la realizó mediante refractometría, y albúmina se la realizó mediante adsorbancia.

El conteo diferencial de leucocitos se llevó a cabo manualmente. Para la elaboración de los frotis, se tomó una gota de sangre de cada muestra de tubo lila y se la colocó sobre un portaobjetos de cristal bien desgrasado y previamente identificado. Con otro portaobjetos se formó un ángulo de 45° sobre la gota de sangre. Se deslizó la placa hacia atrás y luego hacia delante, lo más uniformemente posible formando el extendido sanguíneo. Se dejó secar el frotis al aire, durante un minuto; y luego se le colocó colorante de Wright

durante 3 minutos. Posteriormente se realizó el lavado de la placa con agua; se dejó secar y luego se observó en el microscopio. El conteo diferencial se realizó con el lente 100x utilizando aceite de inmersión y un piano manual. ANEXO 35

Todos los resultados fueron colocados dentro de las fichas de cada animal para su posterior análisis.

#### **11.6.- ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO**

Las muestras de los papilomas colocadas en formol al 10% fueron enviadas al laboratorio para el examen histopatológico. Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Patología Clínica “Renacer Emergencias Veterinarias”.

## **CAPÍTULO 12: RESULTADOS**

Las fichas de cada una de las haciendas, con la información más relevante pueden ser observadas en el CD. En el archivo “Fichas de manejo” está la información detallada del manejo de cada hacienda. Las fichas con el nombre de cada hacienda contienen las fichas individuales de los animales muestreados. El archivo de “Balance Energético”, contiene los cálculos del balance energético de cada hacienda.

### **12.1.- MANEJO**

#### **12.1.1.- Hacienda “El Porvenir”**

El ganado lechero maneja cruces de razas Holstein, Brown Swiss y recientemente se inició con la introducción de Gyrolando, con la compra de un macho reproductor.

El encalostramiento se lo realiza después del parto y durante los tres primeros días de vida, con una cantidad de 4lt/d, que se administra caliente a temperatura corporal. No se utiliza sustituto de leche y el consumo de pasto se inicia a las 2 semanas de edad.

El destete se lo realiza a los 3 meses en terneras y a los 2 meses en machos; y hasta esa edad, se utiliza mar alfalfa picada mezclada con caña de azúcar, para mejorar la palatabilidad. A las vacas en producción se les da Brachiaria con pasto miel, y se les administra 400 g/d de balanceado de marca PRONACA (Superlechero tropical). Las vacas que están en seco son alimentadas con mar alfalfa, maní forrajero y melaza.

Al ganado se le administra sales minerales de acuerdo a los requerimientos de cada etapa, basándose en la dosis recomendada por la marca de sales utilizada, y nos se suplementa con nada más. El agua es obtenida de vertientes *ad libitum*, o de bebederos durante el ordeño y cerca de los potreros.

En lo que se refiere a sanidad, se usa un calendario de vacunación que incluye la vacuna triple (Carbón Sintomático, Edema Maligno y Septicemia Hemorrágica) a los 4 meses de edad con refuerzo anual; se vacuna contra Brucelosis a los 6 meses de edad, con RB51. La vacuna de Fiebre Aftosa se administra la primera semana de edad y cada 6 meses, y es aplicada por la CONEFA; y la vacuna de IBR-DVB se administra a las dos semanas de edad, con revacunación anual; o vacunación con DVB a las madres un mes antes del parto.

La desparasitación se la realiza cada tres meses, alternando Albendazol y Febendazol, junto con la aplicación de Ivermectina; además se realiza un baño garrapaticida con organofosforados cada 3 semanas, y cada seis meses se inyecta vitamina ADE3.

El ordeño es automático con cuatro puestos, no se maneja tanque frío y la leche es entregada inmediatamente al comprador. Se realiza un lavado de la ubre antes de colocar las pezoneras, y después de que el animal es ordeñado, se sellan los pezones con una solución de yodo. Se ordeña dos veces al día. La mastitis se controla mediante CMT pasando un día.

De acuerdo a los datos obtenidos del propietario, en la hacienda no existen problemas relacionados con otras patologías, además de la de mastitis en vacas de producción, y de parasitosis, principalmente garrapatas, que puede ocasionar enfermedades hematozoáricas como piroplasmosis y Anaplasmosis; pero no se tienen datos de estas patologías. Se presentan problemas de DVB, para lo cual se utiliza vacuna de virus atenuado; aunque los casos no son significativos. Ninguna de estas enfermedades ha sido diagnosticada ni confirmada por laboratorio.

Los tratamientos, vacunaciones y desparasitaciones, según los datos del propietario, se los realiza con el uso de una aguja por animal. En cuanto a reproducción, se utiliza inseminación artificial pero recientemente se cambió a monta directa con un toro de raza Gyrolando.

Específicamente en el problema de papilomatosis, los animales más afectados son los menores de un año de edad, y aquellos que no superan la enfermedad, desarrollan lesiones crónicas. Cuando existe un exceso de proliferación de verrugas a nivel de pezones, los animales afectados son descartados.

Los tratamientos utilizados para el control de la papilomatosis en la propiedad, se basan en el uso de productos inmunoestimulantes, específicamente el Inmodulen y Livanal; y se realiza también hemoterapia.

El Livanal es un estimulante reproductivo y metabólico, que contiene alcanfor, yodo y salicilato de sodio; se lo utiliza para mejorar procesos reproductivos y metabólicos en general, y como coadyuvante en algunas enfermedades infecciosas. La dosis es de 3ml por 100Kg de peso en bovinos adultos y 1.5ml por 50Kg de peso en terneros. Al momento del muestreo no estaba ningún animal en tratamiento. (LIFE, 2010)

El Inmodulen, por otro lado, es un inmunomodulador que activa varias poblaciones de leucocitos, para mejorar la respuesta inmunitaria, e induce proliferación celular; además, regula la secreción de mediadores inmunitarios y mantiene los niveles adecuados de Interleucinas (IL), IFN y factores de crecimiento. Este producto se recomienda en animales expuestos a inmunosupresión. La dosis utilizada es de 1ml por cada 10Kg de PV, vía IM y se puede repetir la dosis. Este producto era distribuido por PRONACA y actualmente se encuentra fuera del mercado. (CALIER, 2010)

La hemoterapia consiste en la obtención de 10 ml de sangre de un animal infectado por papilomatosis, y su administración a otro animal enfermo por vía IM. El objetivo de este tratamiento, es el estimular el sistema inmunitario del animal al que recibe la sangre y mejorar la respuesta inmunitaria al virus.

#### **12.1.2.- Hacienda “Cochamora”**

El ganado lechero de esta propiedad maneja cruces de Holstein, Brown Swiss, Montbeliarde y cruces Gyrolando.

El encalostramiento se realiza los 5 primeros días de vida del ternero: los 2 primeros días se le administra leche *ad libitum*; y los otros 3 días se les da 5 litros al día de leche. Igualmente realizan la desinfección de ombligo aunque no realizan el corte del ombligo descrito teóricamente por algunos autores. Los terneros que cumplen el primer mes, son trasladados a los potreros, que como mezcla forrajera reciben pasto gramalote, hasta los 5 meses de edad. No reciben sustituto de leche, pero las terneras hasta los 2 meses de edad reciben, 400g/día de balanceado, de marca PRONACA; y a partir de los 2 hasta los 6 meses, reciben 1 kg de balanceado al día.

Las vacas se mantienen en potreros, que como mezcla forrajera tiene *Brachiaria*. Los animales en producción reciben 2 kg/d de balanceado los primeros tres meses de lactancia, y luego esta cantidad va disminuyendo progresivamente. Se administran sales minerales a todo el hato, según el requerimiento de cada etapa, y en el rejo se administran específicamente 200 g/d de estas sales; no se da otro tipo de suplementación. El agua la consumen *ad libitum* en ríos o vertientes y durante el ordeño.

El plan sanitario incluye la vacunación contra Brucelosis a los seis meses de edad con cepa C-19; vacuna contra Aftosa desde el primer día de vida con revacunación semestral; y se utiliza la vacuna Ultrabac-7 de Pfizer, a los cinco meses de edad con revacunación semestral. Ultrabac-7 es una bacterina con toxoide, que contiene siete especies de *Clostridium*. En esta propiedad no se vacuna contra Leptospira, IBR ni DVB. Se realiza la prueba de tuberculina, y actualmente, según el propietario, la hacienda ha sido aprobada como predio libre de Tuberculosis, por Agrocalidad; y le falta un muestreo para ser considerada como predio libre de Brucelosis.

Las desparasitaciones se realizan con Albendazol y Febendazol, dos veces al año alternando los productos; en vacas al parto o cerca del parto, como desparasitante se usa la Doracmectina IM, que tiene una duración de 5 a 6 meses. Se aplica también Ivermectina: en las terneras al nacimiento se inyecta 1ml IM, y mensualmente se aplican 1,5 ml IM. En bovinos adultos se administra

Ivermectina cada 3 meses IM, a excepción de los animales que se encuentran en producción.

El ordeño es automático con un sistema en forma de espina de pescado con 10 puestos; maneja también tanque frío, y el sistema de ordeño sigue las normas establecidas por Nestlé para las Buenas Prácticas de Manejo BPM.

En lo que se refiere a otras patologías, las vacas en esta hacienda suelen presentar problemas podales, principalmente al final del invierno, para lo que se utiliza como tratamiento general la tilosina, y la aplicación local de sulfato de cobre. No se lleva a cabo el mantenimiento de los cascos. Los animales presentan algunos problemas reproductivos, atribuidos según el propietario a la presencia de DVB e IBR; sin embargo, estas patologías no han sido diagnosticadas mediante laboratorio. Según el ganadero, los problemas de mastitis son poco comunes, casi inexistentes, y en caso de presentarse, el tratamiento incluye la aplicación de un antibiótico intramamario. Algunos terneros presentan diarreas y en estos casos, son tratados con sulfa trimetropin, enrofloxacina y emicina

Para el manejo de vacunaciones utilizan una aguja por manga, es decir, una aguja cada 10 ó 12 animales; para muestreos para control de Brucelosis y Tuberculosis, manejan una aguja por animal. En cuanto a reproducción utilizan inseminación artificial.

Hablando exclusivamente del problema de la papilomatosis, según la información dada por el propietario, la mayor parte de animales afectados son los terneros que recién han sido trasladados al potrero. En esta hacienda solo se les da tratamiento a los terneros, y si la enfermedad se vuelve crónica y llega hasta la edad adulta se los deja de tratar. Las vacas con manifestaciones clínicas de la enfermedad, reciben mensualmente un tratamiento de hemoterapia que va acompañado de la aplicación de vitaminas. Los animales que tienen muchas lesiones a nivel de pezones son descartados; y el promedio de descarte de la propiedad es de 10-15 animales por año.

El tratamiento usado en esta hacienda para papilomatosis incluye la administración de Berenil, hemoterapia y cauterización de las lesiones. El Berenil es un quimioterapéutico que contiene Diaminacina y Antipirina, y se usa en el tratamiento de Piroplasma, Tripanosoma y Tricomoniasis. Se aplica en dosis de 1.5 mg/kg PV vía IM. El momento de realizar el muestreo ningún animal se encontraba en tratamiento. (INTERVET, 2010)

### 12.1.3.- Hacienda “Bernabé”

Pequeña propiedad que no maneja animales de alta cruce, y la mayoría tiene rasgos fenotípicos de raza Holstein y Brown Swiss.

El encalostramiento se lo realiza inmediatamente después del parto y hasta los 4 días de edad y se realiza la desinfección de ombligo al nacimiento. Se les administra a los terneros 4 lt/d de leche; y no se utilizan sustitutos de leche. Los terneros son trasladados al potrero a partir del 1er mes de edad; y hasta entonces son criados en corrales cerca a la sala de ordeño.

Se maneja como mezcla forrajera en los potreros, la Brachiaria con pasto miel y Saboya. Además, las vacas en producción reciben 3 kg/d de un suplemento durante el ordeño, que contiene palmiste, maíz y melaza, y es elaborado en la misma propiedad. El agua la consumen *ad libitum* de vertientes naturales. Las sales minerales se les administran únicamente a los animales que se encuentran en producción.

El manejo sanitario incluye las inmunizaciones frente a Brucelosis, que solamente la reciben las vaconas con cepa C19. Vacunan contra la Fiebre Aftosa, desde el primer día de edad. No utilizan vacunas contra Leptospira, IBR, DVB ni la vacuna Triple.

La desparasitación se realiza con Febendazol, en vacas cada 4 meses y en terneros cada 3 meses. Además, se administra Ivermectina oral, cada 6 meses. Los baños garrapaticidas se realizan cada 15 días con Amitraz.

El ordeño se realiza de forma manual con una limpieza antes de ordeño, pero no se realiza sellado con yodo. Solo se ordeña 1 vez al día.

En cuanto a enfermedades, no tienen mayor problema, aparte de podopatologías, y según la propietaria, tienen ligeros problemas de mastitis, y en estos casos utilizan como tratamiento Penicilina Intramamaria.

En lo que se refiere a manejo de instrumental para vacunaciones y aplicaciones de tratamiento, utilizan 1 aguja por animal; y en las desparasitaciones, utilizan 1 aguja por cada diez animales. En cuanto a reproducción, esta se realiza a través de monta directa, con un toro de otra propiedad, que según la información obtenida, no tenía problemas de papilomatosis.

Específicamente en el problema de papilomatosis, en esta propiedad, las lesiones aparecieron a los 4 meses de edad, y la enfermedad no ha desaparecido. Los animales no tenían gran cantidad de verrugas, y según la información, no se han descartado animales con papilomatosis, ni tampoco se han tenido problemas en el ordeño. El tratamiento contra este problema se basa en la aplicación tópica de una crema obtenida en la Botica Alemana, a base de Ácido Salicílico y no se administra ningún otro tipo de tratamiento sistémico. El momento del muestreo ningún animal se encontraba en tratamiento.

#### **12.1.4.- Hacienda Solánica**

Los animales utilizados para la producción de leche son cruces de Brown Swiss y Holstein.

El encalostamiento se lo realiza después del parto durante cuatro días y con una ración máxima de 4lt/día, cumplen con la desinfección del ombligo. Los terneros reciben balanceado 300 g/d hasta el 1er año, y permanecen bajo techo durante la noche hasta que cumplen los seis meses de edad. Estos son separados de sus madres y criados en otras instalaciones. Además se administra hierro a los terneros mensualmente hasta que cumplen los seis meses.

Los pastos tienen una mezcla de *Brachiaria*, pasto miel y maní forrajero, a las vacas en producción se les da 1 lb/d de balanceado y a todos los animales adultos se les inyecta ADE3 cada dos meses. A todos se les da sales minerales Ganasal plus, pero a las vacas en producción se les da todos los días y al ganado seco pasando un día. El agua es consumida *ad libitum* de ríos vertientes y ojos de agua.

El manejo sanitario incluye la vacuna Triple, a partir de los cuatro meses de edad y su revacunación anual; y la vacuna de Fiebre Aftosa, que la colocan cuando los terneros pasan los dos meses y revacunación cada seis meses. No se vacuna contra *Brucella*, IBR y DVB y tampoco se controla Tuberculosis. Hace alrededor de un año se realizaron exámenes para IBR y Brucelosis que resultaron negativos para IBR, pero positivos para Brucelosis.

En el plan de desparasitaciones se utiliza Ivermectina cada seis meses y baños garrapaticidas cada 21 días o cada mes dependiendo de la carga parasitaria. También se administra Febendazol y Albendazol cada 6 meses para endoparásitos.

El ordeño es manual y no hay manejo técnico. Existen cinco animales en producción con un promedio total de 40lt/d, es decir 8 lts/vaca; de estas cinco vacas, sólo dos presentan problemas de papilomatosis.

No existen problemas de otro tipo de patologías además de la papilomatosis, y el análisis positivo a *Brucella*. Las vacas en producción suelen tener problemas de mastitis que es tratada con antibióticos Intramamarios y vitaminas.

Para el manejo de vacunaciones se usa una aguja por animal y para tratamientos y desparasitaciones se utiliza una aguja por cada diez animales.

El problema de papilomatosis no es muy grave y los animales infectados tienen pocas lesiones. No se observan papilomas a nivel de ubre, sino solamente en uno de los animales. No se han descartado animales a causa de la enfermedad y, según el propietario, los terneros no tienen problemas con el

PV. Como tratamiento se administra Inmodulen junto con vitaminas. El momento del muestreo ningún animal se encontraba en tratamiento.

#### **12.1.5.- Propiedad N° 5**

Se trata de un pequeño productor, con 7 cabezas de ganado lechero con cruces de Brown Swiss y Holstein.

El encalostramiento se lo realiza inmediatamente después del parto y los terneros permanecen con las madres hasta los 4 o 5 días de edad, y posteriormente son manejados al sogueo. Los animales no son separados por etapas, sino que se manejan como un solo rebaño.

Se maneja como mezcla forrajera *Brachiaria* y pasto miel; y los animales no reciben ninguna suplementación. El agua la consumen *ad libitum* de vertientes naturales. Las sales minerales se les administran únicamente cuando ingresan al corral donde duerme el ganado.

El manejo sanitario incluye las inmunizaciones frente a Brucelosis con cepa C19. Se vacuna contra Fiebre Aftosa, desde el primer día de edad. No se usan vacunas contra *Leptospira*, IBR, DVB ni la vacuna Triple.

La desparasitación se realiza con Febendazol cada 4 meses y se administra Ivermectina oral cada 6 meses. Los baños garrapaticidas se llevan a cabo cada mes.

El ordeño se realiza de forma manual, con una limpieza antes del proceso, pero no realizan sellado. Sólo se ordeña 1 vez al día.

Los animales no presentan problemas relacionados con otras patologías, aunque eventualmente las vacas presentan problemas a nivel de patas; y según el propietario, no hay casos de mastitis.

En lo que se refiere a manejo de instrumental para vacunaciones se usa 1 aguja por animal; y en las desparasitaciones una aguja para todo el hato. En cuanto a reproducción, esta se realiza a través de monta directa, con un toro de la misma propiedad.

Específicamente en el problema de papilomatosis, las lesiones empiezan a aparecer entre los 4 y 6 meses de edad; y los animales que presentaron lesiones, tenían papilomatosis crónica porque ya eran adultos. En el momento de muestrear, no había ningún animal joven infectado en el hato. No se realiza ningún tratamiento para esta enfermedad; y tampoco hay pérdidas en producción relacionadas con la patología en estudio, por lo que las pérdidas económicas por papilomatosis en esta hacienda no fueron tomadas en cuenta.

## 12.2.- HEMOGRAMA Y QUÍMICA SANGUÍNEA

Se analizaron las muestras sanguíneas de los animales con infección clínica de papilomatosis, tomando en cuenta los siguientes parámetros: 1) Contaje total de Eritrocitos (GRT), 2) Contaje total de Leucocitos (GBT), 3) Hematocrito (Ht), 4) Hemoglobina (Hb), 5) Plaquetas totales. ANEXO 36

| PARAMETROS          | Min     | MAX     |      | Cochamora | El Porvenir | Bernabé   | Solánica  | Prop. 5   |
|---------------------|---------|---------|------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| GRT                 | 5000000 | 8000000 | L    | 4100153,8 | 4115128,2   | 4809166,7 | 4868000,0 | 3713333,3 |
| GBT                 | 5000    | 10000   | /uL  | 12464,6   | 13549,7     | 61958,3   | 11720,0   | 11866,7   |
| Ht                  | 30      | 40      | %    | 28,3      | 28,4        | 32,8      | 31,8      | 36,1      |
| Hb                  | 90      | 140     | g/L  | 88,8      | 87,4        | 106,3     | 95,6      | 87,5      |
| Plaquetas Totales   | 100000  | 800000  | /uL  | 185153,8  | 146538,5    | 314166,7  | 209100,0  | 220166,7  |
| <b>Diferencial</b>  |         |         |      |           |             |           |           |           |
| Linfocitos          | 2000    | 6500    | /uL  | 6215,6    | 14834,0     | 13588,7   | 6984,4    | 6695,2    |
| Monocitos           | 0       | 800     | /uL  | 1375,3    | 1435,5      | 1762,3    | 974,2     | 774,7     |
| N. seg              | 1000    | 4000    | /uL  | 2281,6    | 2032,0      | 3568,3    | 2100,8    | 4573,0    |
| Banda               | 0       | 120     | /uL  | 423,0     | 400,4       | 630,3     | 276,0     | 222,3     |
| Juveniles           | 0       | 0       | /uL  | 121,1     | 294,9       | 262,7     | 167,4     | 152,5     |
| Mielocitos          | 0       | 0       | /uL  | 93,1      | 34,4        | 33,4      | 7,3       | 93,3      |
| Basófilos           | 0       | 100     | /uL  | 148,7     | 350,5       | 509,9     | 341,2     | 0,0       |
| Eosinófilos         | 25      | 800     | /uL  | 1491,7    | 911,9       | 1867,5    | 771,4     | 1091,8    |
| <b>Química sang</b> |         |         |      |           |             |           |           |           |
| Proteínas totales   | 6       | 8       | g/dL | 7,3       | 6,9         | 7,4       | 7,0       | 7,0       |
| Albumina            | 3       | 3,6     | g/dL | 3,3       | 2,9         | 3,1       | 3,1       | 3,2       |
| Globulinas          | 2,7     | 5       | g/dL | 4,0       | 4,0         | 4,2       | 3,9       | 3,8       |

Fuente: Charry J, Hinojosa M, 2011

Además, se realizó el conteo diferencial de Leucocitos, que incluye los valores de: linfocitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos banda, granulocitos juveniles, mielocitos, basófilos y eosinófilos. Finalmente, se midieron también los valores sanguíneos de proteínas totales, albúmina y globulinas.

En la tabla de resultados se observan los rangos normales, y las celdas marcadas indican valores que no se encuentran dentro de los parámetros normales. *(Los datos con los valores de cada animal en cada muestreo, se encuentran en las fichas “Resultados Hemograma y QS” en el CD)*

### **12.2.1.- Hacienda “Cochamora”**

Se muestrearon en total 13 animales, cada uno 3 veces. En los resultados obtenidos del análisis de las muestras sanguíneas de estos animales es evidente la disminución en el conteo total de eritrocitos, además hay la presencia de leucocitosis, disminución del hematocrito y la hemoglobina, aunque esta disminución no es muy marcada. Las plaquetas totales están dentro de los rangos normales, aunque más cerca del límite inferior.

En el análisis diferencial se observa linfocitos dentro de rango; monocitosis marcada, neutrófilos segmentados dentro de rango. Hay también un aumento en neutrófilos banda, presencia de granulocitos juveniles y mielocitos. Existe basofilia, y eosinofilia marcada.

Los resultados del análisis de proteínas totales, albúmina y globulinas se encuentran dentro de los rangos normales.

### **12.2.2.- Hacienda “El Porvenir”**

Se muestrearon en total 13 animales con dos muestreos cada uno, pero para la obtención de la tercera muestra, solamente se tuvo acceso a 9 de los 13 animales infectados.

En los resultados del hemograma se observa una disminución en el conteo total de glóbulos rojos, leucocitosis marcada, disminución de hematocrito y hemoglobina no tan seria; y plaquetas totales dentro de rangos normales.

En el diferencial se observa la presencia de linfocitosis marcada, hay también monocitosis, y los neutrófilos segmentados se encuentran dentro de rangos normales. Hay un aumento en el conteo de neutrófilos banda, y se observa la presencia de granulocitos juveniles con valores altos, y también mielocitos. Hay basofilia marcada, y ligera eosinofilia.

Los valores de proteínas totales se encuentran dentro de los rangos normales, al igual que los valores de las globulinas; sin embargo, se observa una ligera disminución en los valores de albúmina (hipoalbuminemia), que no es tan seria.

### **12.2.3.- Hacienda “Bernabé”**

Se muestrearon en total 4 animales, 3 veces cada uno. Los resultados del análisis de los valores sanguíneos son los siguientes: existe una disminución en el conteo total de eritrocitos. Hay también un aumento marcado en el conteo total de glóbulos blancos, es decir leucocitosis. El hematocrito y la hemoglobina se encuentran dentro de los rangos, aunque en ambos casos, los valores obtenidos se acercan al límite inferior del rango. El conteo de plaquetas totales se encuentra dentro de los valores normales.

En el conteo diferencial de células blancas, se observa la presencia de linfocitosis y monocitosis. Los valores de neutrófilos segmentados se encuentran dentro de rango, aunque los neutrófilos banda se encuentran aumentados. Es evidente también la presencia de mielocitos y granulocitos juveniles, acompañados de basofilia y eosinofilia marcadas.

Los valores de proteínas totales, albúmina y globulinas se encuentran dentro de los parámetros normales del bovino.

### **12.2.4.- Hacienda “Solánica”**

Se obtuvo la muestra de 5 animales, pero solamente 2 veces; pues el propietario no permitió que se realice un tercer muestreo.

En los resultados del análisis de parámetros sanguíneos se observa una disminución en el conteo total de eritrocitos, acompañada de leucocitosis. Se observa también, que los valores de hematocrito y hemoglobina se encuentran dentro de los rangos normales, aunque acercándose más hacia el límite inferior. El valor de las plaquetas totales está dentro de los parámetros normales.

En el conteo diferencial de leucocitos, se observa la presencia de linfocitosis, monocitosis, basofilia y aumento en el número de neutrófilos banda; estos resultados van acompañados de la presencia de granulocitos juveniles y mielocitos. Los valores de neutrófilos segmentados y eosinófilos están dentro de los rangos normales.

Los valores de proteínas totales, albúmina y globulinas no muestran ningún tipo de alteración.

#### **12.2.5.- Propiedad N°5**

Se muestrearon en total 2 animales, 3 veces cada uno, con manifestaciones clínicas de papilomatosis. En los resultados de los análisis se observa una disminución en el conteo total de glóbulos rojos, acompañada de leucocitosis. El hematocrito se encuentra dentro de valores normales, aunque hay una disminución en los resultados de hemoglobina. El conteo de plaquetas totales se encuentra dentro del rango normal.

En el conteo diferencial, se observa una ligera linfocitosis, con monocitos dentro de rangos normales. Es evidente una neutrofilia, que está acompañada de un aumento en neutrófilos banda, junto con la presencia de granulocitos juveniles y mielocitos. Los basófilos se encuentran dentro de los rangos normales, pero se observa una marcada eosinofilia.

Los valores de proteínas totales, albúmina y globulinas están dentro de los parámetros normales.

### **12.3.- HISTOPATOLOGÍA**

El informe del análisis histopatológico de las muestras de papilomas reporta lo siguiente: ANEXO 37

*Macroscópico:* se reciben 6 impresiones de cortes tumorales epiteliales, papilomas, de consistencia dura

*Microscópico:* Células pleomórficas con núcleos de tamaño y formas muy irregulares; citoplasmas de color azul brillante, con incrustaciones macrocíticas e infiltrado linfocítico degenerativo.

Fuertes procesos inflamatorios de todo el estroma espicular corneal, con abundante tejido infiltrativo fibroso y mitosis muy desarrollada.

*Dictamen Diagnóstico:* carcinoma infiltrativo fibroso degenerativo.

## **CAPÍTULO 13: DISCUSIÓN**

En total se muestrearon 36 animales con manifestaciones clínicas de papilomatosis en las cinco propiedades estudiadas, de un total de 299 animales, es decir el 12.04% de la población estudiada. Durante el período en que se llevó a cabo el estudio, los propietarios suspendieron los tratamientos contra papilomatosis, para evitar que influyeran en los resultados obtenidos.

ANEXO 38

El análisis de los resultados incluye la evaluación de las distintas formas de manejo en cada una de las propiedades. Posteriormente se realiza el análisis de los resultados obtenidos de las pruebas sanguíneas, seguido de los resultados de los exámenes histopatológicos de algunas muestras de papilomas; y finalmente se describe la influencia de las características ambientales de la zona, en la presentación de la papilomatosis en las propiedades estudiadas.

### **13.1.- MANEJO DE LAS HACIENDAS**

#### **13.1.1.- Hacienda “El Porvenir”**

De la hacienda “El porvenir” se muestrearon 13 animales con manifestaciones clínicas de papilomatosis, que representan el 17.33% de la población de vacas lecheras de la hacienda. El promedio de edad de las vacas afectadas es de 1.77 años de edad; aunque, según el propietario, los animales más susceptibles son los menores de un año de edad. Se debe considerar que el momento de la realización del estudio, los únicos animales menores de un año, todavía se encontraban en corrales individuales y no habían sido trasladados a los potreros, que es el momento en el cual se tornan más susceptibles.

Además, de lo que se pudo observar en la hacienda, todos los animales infectados pertenecen a la especie de *Bos taurus* y son cruces con razas Holstein; mientras que en la misma hacienda los animales *Bos indicus*,

destinados a la producción de carne, no presentaban ningún tipo de lesión de papilomatosis.

El encalostramiento se maneja adecuadamente, y los animales reciben inmediatamente suficiente calostro para adquirir los anticuerpos maternos; esto, tomando en cuenta que las vellosidades intestinales del ternero, para el aprovechamiento de inmunoglobulinas (Ig) maternas, empiezan a disminuir su superficie de absorción a las 26-36 horas (hasta las 48 h según algunos autores) después del nacimiento y las vellosidades se vuelven impermeables, con una absorción casi nula de de Ig. (Vela D, 2009; Vélez M, 1997) Igualmente, realizan desinfección del ombligo y los terneros son trasladados a corrales individuales los cuales están separados de animales adultos y protegidos de corrientes de aire pero con suficiente ventilación la cual evita cualquier problema respiratorio.

Según lo descrito por varios autores, dos de los principales manejos que se deben realizar en un ternero son el encalostramiento y la desinfección del ombligo. El encalostramiento es muy importante por la cantidad de anticuerpos maternos (IgM, IgG e IgA) que reciben los terneros, y debido que tiene un efecto laxativo y estimula la función normal del tracto digestivo. La desinfección del ombligo se la debe realizar cortando el cordón umbilical de 5- 10 cm de la base, abriéndolo e introduciendo en él una solución concentrada de yodo, que no solo actúa como desinfectante sino también como un secante de tejidos. Otro manejo importante, es la separación del ternero de la madre y del resto de los animales adultos y del lugar del parto hacia un lugar limpio y seco, protegidos de corrientes de aire. (Vela D, 2009; Vélez M, 1997)

Los animales muestreados tenían una buena condición corporal (CC) 3, y no mostraban manifestaciones clínicas de ningún otro tipo de enfermedad, además de la papilomatosis y el problema de ectoparásitos, específicamente de garrapatas.

Con los datos que se recopilaron acerca de la nutrición de los animales, la mezcla forrajera utilizada es la adecuada para la zona, y teóricamente, cumple

con los requerimientos nutricionales del animal; aunque pueden tener una deficiencia en minerales, principalmente en Ca y P, que puede ser compensada con la administración de sales minerales en todo el hato, y balanceado en vacas en producción. Con la mezcla forrajera y los datos de las vacas muestreadas, se realizó un análisis para determinar si el alimento administrado satisface los requerimientos energéticos de los animales. Con estos datos se determinó un balance energético negativo para el animal promedio de la hacienda; aunque esta deficiencia de energía es mínima, pues tan solo les hace falta 10 Kcal para satisfacer sus requerimientos.

En cuanto al manejo sanitario, a pesar de que se cumple con un calendario de vacunación, las edades de vacunación no van de acuerdo al desarrollo del sistema inmune de los animales; las vacunaciones a la primera o segunda semana de vida, con vacunas de fiebre aftosa y DVB, no deberían realizarse, debido a que la inmunidad pasiva del animal le protege hasta al menos los 4 meses de edad; y al inmunizar tan tempranamente a los terneros, los anticuerpos maternos bloquean la acción de la vacuna y los animales quedan más susceptibles inmunológicamente. Se deberían realizar exámenes laboratoriales para la confirmación de DVB, Piroplasmosis y Anaplasmosis, para tomar las medidas de prevención y control necesarias.

De acuerdo a los datos obtenidos el promedio de producción de leche es de 9,5lts/d por animal, y el propietario calcula una pérdida del 10% por mastitis subclínica y 10% por no descenso de la leche en el equipo de ordeño, debido a la presencia de papilomas; lo que significa 1.9lts de leche al día por animal. El litro de leche se vende en 0,39 USD a Rey Leche; con lo que se calcula 0,68 dólares por día por animal en pérdidas por papilomas.

Considerando, que tres de las 13 vacas muestreadas se encontraban en producción, la pérdida al día es de 2.05 USD, si todas las vacas en producción tuvieran mastitis subclínica; y una pérdida de 1.08 USD, si ninguna tuviera mastitis; dando un promedio de pérdida de 1.57 dólares/día en producción.

En cuanto a tratamiento, para la papilomatosis se utiliza Livanal, a dosis de 15cc por animal, con dosis doble y a un costo de a 8.60 USD los 100 ml; se utiliza también Inmodulen: dosis de 0.75ml/ kg PV a doble dosis y a un costo de 6 USD los 50 ml. Calculando las dosis y sus costos, y considerando la aplicación semestral, el tratamiento representa un gasto de 8.11 USD/animal y 105.38 USD en 6 meses de los 13 animales infectados; lo que determina un costo del tratamiento de 0,59 USD/día.

En descarte de animales, se pierden alrededor de 4 animales por año que es el 5% de la población de ganado lechero; y considerando las pérdidas diarias en producción y el costo al día del tratamiento, el costo al día de la papilomatosis en esta hacienda es de 2.24 USD/d.

### **13.1.2. Hacienda “Cochamora”**

De la hacienda “Cochamora” se obtienen muestras de 13 animales con manifestaciones clínicas de papilomatosis, que representan el 7% de la población de ganado lechero. El promedio de edad de las vacas afectadas es de 3.4 años de edad, aunque como ya se mencionó, de acuerdo al propietario, los animales más susceptibles son los terneros que recién son trasladados al potrero; razón por la cual, se puede concluir que los animales muestreados no respondieron al tratamiento administrado en edades tempranas, desarrollando más bien una enfermedad de tipo crónico.

De lo observado en el muestreo, los animales infectados tienen características fenotípicas de la raza Holstein y Brown Swiss principalmente; mientras que el ganado destinado a la producción de carne no manifiesta problemas de papilomatosis; y de igual manera, las vacas en producción con cruces de Gyrolando tampoco se muestran afectadas.

El encalostramiento es manejado adecuadamente, pues tal como se mencionó en el análisis de la hacienda anterior, la administración del mismo permite que el ternero obtenga inmunidad pasiva de su madre. Igualmente se realiza la desinfección de ombligo, aunque no se realiza el corte del cordón cuando es muy largo, lo que conlleva a que el ternero arrastre materia orgánica

dificultando su limpieza como se pudo observar en algunos animales (anexo). Los terneros son mantenidos los primeros dos días con la madre y con todo el hato en producción, práctica que no se debería realizar, por el riesgo que corren los animales jóvenes de contagiarse de alguna enfermedad; y específicamente, de papilomatosis, pues los terneros están en contacto directo con animales adultos infectados con la enfermedad.

Los animales muestreados en esta propiedad presentaron una CC de 2 - 2.5, que es aceptable para las características de la zona; aunque existen casos específicos de vacas que mostraban una CC menor a 2, mientras que otros animales sufrían de problemas podales y heridas traumáticas, causadas por diversos factores, incluso por gallinazos de la zona. Todos los animales muestreados estaban infestados por garrapatas.

El animal promedio de la hacienda presenta un balance energético negativo bastante significativo, pues aún se requieren alrededor de 10 Mcal para poder cumplir sus requerimientos energéticos diarios. A pesar de que las vacas en producción de esta propiedad reciben mayor cantidad de balanceado, esta cantidad no es suficiente; considerando sobre todo, que los animales presentan peor CC, que debe ser compensada con el alimento. La falta de energía se debe principalmente al manejo de mezclas forrajeras, pues la combinación de pastos para alimento del ganado no brinda un aporte energético muy bueno. La baja CC de los animales puede hacerlos más susceptibles a enfermarse.

En lo que se refiere al plan sanitario, sucede lo mismo que en la hacienda anterior, pues se realizan vacunaciones a edades inadecuadas, por ejemplo, la vacuna de Fiebre Aftosa se la aplica desde el primer día de nacidos, resultando ineficaz y causando problemas en el sistema inmune. Además, algunos problemas reproductivos son atribuidos a IBR y DBV, no existen pruebas de laboratorio que lo confirmen, lo que impide la implementación de un plan de prevención y control; y puede estar afectando al sistema inmunológico del ganado.

Aunque en la hacienda se maneja un buen plan de control antiparasitario, se deberían realizar pruebas para Piroplasmosis y Anaplasmosis, debido a la gran cantidad de garrapatas que tienen los animales; pues estos artrópodos constituyen una fuente importante de transmisión del virus de la papilomatosis. Además, es importante mencionar que los animales que manifestaron mayores problemas de papilomatosis y peor condición física, eran los que presentaron una mayor infestación con estos ectoparásitos. Cabe recomendar que el manejo que se realiza para tratamientos y vacunaciones, usando una aguja por manga no se debería realizar ya que es una forma de transmisión de la papilomatosis y otras patologías.

Durante los muestreos se pudo observar que los animales presentan problemas podales, algunos de ellos muy graves; pero no se realiza un control adecuado de los mismos. Estas podopatologías generan estrés en los animales, provocando su inmunosupresión, de tal forma, que son más susceptibles a infectarse con PV.

De acuerdo a los datos obtenidos del propietario, el promedio de producción de leche en la hacienda es de alrededor de los 8 lts/día/ vaca; y según el ganadero, la pérdida en vacas con papilomas es de 2 lts/d. Calculando de la forma anterior las pérdidas de 10% por mastitis subclínica y 10% por no descenso de la leche en las máquinas de ordeño, la pérdida es de 1,6 lts/d, que coincide con lo calculado por el propietario. Debido a que el predio está libre de TB y en vía de declararse libre de Brucelosis, el litro de leche se vende en 0,45 USD. Es decir, que las pérdidas económicas en leche son de 0,72 USD/d/animal.

Si todas las vacas infectadas muestreadas tendrían el 20% de pérdida por mastitis y no descenso de leche, el costo diario sería de 9,36 USD/ día por los 13 animales infectados. Sin ninguna de las 13 tendría mastitis subclínica, la pérdida sería de 5,85 USD/día. Estos datos dan un promedio de pérdida de 7,61 USD/día/animales infectados.

El tratamiento de la papilomatosis en esta hacienda se realiza con una sola dosis de Berenil a los terneros enfermos, que tienen un peso aproximado de 100kg, y considerando que el frasco de 20 ml cuesta 6,50 USD, y manejando una dosis de 1,5 mg/kg; el costo por ternero es de 0,70 USD por animal. Además, realiza hemoterapia junto con la aplicación de vitaminas una vez al mes en vaconas, que tiene un costo de 10 USD/mes. Con estos datos, y considerando que cada animal infectado recibió un tratamiento de Berenil cuando era ternero, y 6 hemoterapias y vitaminas durante su etapa de crecimiento, el costo diario del tratamiento que recibieron los 13 animales es de 4,64 USD.

Anualmente se descarta un promedio de 12,5 animales por papilomatosis serias, que representa el 7,67% de la población de ganado lechero de la hacienda. Considerando la pérdida diaria en producción de leche y el gasto en un día de tratamiento del animal, el costo de la PV en un día en esta propiedad es de 12,24 USD.

### **13.1.3.- Hacienda “Bernabé”**

Se muestrearon en total 4 vacas infectadas con PV, que representan el 17,39% de la población total; solamente 2 de las vacas muestreadas estaban en producción. El promedio de edad de los animales muestreados es de 3 años de edad, pero se debe considerar, que de acuerdo a los datos obtenidos, estos animales presentaron la enfermedad a los 4 meses de edad, siendo esta una de las edades más críticas hablando inmunológicamente, por la disminución de los anticuerpos maternos. Es decir, que los animales muestreados presentan una papilomatosis crónica.

Los animales infectados tienen características fenotípicas de la raza Holstein y Brown Swiss, pero son animales mucho más pequeños que los estándares de la raza, y con un menor nivel de producción. No existían animales de especie *Bos indicus*.

La administración de calostro se maneja de acuerdo a las recomendaciones técnicas, para asegurar la ingesta de las inmunoglobulinas maternas, se realiza

la desinfección de ombligo y la separación del ternero hacia los corrales de cría.

Las vacas muestreadas tienen un promedio de CC de 2.5, pero es evidente la falta de desarrollo, incluso a las vacas adultas, pues eran animales pequeños. A diferencia de lo observado en otras haciendas, la cantidad de garrapatas es menor. Además, no presentan manifestaciones clínicas de ningún otro tipo de enfermedad, aunque en uno de los muestreos, una de las vacas que todavía no entraba a producción, presentó un absceso en uno de los cuartos de la glándula mamaria. A este animal se le realizó una punción en el cuarto afectado, de la cual se obtuvo pus de muy mal olor, y por las características de la pus y al ser una vaca que no estaba en producción, se sospechó de *Mycoplasma*, y se recomendó al propietario realizar un cultivo bacteriológico y el descarte del animal si el diagnóstico era positivo, pues se trata de un patógeno altamente contagioso. Sin embargo, lo único que se realizó fue el drenaje del absceso y el tratamiento con antibióticos.

En cuanto a la mezcla forrajera de los potreros y la administración del suplemento, a pesar de consumir los pastos adecuados para la zona, y un suplemento con una buena cantidad de energía (3.15 kcal EM/kg), los animales aún presentan un balance energético negativo; pues calculando el consumo de energía en pastos y suplemento, y los requerimientos de un animal estándar de la propiedad, aún le hacen falta 4,42 kcal/kg de EM para completar los requerimientos. Esta falta de energía puede ocasionar que el animal esté más susceptible a infecciones de cualquier tipo.

La administración de la vacuna de Brucelosis a animales adultos, aunque da protección debería hacerse a una edad más temprana para garantizar la eficacia de la inmunización. La aplicación de la vacuna de Aftosa, como ya se mencionó antes, no debería realizarse a una edad tan temprana por los problemas que implica. Se recomienda la aplicación de la vacuna Triple, debido a las características de los *Clostridium* y el ambiente en el que se encuentran los animales.

El promedio de producción de leche de los animales infectados es de 6 lt/d; y de acuerdo al propietario no tienen pérdidas por papilomatosis; pues las lesiones no afectan al promedio de producción de los animales, y tampoco les causan mastitis. El costo de la aplicación de la pomada de ácido salicílico como tratamiento, no es significativo. La papilomatosis no provoca pérdidas económicas significativas en esta propiedad

Se pudo observar, que las instalaciones donde se lleva a cabo el ordeño, eran compartidas con el ganado de la propiedad N°5, que tenía problemas de papilomatosis; y se recomienda no hacerlo, porque esto puede ser una forma de contagio, no solo de papilomatosis, sino también de otras enfermedades.

#### **13.1.4.- Hacienda Solánica**

De esta hacienda se obtuvieron cinco muestras de animales que representan en total el 14.7% de la población de vacas lecheras. El promedio de edad de los animales infectados es de 2.96 años, sólo 1 animal estaba en producción, y a diferencia de otras haciendas, según el propietario los terneros no tienen problemas de papilomavirus y la infección de los cinco animales atribuye a que se trajeron cuatro animales de otra zona (Mindo). Todos los animales infectados son cruces de Holstein y Brown Swiss.

El encalostamiento está bien manejado por las razones ya mencionadas anteriormente. Es la única hacienda que administra balanceado a los terneros siendo un plus para la nutrición de los mismos, y compensando las deficiencias que podrían tener a causa de los pastos, ayudando a disminuir estrés en los animales a causa de las condiciones climáticas.

Los animales muestreados presentan una buena condición corporal de 2.5-3 y no muestran ningún otro problema atribuido a otras patologías, no tienen problemas graves de ectoparásitos, y la infestación de garrapatas es mínima, a diferencia de otras propiedades. La mezcla forrajera es la adecuada para la zona y se administra balanceado a las vacas en producción, lo cual ayuda a compensar cualquier deficiencia de los pastos. Por otro lado, los animales

pueden presentar ciertas deficiencias minerales, sobre todo los del seco, porque no reciben suplementación con sales minerales todos los días.

En cuanto al manejo sanitario, ocurre algo similar que en las otras haciendas, pues las edades en las que se realiza la aplicación de las vacunas no son las adecuadas; la vacuna de Fiebre Aftosa, por ejemplo, se la debería aplicar recién a partir de los cuatro meses de edad. Por otro lado, aunque se tiene conocimiento de que los animales son positivos a *Brucella*, no se ha establecido ningún plan para el control de la enfermedad. Se deberían realizar exámenes laboratoriales de enfermedades infecciosas para realizar un plan sanitario más adecuado.

En cuanto al manejo nutricional, los animales presentan un balance energético negativo a pesar de la mezcla forrajera y la administración de balanceado; a los animales les hace falta 7,26 Mcal para poder satisfacer sus requerimientos energéticos. Como ya se ha mencionado en las otras propiedades, la falta de energía puede ocasionar una respuesta de stress, y por lo tanto el animal se vuelve más susceptible al contagio de enfermedades de todo tipo.

De acuerdo a los datos obtenidos, y a las observaciones realizadas, la pérdida en producción de leche por papilomatosis es casi inexistente, por lo que estos valores no fueron tomados en cuenta.

El tratamiento de la papilomatosis en esta hacienda se realiza con Inmodulen a dosis de 0,75ml/ kg PV a doble dosis y a un costo de 6 USD los 50 ml. Calculando las dosis y sus costos, y considerando la aplicación semestral, el tratamiento representa un gasto de 0.20 dólares al día.

#### **13.1.5.- Propiedad N° 5**

Se muestrearon 2 vacas con manifestaciones clínicas de papilomatosis, que representan el 28 % de la población total. El promedio de edad de los animales infectados es de 4 años; y como lo que sucede en las otras haciendas, al tratarse de animales adultos con problemas, es una infección de tipo crónica.

Los animales de esta hacienda son mestizos y tienen cruces con Brown Swiss y Holstein, pero son más rústicos y su pelaje es más bien de color café. El manejo de esta propiedad debería cambiar algunos factores; por ejemplo, el tener animales de distintas etapas como un solo hato en un solo corral, puede favorecer el contagio de papilomavirus y otros patógenos, entre los animales adultos, y los animales jóvenes; por lo que es recomendable la separación del ganado por etapas.

Los animales muestreados de esta propiedad tienen una CC de 3, y aparentemente, los animales no reflejan una mala alimentación, a pesar de que no se administra ningún tipo de balanceado ni suplemento, y que las sales minerales no se dan de acuerdo a los requerimientos nutricionales de cada etapa. De acuerdo a los análisis, se presenta un balance energético positivo, es decir, que estos animales están recibiendo suficiente energía de la mezcla forrajera que consumen, sin necesidad de balanceado. Sin embargo, se debe tomar en cuenta, que estos no son animales de alta producción y por lo tanto, sus requerimientos nutricionales no son tan exigentes.

El promedio de leche de los animales infectados está entre 5 y 6 litros de leche al día, y no tienen problemas de mastitis. Al no aplicar tratamiento a los animales con papilomas, ni tener pérdidas de leche por la enfermedad, esta propiedad no tiene gastos causados por la papilomatosis.

### **13.2.- ANÁLISIS DEL HEMOGRAMA Y PROTEINAS**

La disminución en el conteo total de glóbulos rojos (GRT), en el hematocrito en la hacienda “Cochamora” y “El Porvenir”, y la disminución de hemoglobina en las haciendas “Cochamora”, “El Porvenir” y en la Propiedad N°5, están relacionadas con la presentación de anemia.

Al analizar la disminución del hematocrito en las haciendas “Cochamora” y “El Porvenir”, junto con los valores de proteínas totales está dentro de los rangos normales, se sugiere la presencia de una anemia causada por factores

que incluyen hemorragia cavitaria inactiva, parásitos, anemia por disminución en la producción de glóbulos rojos, relacionada con algunos tipos de cáncer; y anemia por aumento en la destrucción de eritrocitos causado por enfermedades hematozoáricas. (Fierro C, 2008)

La anemia que muestran los resultados de los exámenes de los animales muestreados, no guarda relación con la papilomatosis, debido a que al ser un virus epiteliotropo, no provoca destrucción de los glóbulos rojos ni daños a nivel de médula ósea que justifiquen su disminución. La disminución en el conteo de eritrocitos totales; y la disminución en los valores de hematocrito y hemoglobina en algunas de las haciendas, se debe a la presencia de garrapatas, que transmiten enfermedades hematozoáricas como Babesia y anaplasma; y aunque no se tienen estudios acerca de estas patologías en ninguna de las propiedades en estudio, durante la realización del conteo diferencial de las muestras de sangre de los animales, se pudo observar por microscopio la presencia de inclusiones nucleares en eritrocitos, característicos de Babesia y Anaplasma.

En cuanto a los resultados de leucocitosis en las cinco propiedades en estudio, este aumento de leucocitos puede deberse a una gran variedad de causas, razón por la cual se analizaron los resultados del conteo diferencial de células blancas.

En el análisis diferencial de células blancas se observa que los animales presentan linfocitosis en las haciendas “El Porvenir”, “Bernabé”, “Solánica” y en la Propiedad N°5. Esta linfocitosis teóricamente se produce en casos de infecciones crónicas virales, después de vacunaciones, en algunos tipos de cáncer y también en casos de estrés por desnutrición (Fierro C, 2008; Montejó E y *et al*, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio, pueden ser atribuidos a que los animales se encuentran con una infección viral crónica, que específicamente puede tratarse de la papilomatosis, ya que el virus afecta y aumenta el número de linfocitos, específicamente linfocitos T gama-delta; y linfocitos B que expresan IgM. (Radostits O y *et al*, 2005)

Se encontró además en los análisis, una monocitosis marcada en 4 de las 5 propiedades (a excepción de la propiedad N°5), que se la relaciona con procesos inflamatorios crónicos, que en este estudio específicamente, pueden deberse a la presencia de la infección por papilomatosis; además, se debe considerar, que entre las funciones de los monocitos, se incluye la reparación hística, la cicatrización de heridas y la presentación de antígenos a los linfocitos T (Chávez M, 2007); entonces, es posible relacionar la monocitosis encontrada con la papilomatosis de los animales muestreados; pero no se debe olvidar que cualquier otra infección podría influenciar en la presentación de la monocitosis, pues aunque los animales no muestren clínicamente otro tipo de patología, tampoco se les han realizado pruebas laboratoriales que confirmen la presencia de otra enfermedad, como por ejemplo, el caso de DVB en la hacienda “El Porvenir”.

Además, en el caso de la hacienda “Solánica”, el aumento de monocitos y linfocitos podría estar causada por la presencia de *Brucella*, ya que como se mencionó antes, los animales de esta propiedad son positivos a esta patología.

Por otro lado, a pesar de que los animales tienen los contajes de neutrófilos segmentados en rango, hay un aumento en el número de neutrófilos en banda, mielocitos y juveniles lo que representa una desviación a la izquierda de tipo degenerativo que está relacionado con problemas oncológicos e infecciosos. (Fierro C, 2008). Debido a que la relación en bovinos de neutrófilos y linfocitos es de 1:2, una desviación a la izquierda por mínima que sea en el bovino, afecta al animal. (García J, 2010).

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa del sistema inmunitario, y el hecho de que los animales muestreados no presentan contajes de neutrófilos segmentados en rangos normales, puede indicar que los animales al momento de ser muestreados, no cursaban con una infección aguda, justificando también el aumento de monocitos que es la segunda línea de defensa. (Tizard 2004)

Se debe tener en cuenta, que en la Propiedad N°5, a diferencia de lo que ocurre en el resto de haciendas, en las que existe monocitosis con valores de neutrófilos segmentados dentro de los rangos; en esta propiedad, hay monocitos dentro de los valores normales, pero neutrofilia. Esto podría ser un indicativo de que los animales están cursando una infección más bien de tipo agudo, pues están aumentadas las primeras células de defensa inmunitaria (neutrófilos), mientras que los monocitos están todavía normales. Sin embargo, los animales de esta propiedad no mostraron alteraciones ni manifestaciones clínicas relacionadas con procesos infecciosos agudos.

Entre los resultados obtenidos, también es evidente la presencia de basofilia en todas las haciendas, excepto en la Propiedad N°5. La basofilia se relaciona con la producción de IgE, que se da en enfermedades cutáneas de tipo alérgicas y padecimientos inflamatorios y neoplásicos. (Tizar 2004; Fierro C, 2008)

Los animales de 4 de las 5 propiedades estudiadas, muestran además eosinofilia, la cual puede deberse a la presencia de parasitosis, especialmente garrapatas aunque también se lo relaciona con el aumento de enfermedades infecciosas, degradación tisular y neoplasias. (Tizar 2004; Fierro C, 2008)

La eosinofilia y basofilia encontradas en los análisis, es por un lado indicativo de la presencia de ectoparásitos en los animales; y por otro lado, puede relacionarse con las alteraciones a nivel de tejido epitelial y el daño tisular que sufren los animales que padecen de papilomatosis.

Sin embargo, en el caso de la propiedad "Solánica", solamente se presenta basofilia, aunque los valores de eosinófilos están cerca del límite superior. Estas variaciones en el contaje diferencial podrían también estar relacionadas con la presencia de una infección con *Brucella*, y no solamente con la presencia de papilomatosis. Además, se debe considerar, que los animales de esta hacienda no presentaban mucha infestación con garrapatas, que podría justificar el hecho de que eosinófilos se encuentran dentro de rango.

Aunque no se realizó ningún estudio sobre la presencia de cáncer en TGI inferior, ni en tracto reproductivo y tampoco de vejiga, relacionados con la enfermedad en estudio, tampoco se puede descartar la posibilidad de que la linfocitosis haya sido producida por la existencia de algún tipo de cáncer relacionado con la papilomatosis. La probabilidad de la existencia de un cáncer, es corroborado con la presencia de células blancas inmaduras (mielocitos, granulocitos juveniles y neutrófilos banda) cuya presencia en el conteo diferencial, generalmente se relaciona con problemas oncológicos.

Por otro lado, en general todos los animales de las 5 haciendas muestreadas presentan proteínas totales y globulinas dentro de los rangos normales, por lo que se descartan problemas infecciosos agudos. Además, en 4 de las haciendas, los valores de albúmina sanguínea también están dentro de los valores normales.

Sin embargo, específicamente en la hacienda “El Porvenir”, algunos de los animales presentan hipoalbuminemia, que teóricamente está relacionada con la disminución en la síntesis de esta proteína, incremento en su pérdida, secuestro o disminución en su aporte. (Fierro C, 2009); y debido a las características de los pastos de la zona, la disminución en niveles de albúmina puede deberse a deficiencia nutricional, y aunque algunos de los animales no se encuentran dentro de una CC óptima, no se observa ninguna otra alteración relacionada con la hipoalbuminemia, como por ejemplo edema, falta de apetito y problemas reproductivos en las 3 vacas que estaban en producción. (García J, 2010). Además, se menciona que la severidad de la hipoalbuminemia, depende de la ingesta proteica y la secreción de leche (Matheus N y *et al*, 2000?), y ya que los animales muestreados no son vacas de alta producción, la disminución de la albúmina no es tan seria, y por eso no se manifiesta clínicamente.

En cuanto a los problemas de hipoalbuminemia, el PV tampoco afecta a los resultados obtenidos; sin embargo, en caso de que existieran lesiones papilomatosis a nivel de tracto digestivo, estas interferirían con la alimentación de los animales, alterando indirectamente las vías metabólicas; pero no se

comprobó la presencia de lesiones en tracto digestivo medio ni inferior mediante necropsia. También puede estar relacionada a una falta de apetito de los animales que puede ser inducida en problemas de cáncer a causa del factor de necrosis tumoral alfa.

### **13.3.- EFECTOS DEL CLIMA SOBRE LOS BOVINOS**

Las propiedades en las que se llevó a cabo el estudio, se encuentran localizadas en la vía a “Los Laureles”, ubicada en el km. 104 Vía Calacalí- La Independencia, en el cantón Pedro Vicente Maldonado.

El cantón Pedro Vicente Maldonado, se encuentra ubicado a una altura de 600 msnm, es considerado como una región subtropical, cuyo ecosistema corresponde a un bosque nublado, húmedo tropical y húmedo subtropical. (Gobierno de la Provincia de Pichincha, 2002)

Presenta un clima cálido húmedo, con una temperatura promedio de 16°C, que puede llegar a los 25 °C sobre todo en los meses de febrero, marzo, abril y mayo. Tiene una humedad relativa sobre el 70% (84.5% a 87.5%), con precipitaciones anuales de 3300 a 3800 mm de agua, con una evaporación de 890 a 1100 mm. (Gobierno de la Provincia de Pichincha, 2002)

Tiene una topografía ligeramente ondulada y los ríos más importantes incluyen al Guayllabamba, Caoní, San Dimas, Jordán, Pizará, Pachijal, Guadalupe, Sábalo, Silanchi, Cristal, Achiote, entre otros. El tipo de suelo del sector es franco arcilloso, que se caracteriza por ser un suelo poroso, suave y masivo; de textura fina que usualmente se quiebra cuando está seco; o que forma una cinta cuando está húmedo. (Cueva J, Osorio A. 2010; Chacalán N, 2007; Gobierno de la Provincia de Pichincha, 2002)

El factor climático es muy importante dentro de cualquier sistema de producción, porque afecta directamente al animal y no puede ser manipulado. En zonas tropicales húmedas, debido a sus características, la variación de temperatura a lo largo del día es mínima, y el exceso de calor, puede ocasionar que el animal esté sometido a un constante stress. Por otro lado, la cantidad de

lluvias de la zona afectan a la disponibilidad de alimento e influyen en la humedad. (Vélez M, 1997)

La cantidad de agua de precipitaciones junto con el tipo de suelo de una zona geográfica, determinan en un sistema productivo, el tipo de mezclas forrajeras que pueden usarse, el sistema de pastoreo más adecuado para la zona y como conservar los forrajes; es decir, que influyen en la alimentación del animal. (Vélez M, 1997). Debido a las características del suelo de la zona en estudio, y las constantes precipitaciones que presenta, el tipo de mezclas forrajeras que se utiliza son las de tipo tropical, que aunque brindan un buen aporte nutritivo al animal, su aporte de proteínas y energías no es similar a las que reciben los animales de ganaderías lecheras de la Sierra, lo cual influye directamente en CC del animal y en los niveles productivos del mismo.

Además, las lluvias constantes, sobre todo durante el invierno, hacen que la disponibilidad de pastos disminuya, y debido a la gran cantidad de lodo que se forma, los animales se encuentran sometidos a un mayor estrés, y son mucho más susceptibles a desarrollar cualquier tipo de patología.

Por otro lado, la humedad relativa influye directamente sobre el animal pues determina la velocidad de la pérdida de calor por evaporación en el sudor y la humedad en el tracto respiratorio. Una humedad relativa alta favorece el desarrollo de patógenos y de sus vectores. En cuanto al viento, este es importante pues ayuda al balance térmico del animal, pues remueve el aire saturado de humedad formado por el sudor, y facilita su evaporación; y puede aumentar o reducir la carga de calor. (Vélez M, 1997)

La humedad relativa de acuerdo a los datos de la zona, es bastante alta, pues alcanza valores de más de 80%; esto, junto con temperaturas promedio de 25°C dan las características ambientales más apropiadas para la supervivencia y circulación del virus de la papilomatosis, y también de muchos otros patógenos y parásitos.

Por otro lado, al ser los bovinos animales homeotermos, deben utilizar varios medios para disipar su calor corporal. Estos mecanismos incluyen acelerar

procesos fisiológicos, que incluyen la producción de sudor, el aumento de la circulación periférica y aumento de la frecuencia respiratoria; para así transmitir calor al medio. Si esto no es suficiente, el animal empieza a disminuir su actividad corporal y consume menos alimento. (Vélez M, 1997)

Las temperaturas elevadas disminuyen la actividad metabólica de los bovinos, y en estos animales disminuyen los niveles de las hormonas del crecimiento, tiroxina y glucocorticoides; al disminuir la actividad metabólica, también hay una baja en la producción. Además, con un exceso de calor el rumen reduce la producción de ácido propiónico y así disminuye la cantidad de energía disponible. Al aumentar la frecuencia respiratoria, se produce una alcalosis respiratoria que se compensa con la eliminación de bicarbonato en la orina. Además, según algunos estudios, durante las épocas de mayor calor, aumenta la presentación de mastitis clínicas. (Vélez M, 1997) Este exceso de calor y la disminución del consumo de pastos, así como la disminución en el aprovechamiento de la energía, pueden influir en la susceptibilidad de los animales a diversos patógenos.

Por otro lado, los pastos de las zonas tropicales tienen menor digestibilidad, lo cual determina, que el alimento pase más lentamente por el TGI, y se producen menos ácidos grasos volátiles (AGV) con mayor producción de calor durante la digestión, por lo cual la ingesta de alimento se reduce. Es importante mencionar, que los animales de razas lecheras típicas interrumpen el consumo de alimento a partir de los 26-28°C de temperatura ambiental, mientras que el ganado *Bos indicus*, lo hace recién a partir de los 35-38°C. (Vélez M, 1997)

Como se pudo observar, los cruces raciales utilizados en las propiedades analizadas, incluyen a animales de tipo Holstein y Brown Swiss, que por un lado mejoran la productividad de leche; pero sus características les hacen menos resistentes al ambiente de la zona; y sobre todo son más sensibles a la temperatura ambiental y a la presencia de parásitos.

Cuando el bovino come, aumenta la producción de calor metabólico, en proporción al tiempo de ingestión y es mayor con los alimentos ricos en fibra.

Debido a que los pastos de zonas tropicales tienen mayor porcentaje de fibra, y su crecimiento es poco denso, los períodos de alimentación son más largos. Además, cuando hay exceso de calor ambiental, el pH del rumen se hace más ácido y afecta a la digestión, y puede llegar a producir acidez crónica; además se reduce el flujo sanguíneo a los órganos drenados por la vena porta. También se ha observado que a temperaturas altas disminuye la eficiencia de la conversión alimenticia. (Vélez M, 1997)

El estrés térmico disminuye el flujo sanguíneo al útero, y puede afectar a la viabilidad del embrión, además de disminuir los niveles de estrógenos; determinando así una menor fertilidad. Estos problemas se presentan con mayor incidencia en épocas de gran cantidad de lluvias, debido al aumento de la humedad ambiental (Vélez M, 1997)

Los animales que se desarrollan en zonas tropicales, tienden a ser de menor tamaño que los que crecen en zonas templadas. Además, la producción de leche suele disminuir, debido principalmente a la disminución del consumo de alimento y al menor valor nutritivo de los pastos de estas zonas, y también a que disminuye el flujo sanguíneo a la ubre. Con las características de los forrajes para zonas tropicales, la producción de leche no se espera que supere los 8- 10 lts. (Vélez M, 1997).

El cantón Pedro Vicente Maldonado por sus características climáticas es óptimo para la supervivencia del papilomavirus ya que es un virus que puede sobrevivir en el medio ambiente ya sea en alambres, madera, corrales en general, instrumentos etc., y tolera altas temperaturas. Esta zona no solo le da un medio adecuado al virus si no también a vectores de la enfermedad como son mosquitos y garrapatas principalmente que le permiten al virus encontrar un huésped para su multiplicación de una forma más rápida, a diferencia de otras zonas en las que posiblemente el virus no podría sobrevivir no solo por el cambio de temperatura si no también la falta de estos vectores. El manejo que se da en estas haciendas y sus instalaciones también es un factor que influye en la presencia de la enfermedad ya que como se observó, las condiciones

higiénicas son deplorables, siendo el medio adecuado para la presentación de diversas entidades patológicas.

## CAPÍTULO 14

### 14.1.- CONCLUSIONES

1. El 12% (36 animales) del total de la población de ganado de leche de las cinco propiedades estudiadas presentó manifestaciones clínicas de papilomatosis.
2. Las lesiones de papilomas fueron observadas en distintas zonas anatómicas de los animales, presentándose en mayor porcentaje a nivel de glándula mamaria con 77.78% (28 animales), seguido de cuello, hombro y espalda 25% cada uno, (9 animales en cada zona anatómica). También se observaron lesiones a nivel de extremidades en un 16.67% (6 animales en cada zona), oreja, tórax ventral con 11.11% (4 animales en cada zona), abdomen en 8.33% (3 animales), tórax, pezón, morro, tren posterior en 5.56% (2 en cada zona) y párpados en 2% (1 animal).
3. La ubicación y las características de las lesiones no son suficientes para determinar el tipo de BPV que está afectando a los animales muestreados.
4. De los animales muestreados solamente uno era macho, y el resto fueron hembras de diferentes edades. Sin embargo, se debe considerar que se sometieron a estudios propiedades de producción lechera, que como método de reproducción manejan en general IA; y la población de machos es mínima.
5. De los estudios realizados, los bovinos más susceptibles a contraer la infección son los de razas de la especie *Bos Taurus*, principalmente, los animales de raza Holstein y Brown Swiss y sus cruces. Por sus características, estos animales son menos resistentes al ambiente de la zona, y eso los hace más vulnerables al contagio con PV.
6. Los animales destinados al engorde, de la especie *Bos indicus*, no mostraron lesiones relacionadas con la papilomatosis bovina; a pesar, de que muchos de ellos se encontraban en contacto directo con animales *Bos Taurus* con infección clínica.

7. De acuerdo a la bibliografía consultada, se puede deducir que en el caso de los animales de tipo *Bos indicus*, la susceptibilidad al papilomavirus se incrementa a medida que aumenta la pureza de la raza; mientras que en cruces industriales para leche o carne, esta resistencia al virus se incrementa por la heterosis.
8. A pesar de que los animales *Bos indicus* que se encontraban en la zona de estudio no presentaban la enfermedad clínicamente, no se puede descartar la posibilidad de que éstos sean portadores latentes, pero que no desarrollan la enfermedad, debido a su rusticidad y a que, por su genética, son animales que se acoplan más fácilmente y mejor a ese tipo de clima.
9. La susceptibilidad de los animales con cruces Holstein y Brown Swiss, se relaciona también con la carga de ectoparásitos que presentan estos animales. Las razas mencionadas presentan una mayor infestación con garrapatas, que además de contagiarles enfermedades hematozoáricas como Anaplasmosis y piroplasmosis, pueden ser un vector muy efectivo para la transmisión del BPV.
10. En la zona en la que se realizó el estudio, la genética de los animales juega un papel importante en la presentación de la papilomatosis, ya que los animales *Bos taurus* que tienen cruces con *Bos indicus*, eran menos susceptibles a manifestar lesiones clínicas.
11. La carga de garrapatas que tienen los animales también se relaciona con la cantidad y extensión de las lesiones papilomatosas, pues se pudo observar, que los animales con menor cantidad de garrapatas, tenían pocos papilomas y de menor tamaño; mientras que los animales con lesiones más extensas, tenían también una mayor carga parasitaria.
12. El promedio de edad de todos los animales con manifestaciones clínicas de papilomatosis, de los que se obtuvieron muestras, es de 3.03 años de edad. Aunque es una edad en la que los animales ya no son tan susceptibles a la infección, y ya no deberían tener lesiones; se trata de animales con una papilomatosis crónica, que no han logrado superar la infección inicial que desarrollaron a edades tempranas.

13. De acuerdo a datos del marco teórico, y a la información de los propietarios, los animales más susceptibles a contagiarse con el papilomavirus bovino, son los terneros menores de un año de edad. Esta susceptibilidad se basa principalmente en el hecho, de que estos animales están recién desarrollando su sistema inmunológico y están perdiendo los anticuerpos maternos. Además, en el caso de las propiedades estudiadas, los terneros son más susceptibles al contagio en el momento en que son trasladados a los potreros para su crecimiento. Este cambio puede provocar estrés que inmunodeprime a los animales, y el virus puede infectarlos con mayor facilidad.
14. De acuerdo a lo observado, los animales con papilomatosis no muestran alteraciones clínicas graves ni específicas, mantienen sus constantes fisiológicas normales, no experimentan anorexia ni decaimiento. Aunque algunos animales infectados sí presentaron una pérdida de CC marcada, la cual puede estar relacionada con varios factores, principalmente el bajo valor nutritivo de los pastos de la zona; y las temperaturas ambientales altas, que pueden limitar el consumo de pastos para disminuir la producción de calor metabólico.
15. El manejo de instrumental durante vacunaciones, desparasitaciones y tratamientos, es un factor que influye directamente en la transmisión de la enfermedad dentro del hato. Por ejemplo, el uso de una aguja por cada diez animales es una forma fácil de transmisión del virus entre los animales.
16. La vacunación a edades no adecuadas, como por ejemplo, la vacuna de Fiebre Aftosa al primer día de edad, influye directamente en el sistema inmune de los terneros; lo que hace que los animales sean menos inmunocompetentes, haciéndolos más susceptibles a cualquier tipo de patología, incluyendo la papilomatosis.
17. El uso del análisis sanguíneo no es una técnica diagnóstica para la papilomatosis; sino que es utilizada más bien, para el monitoreo de la salud de los animales. Sin embargo, las alteraciones en el conteo de

- leucocitos específicos, puede ayudar a detectar la posible presencia de neoplasias desarrolladas a partir de papilomas.
18. En los resultados obtenidos en los análisis de hemograma y química sanguínea, se observa la presencia clara de anemia; sin embargo, esta alteración no está relacionada con la papilomatosis, ya que considerando las características del virus, éste no afecta a eritrocitos ni a médula ósea, y no se justifica su disminución por BPV. La anemia es atribuida a la alta carga parasitaria de garrapatas y a la presencia enfermedades hematozoáricas observadas en el diferencial.
  19. Es evidente la linfocitosis en los resultados de los análisis, la cual, sí puede estar causada por papilomatosis, ya que de acuerdo a referencias bibliográficas, se ha encontrado ADN del virus en linfocitos de los animales con lesiones de papilomatosis.
  20. Los neutrófilos segmentados se encontraron dentro de los rangos normales, lo cual indica que la infección que presentan los animales, no es de tipo agudo. Además, no se han reportado hallazgos de neutrofilia en animales con infección por papilomavirus.
  21. En los resultados se observa también monocitosis, la cual está relacionada con infecciones de tipo crónico; y en el caso específico de los animales en estudio, por tratarse de bovinos adultos, podría ser causada por una papilomatosis de tipo crónico.
  22. Se observa también la presencia de basofilia y eosinofilia, que no se relacionan directamente con la infección por papilomavirus; aunque los daños hísticos que provocan las lesiones, pueden llegar a incrementar los valores de estas células. Sin embargo, en este estudio, la eosinofilia específicamente se relaciona con la presencia de parasitosis.
  23. No se observan variaciones en los valores de proteínas, albumina ni globulinas relacionados con papilomatosis.
  24. De acuerdo a varios estudios, las lesiones de papilomas en las que no ocurre una regresión espontánea, son más susceptibles a experimentar transformaciones neoplásicas, y pueden convertirse eventualmente en carcinomas de células escamosas. Esta transformación ocurre

- principalmente cuando las lesiones son causadas por BPV-2 y BPV-4, que son tipos virales causante de cáncer a nivel TGI y vejiga.
25. En los resultados obtenidos en el contaje diferencial de leucocitos, se pudo observar el aumento de células inmaduras, que incluyen neutrófilos banda, mielocitos y granulocitos juveniles; que son células típicas de procesos degenerativos relacionados con cáncer. Además, a pesar de que no se realizó una necropsia de alguno de los animales infectados, para confirmar o descartar la presencia de papilomas a nivel de vejiga y TGI inferior; no se debe descartar la posibilidad de que estos animales ya estén desarrollando transformaciones neoplásicas relacionadas con el virus.
  26. La presencia de células blancas inmaduras en el diferencial, concuerdan con el diagnóstico histopatológico de las muestras de lesiones, pues se confirma la presencia de papiloma y se diagnostica un carcinoma a nivel epitelial.
  27. En la zona en estudio, se encontró presencia de helechos (*Pteridium spp.*) en gran cantidad, junto con los pastos a los que tienen acceso los animales. A pesar de que las vacas generalmente no consumen este tipo de plantas, la ingesta de pequeñas cantidades por un tiempo prolongado, lleva a una intoxicación de tipo crónica. Esta intoxicación, junto con la acción de los componentes mutagénicos del helecho, y su interacción con las proteínas del papilomavirus, pueden desencadenar el desarrollo de neoplasias.
  28. Las características ambientales y climáticas de la zona en estudio, brindan el ambiente adecuado para la supervivencia, desarrollo y transmisión del virus. Estas mismas características, hacen que los animales *Bos taurus*, sean más susceptibles a la infección.
  29. La papilomatosis es una enfermedad de difícil control y erradicación; y no existen métodos específicos, para evitar el ingreso del virus en el hato. Debido a las características y a la gran variedad de tipos de BPV, no existe un tratamiento 100% efectivo a nivel de la zona en estudio.

30. Basándose en información bibliográfica y en otros estudios, la mejor forma de controlar la papilomatosis en un hato, es mediante el uso de la autovacuna, siempre y cuando ésta contenga los tipos específicos de virus que afectan a cada propiedad, y que sea elaborada en un laboratorio especializado.
31. En las propiedades estudiadas, se utiliza mucho como tratamiento la hemoterapia, que no ha sido efectiva, pues las lesiones no han desaparecido. Además, existen estudios en los que se ha detectado ADN viral a nivel de sangre, lo que significa, que este método de tratamiento es un más bien un modo de transmisión de la enfermedad.
32. En algunas de las propiedades en estudio, la papilomatosis no representa una pérdida económica significativa. La pérdida promedio diaria en las cinco propiedades es de 3.00USD, y considerando que el precio promedio de un 1 lt de leche, es de 0.40 USD, las pérdidas al día representan 7.5 lts de leche.
33. Se debe considerar que algunas propiedades tienen poca producción lechera, y por lo tanto las pérdidas por papilomatosis no son significativas. Sin embargo, se puede observar, que en ganaderías con mayores niveles de producción, las pérdidas económicas por papilomatosis aumentan.
34. A pesar de que la ganadería de leche en las zonas tropicales y subtropicales del país presentan problemas de papilomatosis, no se han realizado estudios de incidencia, prevalencia de la enfermedad ni tampoco se han desarrollado programas para el control de la misma.

## CAPÍTULO 15

### 15.1.- RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a los ganaderos de las propiedades muestreadas, la introducción de razas lecheras tropicales *Bos indicus*, ya que debido a las observaciones, estos animales son menos susceptibles a la enfermedad.
2. Debido a que los animales más susceptibles a la enfermedad son los menores de un año, se recomienda un manejo adecuado de inmunizaciones, de acuerdo a la especificación de cada enfermedad; y no se recomienda vacunar animales menores de cuatro meses de edad, debido a las características del sistema inmunológico. Un buen plan sanitario puede disminuir la susceptibilidad a varias enfermedades, incluyendo la papilomatosis.
3. Se debe implementar un plan de control de la papilomatosis, y según varias investigaciones, la forma más efectiva y económica, es la utilización de una autovacuna, la cual debe ser realizada por un laboratorio especializado y con muestras de papilomas de los animales infectados del hato, para garantizar la inmunización frente al tipo de virus específico que afecta al ganado.
4. No se recomienda el uso de la hemoterapia en ninguna circunstancia, debido a la presencia de ADN viral a nivel sanguíneo.
5. Se recomienda manejar una aguja por cada animal en cualquier tipo de tratamiento o desparasitación, en cualquier tipo de producción animal; pues esto limita las posibilidades de contagio de la papilomatosis y de otras patologías.
6. Es importante establecer normas adecuadas de bioseguridad en cada una de las haciendas, para controlar la entrada de cualquier patología.
7. Debido a que se ha encontrado ADN viral, específicamente de BPV-4 y BPV-2, en tejidos y células reproductivas, incluso en animales sin manifestaciones clínicas de papilomatosis; se recomienda el análisis de las pajuelas reproductivas para descartar la presencia del virus, y de esa forma, evitar que ingrese la enfermedad a las ganaderías. El mismo

análisis debería ser realizado por las empresas que se dedican a transferencias de embriones en el país.

8. Se recomienda la realización de un buen plan nutricional en cada hacienda, ya que muchas de las propiedades estudiadas presentaron un balance energético negativo.
9. Con los resultados obtenidos en los análisis realizados, se recomienda la elaboración de alguna otra investigación que incluya la necropsia de animales con papilomatosis crónica, para confirmar o descartar la presencia de cáncer a nivel de TGI y de vejiga en estas propiedades.
10. Se recomienda la realización de un estudio epidemiológico de la enfermedad, para poder establecer normas más adecuadas para el control de la papilomatosis.
11. Se recomienda realizar análisis de laboratorio de enfermedades infecciosas periódicamente, para su respectivo control.
12. Los ganaderos que manejan producción lechera en zonas tropicales y subtropicales, deberían tomar en cuenta que el ambiente afecta directamente al estado de salud y a niveles de producción de los animales, por lo cual, se deberían implementar ciertas medidas de manejo que disminuyan el estrés en los animales.

## REFERENCIAS

1. **AVKI S**, Turutoglu H, Simsek A y A. Unsal.. Clinical and immunological effects of Newcastle disease virus vaccine on bovine papillomatosis. En línea. Vet Immunol Immunopathol. 2004;98(1-2):9-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127837>
2. **BÔRKU MK**, Atalay O, Kibar M, Cam Y y A. Atasever. Ivermectin is an effective treatment for bovine cutaneous papillomatosis. En línea. Research in veterinary Science. 2007; 83 (3):360-363. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com>
3. **BORZACHIELLO G**, Russo V, Gentile F y *et al.*. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. En línea. Oncogene 2006; 25:1251-1260. Disponible en: <http://www.nature.com/onc/journal/v25/n8/pdf/1209152a.pdf>
4. **CALIER**. Inmodulen. Vademecum Veterinario. 2010 Disponible en: [http://www.sani.com.ar/producto.php?id\\_producto=2345](http://www.sani.com.ar/producto.php?id_producto=2345)
5. **CARVALHO C**, de Freitas AC, Brunner O, Bentim LG, Yagui A, Becak W, Stocco R. Bovine Papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. En línea. Brazilian Journal of Microbiology. 2003;34(1):82-84.
6. **CHALACÁN N.** Informe geológico de la cuenca del río Tatalá. Proyecto: manejo de la cuenca del río Tatalá. 2007. Disponible en: [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/informe-geologico-cuenca-rio-tatala/id/52148754.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/informe-geologico-cuenca-rio-tatala/id/52148754.html)
7. **CLAUS M**, Lunardi M, Alfieri AF, Sartori D, Fungaro H y Alfieri AA.. "Identification of the recently described new type of bovine papillomavirus (BPV-8) in a Brazilian beef cattle herd." Pesq. Vet. Bras. 2009;29(1):25-28
8. **CUEVA J**, Ososrio A. Determinación de la textura del suelo en terreno. En línea. Sistema interactivo de apoyo al riego. Siar Limarí. 2010. Disponible en: [http://www.siar.cl/docs/protocolos/Det\\_textura\\_suelo.pdf](http://www.siar.cl/docs/protocolos/Det_textura_suelo.pdf)

9. **DiCYT**. “Investigadores ecuatorianos crean una vacuna contra la papilomatosis bovina”. 2010. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com>.
10. **FAO**. *Paspalum dilatatum Poir*. Sistema de información de los recursos del pienso. 2010. Disponible en: <http://www.fao.org>
11. **FIERRO C**. Laboratorio clínico veterinario. Universidad de las Américas. Quito-Ecuador. 2008.
12. **GARCEA, R, DiMaio D**. “The Papillomaviruses”. Springer Sciences y Business Media. Estados Unidos. 2007:12-54. Disponible en: <http://books.google.com.ec>.
13. **GARCÍA J**. Enfermedades Infecciosas. Clínica de Animales Mayores. Universidad de las Américas. Quito- Ecuador. 2010.
14. **Gobierno de la Provincia de Pichincha**. “Pedro Vicente Maldonado”. 2002. Disponible en: <http://www.pedrovicentemaldonado.gob.ec>
15. **International Agency for Research on Cancer (IARC)**.. “Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to Humans: Human Papillomaviruses”. World Health Organization. Francia. 2007; 90:66.
16. **INTERVET**, Schering-Plough Animal Health. “Berenil”. 2010. Disponible en: <http://www.intervet.com.mx/productos/berenil /020 informaci n del producto.aspx>
17. **KNIFE D y P. Howley**.. Fields Virology. 5ta Edición. Lippincott Williams y Wilkins, Wolters Klubwer Business. 2007. Volumen I. p.59-113
18. **LIFE**. “Livanal”. 2010. En línea. Disponible en: <http://www.laboratorioslife.com/livanal.htm>
19. **LINDSEY CJ, Almeida ME, Vicari CF, Carvalho A, Yagui A, Freitas AC, Becak W y RC Stocco**. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. En línea. Genet. Mol. Res. 2009;8(1):310-318. Disponible en: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2009/vol8-1//pdf/gmr573.pdf>
20. **MARTIN S**.. How to cure cattle warts. En línea. eHow. 2010?Disponible en: [http://www.ehow.com/how\\_5534911\\_cure-cattle-warts.html](http://www.ehow.com/how_5534911_cure-cattle-warts.html)

21. **MATHEUS** N, Ramírez F, Salazar C, Leonardi F y H Bravo. Relación albúmina:globulina plasmáticas en tres épocas del año en vacas de la raza Carora del Estado Lara, Venezuela. En línea. Universidad Lisandro Alvarado. 2000? Disponibilidad: <http://cdcht.ucla.edu.ve/CCC/REVISTA/a72001/Articulo%20en%20gacet a.%20I%20parte.%20Ultimo.htm>
22. **McBRIDE** A, Dlugosz A y Baker C.. "Production of infectious bovine papillomavirus from a cloned viral DNA by using an organotypic raft/xenograft technique". National Institutes of Health. PNAS 90 2000 (10): 5534-5539
23. **MONTEJO** E, Martínez O, Pérez F, Mendoza O, Duvergel J, Ramírez W y W. Sosa. Reacción Leucocitaria ante el estrés nutricional provocado por la sequía en el bovino. REDVET 2007;8(7):1-4. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
24. **MURPHY**, F, Gibbs P, Horzinek M, Studdert M.. "Veterinary Virology". 3ra Edición. Elsevier. Estados Unidos 1999: pp. 335-342
25. **NIECE** K.. The structure and function of Bovine Papillomavirus. En línea. eHow. 2010. Disponible en: [http://www.ehow.com/about\\_6691737\\_structure-function-bovine-papillomavirus.html](http://www.ehow.com/about_6691737_structure-function-bovine-papillomavirus.html)
26. **RADOSTITS** O, Gay C, Blood D y K.. Hinchcliff. Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9na edición. Elsevier-Saunders. Inglaterra. 2005:p.1244-1247
27. **RAMÍREZ** JL, Vega M, Acosta I y D Verdecia. Caracterización nutritiva de las especies *Brachiaria decumbens* e híbrido en un suelo fluvisol de Cuba. Livestock Research for Rural Development 2009;21(2). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd21/2/rami21023.htm>
28. **REDVET**. "Verruga de los pezones". 2010. Disponible en: [www.veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)
29. **SALIB** F. y HA Faghali.. Clinicial, epidemiological and therapeutic studies on Bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt in 2008. En

- línea. *Veterinary World*. 2011;4(2):53-59. Disponible en: [www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=4172](http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=4172)
30. **SÁNCHEZ** A, Elsen J, Almeida I, Sánchez G. Fases intermedias y simultáneas de los síndromes crónicos de la intoxicación por consumo de genotipos del *Pteridium* en bovinos. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve> 2008. *Rev. Cient.* Vol 18 (5):531-541.
  31. **SAVEIRA**, M, “Papilomavirus research: from natural history to vaccines and beyond”. Caister Academic Press. Norfolk, Inglaterra. 2006. pp. 11-193, 279-389. Disponible en: <http://books.google.com.ec>.
  32. **VARGAS** M, *Virología Médica*. Primera Edición. Universidad Nacional de Colombia. 2002.p. 1 – 40
  33. **VELA** D. *Reproducción y Bovinotecnia*. Universidad de las Américas. Quito-Ecuador. 2009
  34. **VÉLEZ** M. *Producción de Ganado Lechero en el Trópico*. Zamorano Academic Press. 2da Edición. Honduras. 1999. p.133-138

ANEXOS

ANEXOS

## ANEXO 1.- Estructura de la partícula viral (Vargas M, 2007)

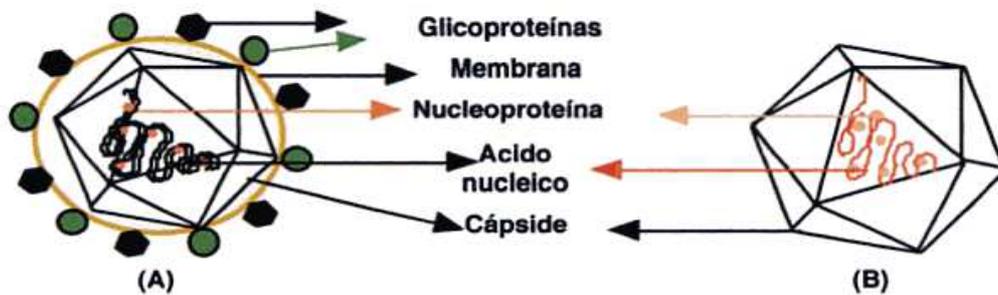
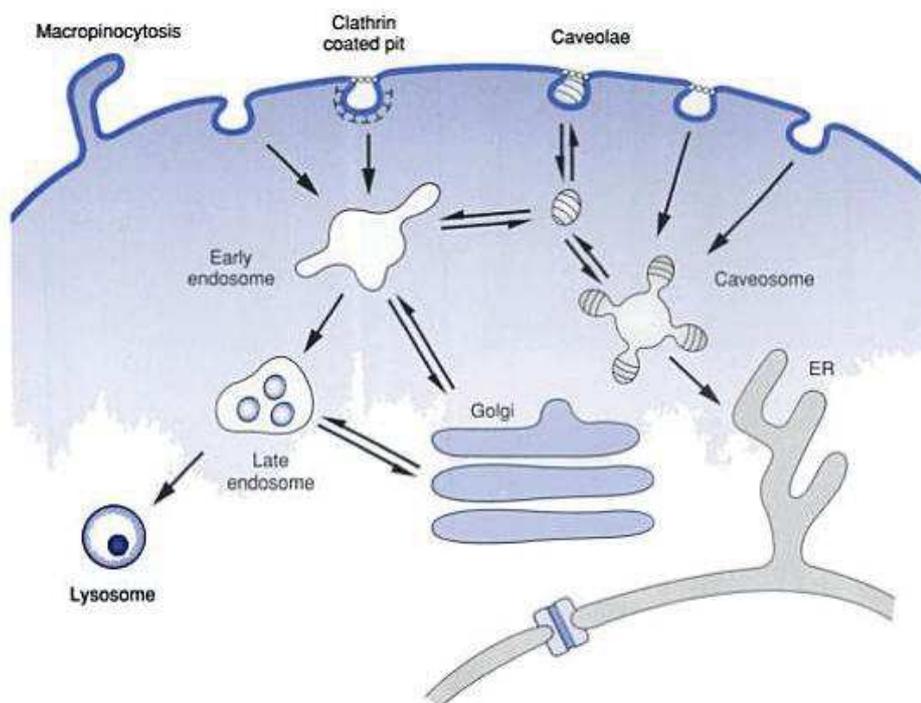
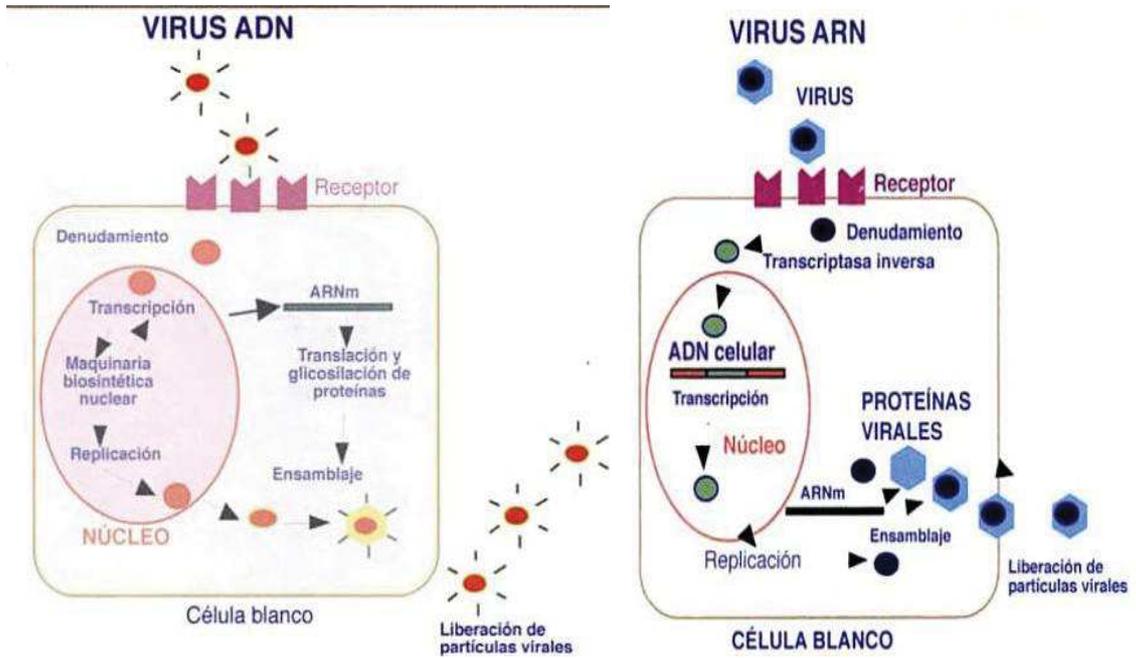


Figura 1.1. Elementos constitutivos de las partículas virales cubiertas (A) y desnudas (B).

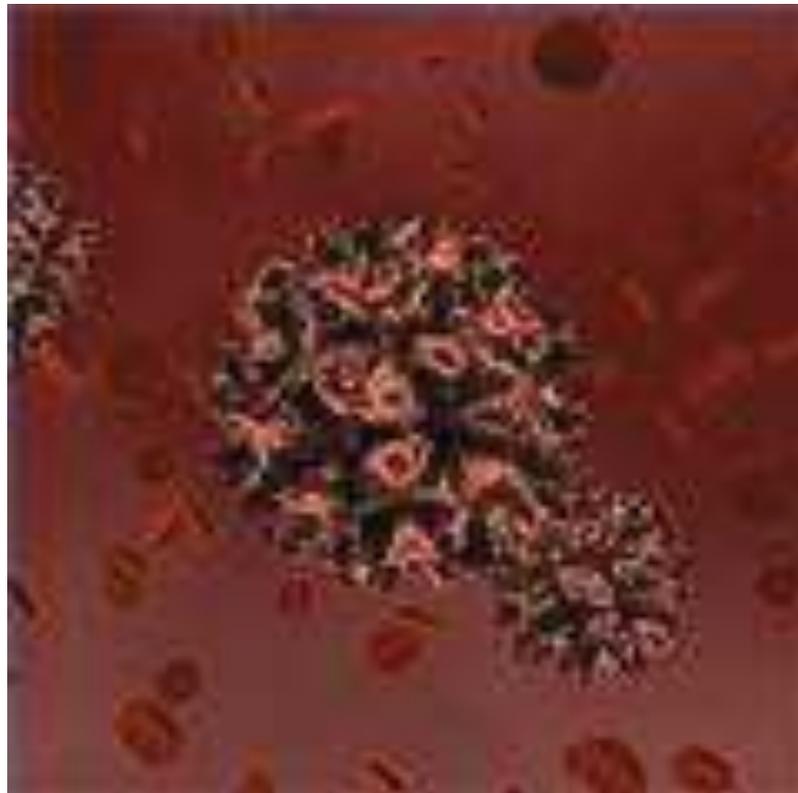
**ANEXO 2.- Entrada de virus a la célula:** vías endocíticas de entrada viral. La vía más comúnmente usada en la clásica mediada por receptores, que incluyen pozos cubiertos de clatrina, endosomas tempranos y tardíos; y lisosomas. La entrada ocurre generalmente en los endosomas, estimulado por el bajo pH. La segunda forma de entrada es a través de caveosomas y RE, que ocurre por formación de vesículas. La penetración del virus en el citoplasma puede ocurrir a nivel de membrana plasmática, endosomas, caveosomas y RE. (Knipe D y P Howley, 2007)



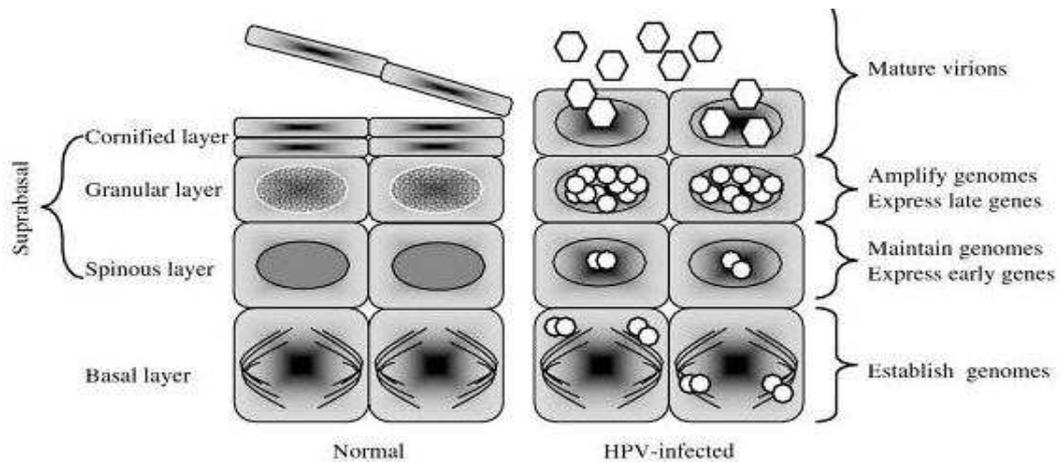
**ANEXO 3.- Ciclo de replicación de virus ADN y ARN (Vargas M, 2002)**



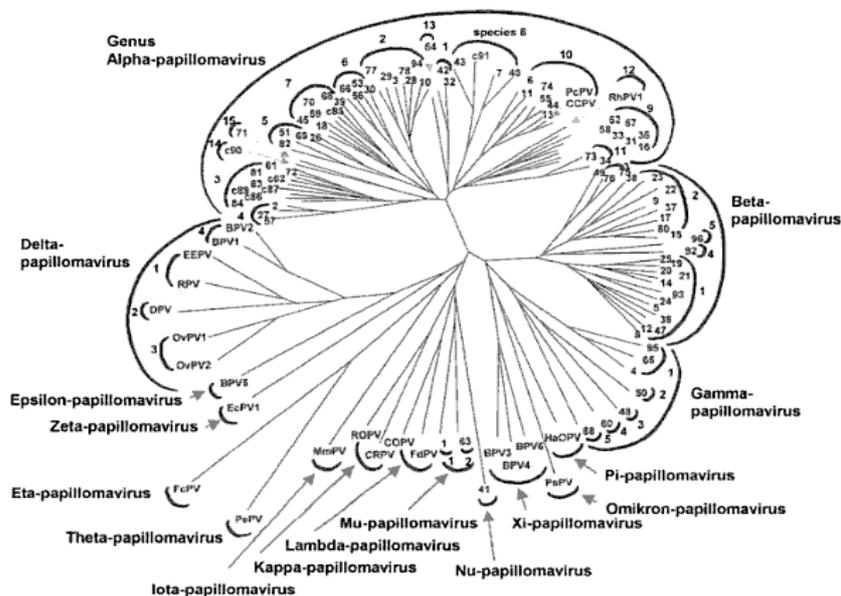
**ANEXO 4.- Partícula viral de PV**



**ANEXO 5.- Ciclo de vida viral en el epitelio.-** Estrecha relación del ciclo de vida del papiloma virus humano (HPV) al programa de diferenciación del tejido epitelial del huésped. En la figura se muestra el epitelio normal (izquierda) y el epitelio infectado con HPV (derecha) con varias capas de diferenciación asociadas a las diferentes etapas del ciclo de vida del virus. (Garcea R, 2007)



**ANEXO 6.- Filogenia de PV.-** Árbol filogenético de 118 tipos de PV. Todos los números se refieren a tipos de HPV, y los números c a candidatos tipos. Todas las abreviaciones incluyendo letras, se refieren a los PV de animales. El símbolo semicircular más externo identifica los géneros de PV, por ejemplo alfa-PV. El semicírculo interno identifica las especies de PV, por ejemplo especie 8 dentro de alfa –PV, tipos HPV 7.40 y 43 y cand.91. (Saveira M, 2006)



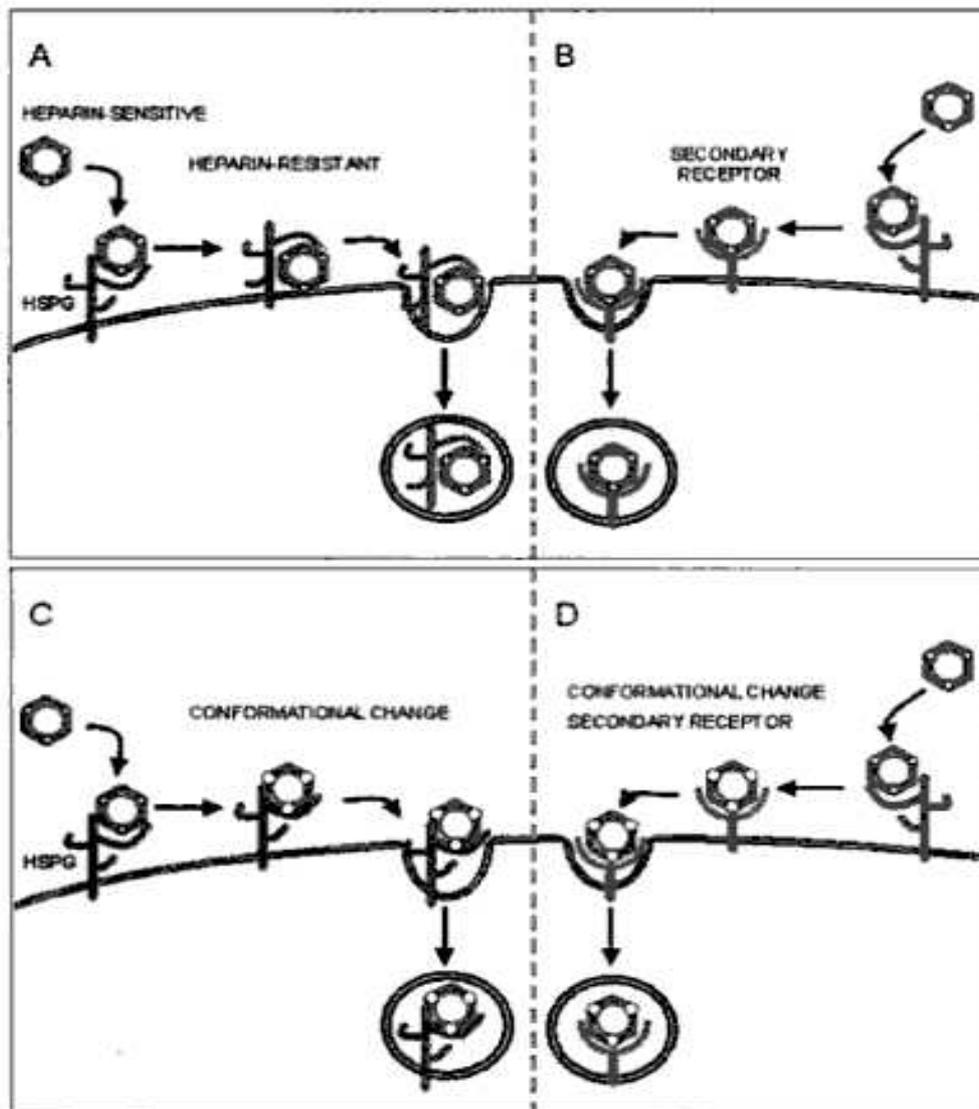
**ANEXO 7.-** Principios de la clasificación de los Papillomavirus: el taxón, su definición, ejemplos y explicaciones. (Garcea R, 2007)

| Taxón                             | Definición  | Ejemplo  | Explicación   |
|-----------------------------------|---|--|---|
| Familia                           | El taxón más alto para clasificar a la mayoría de virus.  | Papiloviridae  | Todos los PV tienen la organización del genoma similar, no se conocen otros virus con homologías significantes a PV.  |
| Género                            | Anteriormente llamado "ramas mayores" y "supergrupos", 40-55% de diferencia de secuencia de nucleótidos con miembros de otro género.      | Alfa-papilomavirus   | El género es definido por análisis de secuencias: los miembros de un género comparten propiedades moleculares, pero no necesariamente propiedades clínicas. |
| Especie                           | Anteriormente llamado "ramas menores" y "grupos", con diferencia de 30-40% en la secuencia de nucleótidos con miembros de otras especies. | HPV, especie 9: incluye HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58, -67 | Miembros de una especie generalmente comparten propiedades moleculares y clínicas.  |
| Tipos                             | Taxón filogenético tradicional: diferencia de 10-25% en la secuencia de nucleótidos con otros tipos.                                      | HPV-16   | Los tipos de PV son el nivel taxonómico se refieren la mayoría de estudios moleculares, etiológicos y epidemiológicos.                                      |
| Subtipo                           | 2-10% de variación en la secuencia de nucleótidos con otros subtipos.   | HPV-44/55<br>HPV-68 A y B                                    | Muy pocos HPV aislados se encuentran dentro de esta definición.   |
| Grupos filogenéticos de Variantes | Ramas con variantes en estudios filogenéticos dentro de un mismo tipo.  | Ramas Af1, Af2, AA, As, E                                    | Las variantes dentro de un HPV específico pueden tener propiedades moleculares y clínicas únicas.   |
| Variante                          | Cualquier PV aislado que tiene hasta un 2% de variación nucleotídica del tipo de PV original  | Aún no está regulado   | Hay interés filogenético, pues han coevolucionado con grupos étnicos, posiblemente sin relevancia clínica de variantes individuales.                        |

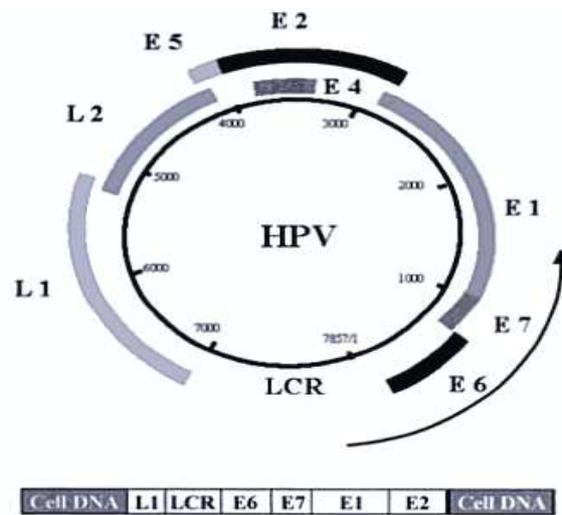
**ANEXO 8.-** Tipos de PV más frecuentemente estudiados, propiedades clínicas y biológicas, y asociaciones filogenéticas a nivel de “género” y “especie”, recientemente reconocido por el Consejo Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). (*Garcea R, 2007*)

| GENERO     | ESPECIE | TIPOS                                  | PROPIEDADES   |
|------------|---------|--|---|
| Alfa-PV    | 4       | HPV: -2, -27, -57                      | Verrugas de piel comunes, frecuentes en verrugas genitales de niños.  |
|            | 5       | HPV: -26, -51, -69, -82                | Lesiones mucosas benignas y de alto potencial maligno.  |
|            | 6       | HPV: -53, -30, -56, -66                | Lesiones mucosas benignas y de alto potencial maligno.  |
|            | 7       | HPV: -18, -39, -45, -59, -68, -70      | Lesiones mucosas malignas de alto riesgo, algunas (-18) más frecuentes en adeno que en carcinomas escamosos del cérvix                          |
|            | 8       | HPV: -7, -40, -43                      | Lesiones mucosas y cutáneas de bajo riesgo, HPV-7 conocido como verruga de carnicero en pacientes con VIH.                                      |
|            | 9       | HPV: -16, -31, -33, -35, -52, -58, -67 | Lesiones mucosas malignas de alto riesgo. Algunas (HPV-16) más frecuentes en carcinoma escamoso que en adenocarcinoma del cérvix.               |
|            | 10      | HPV-6, -11, -13, -44, -74              | Lesiones mucosas benignas; HPV-6 y -11 en verrugas genitales masculinas y femeninas; en papilomas laríngeos, que pueden progresar malignamente. |
| Beta-PV    | 1       | HPV-5, -8                              | Lesiones cutáneas benignas y malignas en EV y en pacientes inmunosuprimidos   |
| Gamma-PV   | 1       | HPV-4, -65                             | Lesiones cutáneas benignas  |
| Delta – PV | 4       | BPV-1                                  | Fibropapilomas en ganado, sarcoides en caballos. Importante modelo de cultivo celular   |
| Kappa-PV   | 1       | CRPV                                   | Lesiones cutáneas, importante modelo animal   |
| Mu-PV      | 1, 2    | HPV-1, -63                             | Lesiones cutáneas, frecuentes en verrugas del pie.  |
| Nu-PV      | 1       | HPV-41                                 | Lesiones cutáneas   |
| Xi-PV      | 1       | BPV-3, BVP-4                           | Papilomas en el TGI, BPV-4 es un importante modelo animal para carcinogénesis de pasos múltiples y para investigación de vacunas                |

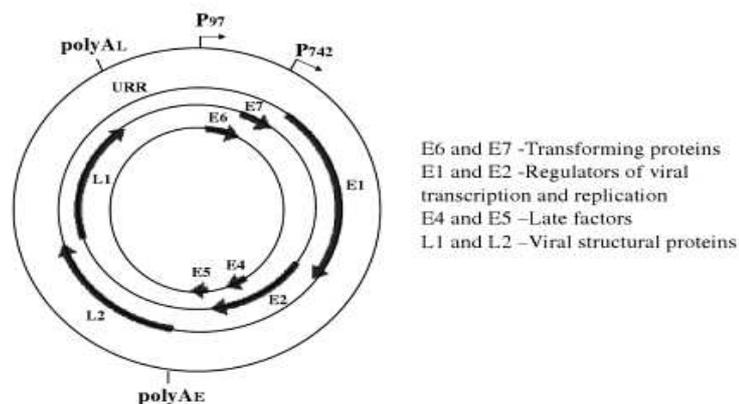
**ANEXO 9.- Ciclo de Vida Viral: ingreso a la célula.-** La figura muestra las interacciones potenciales de las cápsides de PVs con las proteínas de la superficie celular, proceso que ocurre antes del ingreso a la célula huésped. Es posible que los eventos que ocurren luego de la unión a la célula sean críticos para que ocurra la endocitosis. La resistencia a la neutralización de los virus, por la heparina exógena pueda ser explicada por cambios conformacionales en HSPG luego de la unión de la cápside (A), la transferencia a un receptor secundario (B), cambios de conformación en la cápside (C), o una combinación de todos estos eventos (D). Cambios en conformación más sutiles en la cápside (C y D) pueden activar la endocitosis o permitir la interacción con receptores secundarios. L2 participa en este proceso. (Saveira M, 2006)



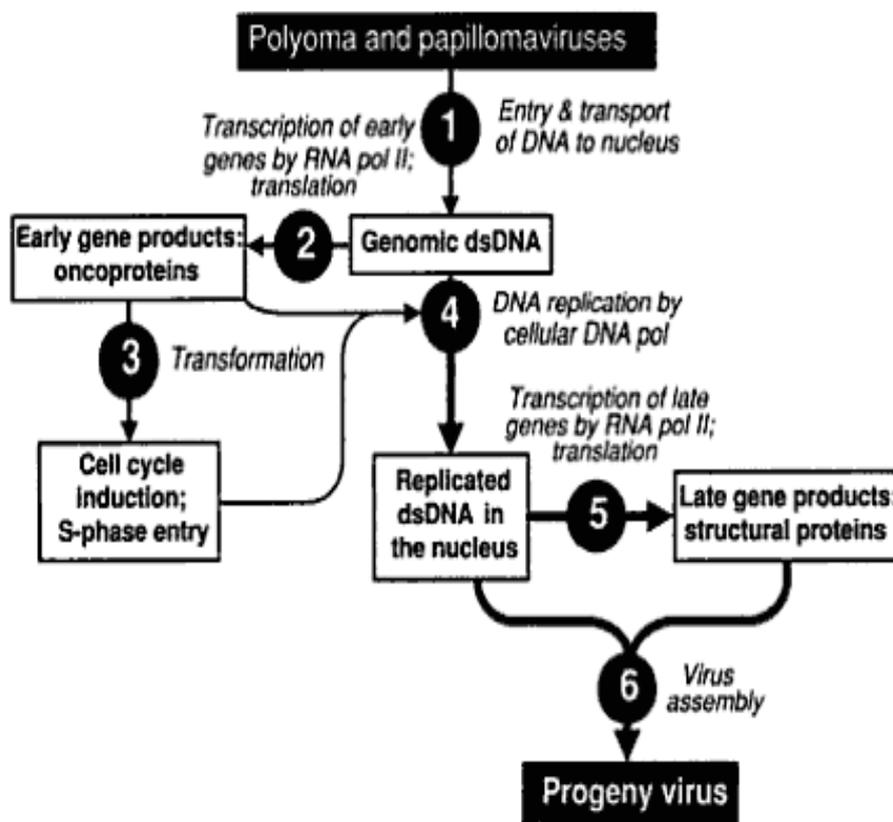
**ANEXO 10.- Organización del genoma de los PV.-** El ADN de doble hélice circular tiene alrededor de 8 kb. Los cuadrados representan los marcos abiertos de lectura (ORFs) tempranos E y tardíos L. Los ORFs de E codifican proteínas necesarias para la replicación y transcripción del ADN viral (E1 y E2), para la maduración del virión (E4) y la transformación celular (E4, E5, E6 y E7). Los ORFs de L codifican las proteínas estructurales mayor y menor (L1 y L2). LCR contiene los elementos necesarios para la replicación y transcripción del genoma viral. La flecha indica la dirección de la transcripción, que es unidireccional. La transcripción mayor empieza en LCR y termina en la terminal 3' de ORFs E u ORFs L. (Saveira M, 2006)



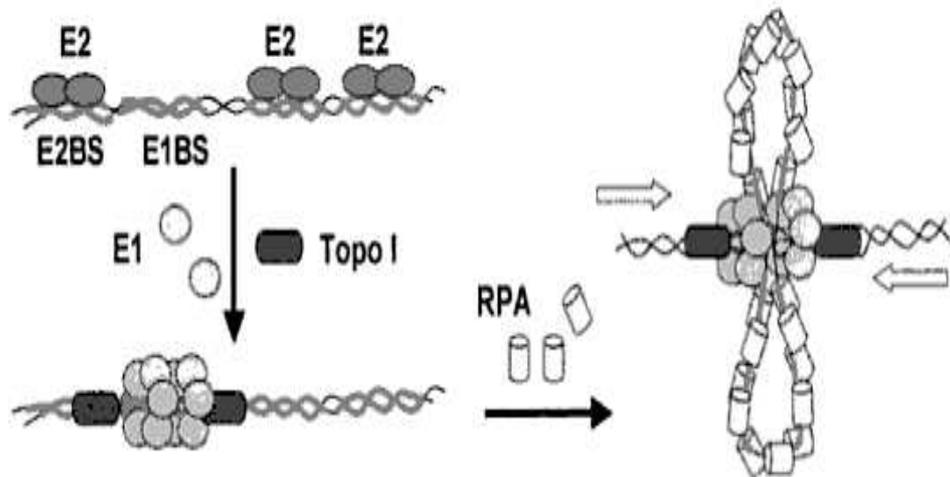
**ANEXO 11.- Organización genómica y producción de genes de HPV- 31.** Los promotores virales tempranos (P97) y tardíos (P742) se muestran con las flechas. URR representa a la región reguladora alta. También se muestran 8 ORF mayores con sus funciones biológicas. (Garcea R, 2007)



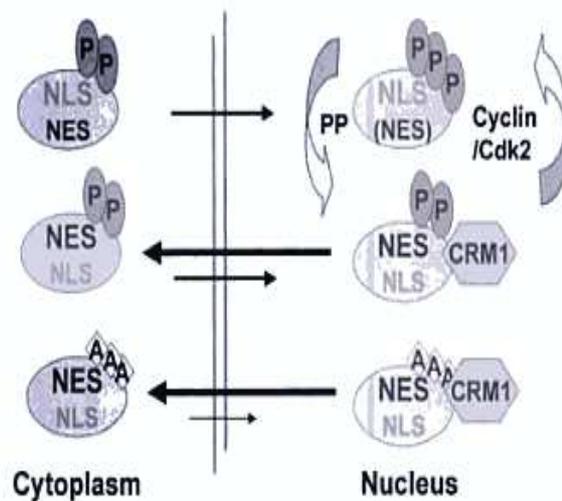
**ANEXO 12.- Esquema de replicación de los polyoma y papillomavirus. (Knipe D y P Howley, 2007):** Los virus tienen un genoma de ADN circular que se replica a nivel de núcleo. La entrada entrega el ADN circular al núcleo (1), donde la ARN polimerasa II transcribe los genes tempranos para producir oncoproteínas. (2). Las oncoproteínas controla al ciclo celular a través de p53 y pRb, o interactúan con inhibidores celulares dependientes de ciclina, estimulando la replicación del ADN celular (3). En células no permisivas que no pueden soportar el ciclo de replicación vegetativo y que por lo tanto sobreviven la infección, estos eventos tempranos pueden llevar a la transformación neoplásica. En células permisivas, el ADN viral es replicado por ADN polimerasas celulares (4), después de lo cual, los genes tardíos que codifican las proteínas estructurales del virus, son transcritos por una ARN polimerasa II. (5). El ensamblaje de las partículas virales ocurre en el núcleo (6). En esta figura, la flecha engrosada representa a las cadenas dobles de manera no cuantitativa.



**ANEXO 13.- Ensamblaje viral y actividad helicasa de E1.-** La proteína E2 se une a E2BS (binding sites) con un dímero en los dos lados de E1BS y recluta a E1, el cual entonces se ensambla dentro de un complejo dihexamérico en E1BS. Los dos hexámeros permanecen juntos y funcionan en coordinación como helicasa bidireccional. En la presencia de topoisomerasa I, RPA, y grandes cantidades de ATP, el ADN en los dos sitios es bombeado interiormente por las helicasa mediante rotación axial (flechas blancas), mientras se separa en hélices simples. La topoisomerasa I libera la cepa superficial introducida por la separación de las hélices de ADN, mientras que la hélice sola es estabilizada por RPA (Saveira M, 2006)



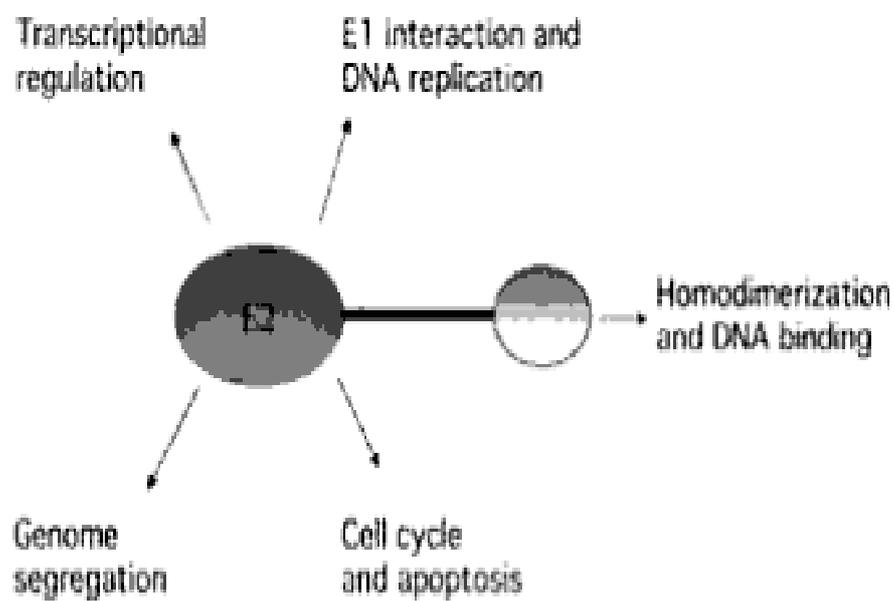
**ANEXO 14.-** La localización nucleocitoplasmática de E1 de HPV es controlada por la actividad de secuencia nuclear de exportación (NES) y las secuencias de localización nuclear (NLS). Las dos son reguladas por cinasas. Fila superior: la importación nuclear mediada por NLS es promovida (flecha) por la fosforilación de los dos primeros de tres residuos de serina (cada uno seguido de un residuo de prolina) en la región reguladora de localización (LRR), cerca del termina amino. Cuando la célula entra a la fase S, la ciclina E/cdk2 y ciclina A/cdk2 fosforilan el 3er residuo de serina, localizado dentro de NES, inactivándolo (paréntesis). E1 es entonces retenida en el núcleo para replicar el ADN viral. *Fila del medio* una vez que la célula sale de la fase S, cdk2 se inactiva y se activa la defosforilación de E1 por fosfatos en NES, provocando la reimportación nuclear eficiente de E1 hacia el citoplasma (flechas largas) a través de la activación de la exportina CRM1. *Última fila:* las mutaciones en los 3 sitios de fosforilación en LRR reducen la importación nuclear (flechas pequeñas) y prohíben la inactivación de NES por las cinasas cdk2. Así, se bloquea la retención nuclear de E1 y la exportación nuclear de E1 terminan con la finalización de la replicación del ADN viral. (Saveira M, 2006)



## ANEXO 15.- Funciones de las proteínas de los PV (IARC, 2007)

| P  | FUNCIÓN   |
|----|---|
| E1 | ATPasa y ADN helicasa; reconoce y se une al origen viral de la replicación viral como un complejo hexamérico; es necesaria para la replicación viral del ADN  |
| E2 | Es el principal regulador de la transcripción de genes virales; se une en forma de dímero a los promotores virales de transcripción; participa en la replicación del ADN e interactúa y recluta a E1 hacia el origen.   |
| E4 | Actúa en la fase tardía del ciclo de vida del virus, interactúa con el citoesqueleto de queratina y los filamentos intermedios. Se localiza con el dominio nuclear 10; induce el paro en G2, y se cree que facilita el ensamblaje y la liberación viral.  |
| E5 | Induce la proliferación celular no programada, interactúa con la subunidad 16k de la ATPasa vacuolar. Puede activar a receptores de factores de crecimiento y otras proteíncinasas. Inhibe la apoptosis, el tráfico del MCH-I hacia la superficie celular.  |
| E6 | Induce la síntesis de ADN, telomerasa y evita la diferenciación celular. Interactúa con 4 clases de proteínas celulares: co-activadores transcripcionales, proteínas de la motilidad y polaridad celular, supresores tumorales e inductores de apoptosis, principalmente p53; y con factores de replicación y reparación del ADN. |
| E7 | Induce proliferación celular no programada, interactúa con la acetil aminotransferasas, y con reguladores negativos del ciclo celular y supresores tumorales, sobre todo pRb.   |
| L1 | La mayor proteína estructural del virus, que ensambla capsómeros y cápsides. Interactúa con L2, con receptores celulares y codifica epítomos de neutralización.   |
| L2 | Proteína estructural menor, interactúa con el ADN, con el dominio nuclear 10s, se cree que facilita el ensamblaje de viriones y que interactúa con receptores celulares. Codifica epítomos de neutralización lineales.  |

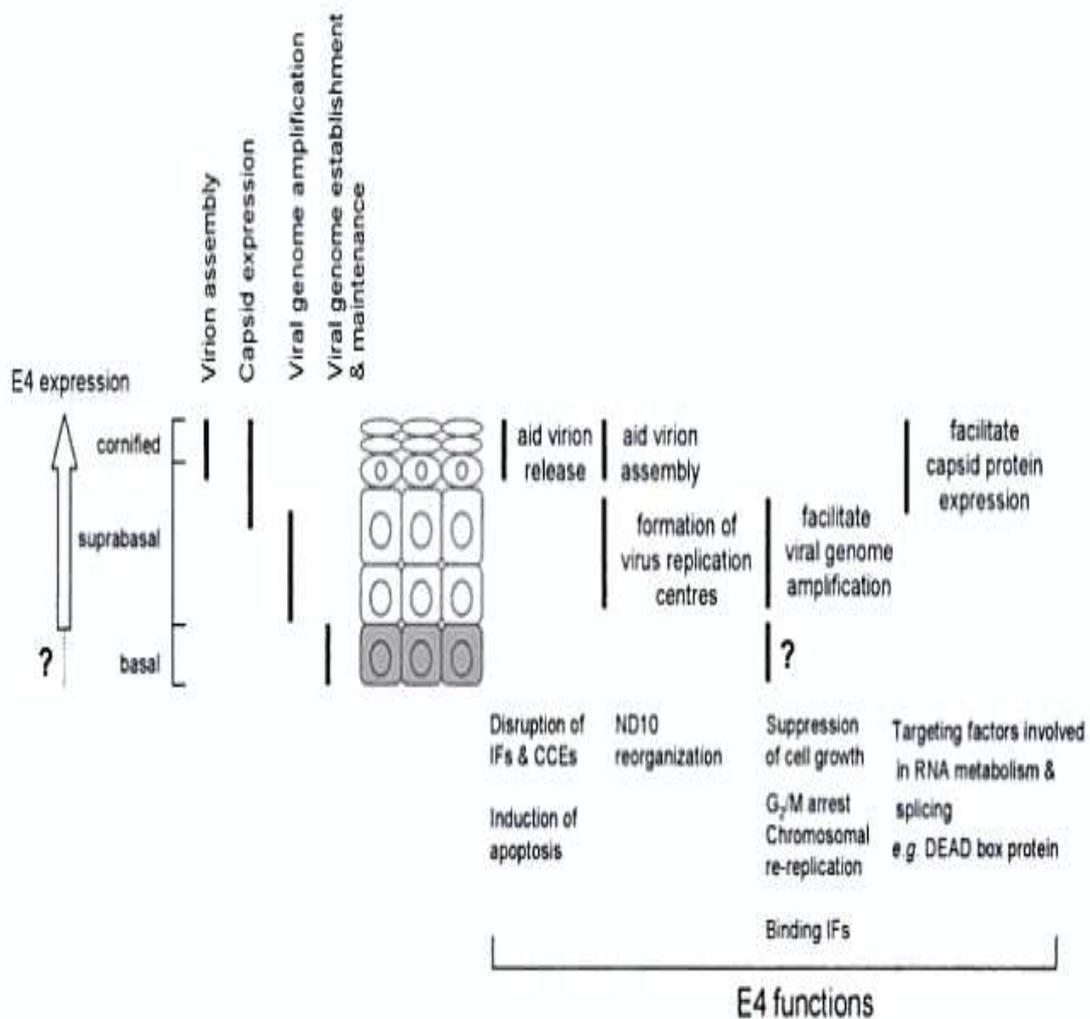
**ANEXO 16.- Funciones de E2.-** El dominio del terminal amino de E2 participa en la regulación de muchas funciones biológicas de E2. Este dominio se liga con el terminal carboxilo a la homodimerización y con el dominio de unión al ADN (círculo gris), mediante una región bisagra (línea negra). (Saveria M, 2006)



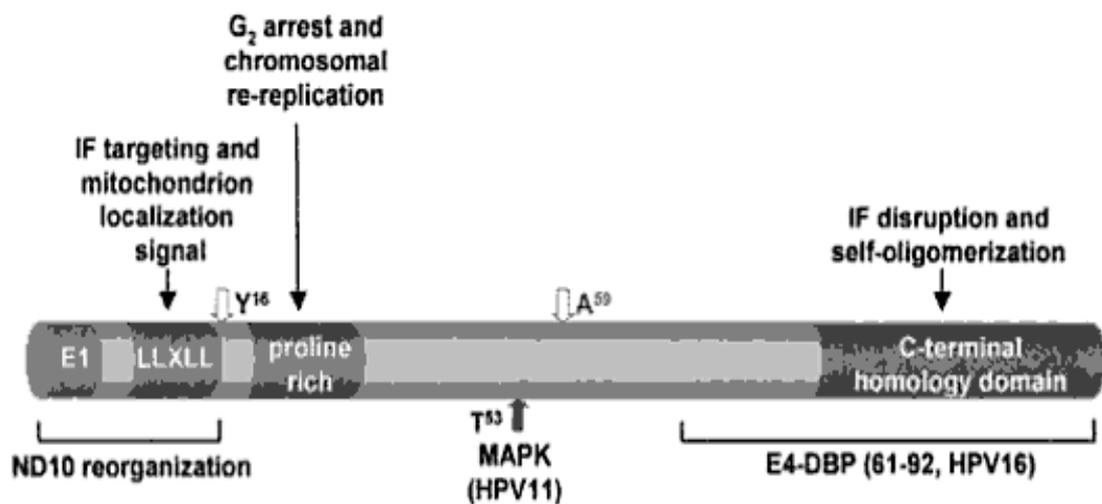
**ANEXO 17.- Coactivadores transcripcionales de E2.-** Aquí se presentan las proteínas con las que interactúa E2 y sus diversas funciones. (Saveria M, 2006)

| Proteína con la que interactúa (IP) | Función de IP   | Función de la interacción con E2   |
|-------------------------------------|---|--|
| E1                                  | Factor de replicación de PV   | Inicio de la replicación de PV   |
| L2                                  | Proteína de la cápside de PV  | Encapsidación del genoma viral   |
| TBP                                 | Inicio de la transcripción  | Inhibición de la transcripción de PV   |
| TFIIB                               | Factor basal de transcripción   | Activación transcripcional de E2   |
| P300 y CBP                          | Coactivador transcripcional y deacetilasa histónica                                     | Activación transcripcional de E2   |
| pCAF                                | Coactivador transcripcional y deacetilasa histónica                                     | Activación transcripcional de E2   |
| AMF1                                | Coactivador transcripcional que interactúa con p300                                     | Activación transcripcional de E2   |
| Top BP1                             | Respuesta a daño del ADN e inicio de la replicación de ADN. Coactivador transcripcional | Inicio de la replicación de ADN, protección del genoma viral, Activación transcripcional de E2 |
| BRCA1                               | Respuesta a daño de ADN y coactivación transcripcional                                  | Protección del genoma viral. Activación transcripcional de E2                                  |
| PARP                                | Respuesta a daño de ADN, movimiento de proteínas  | Protección del genoma viral. Movimiento de E2  |
| P53                                 | Respuesta de daño de ADN. Control del crecimiento celular y apoptosis                   | Regulación de la apoptosis mediada por E2  |
| SMN                                 | Gen determinante de la atrofia espinal muscular. Función desconocida                    | Activación transcripcional de E2   |
| Brd4                                | Proteína de unión a Cromatina   | Segregación del genoma de PV   |
| Tubulina alfa, beta y gamma         | Proteínas arquitectónicas   | Segregación del genoma de PV   |

**ANEXO 18.- Expresión de E4 en el ciclo de vida del virus.-** E4 cumple varios roles en el ciclo de vida del virus. El tiempo en el que ocurren los eventos virales en relación con la expresión de E4 y la diferenciación epitelial se muestran en el lado izquierdo de la figura. La proteína E4 es detectada en los queratinocitos suprabasales al inicio de la amplificación del genoma viral. Bajos niveles de E4 pueden ser expresados a partir de los transcritores que contienen E1-E4 producidos en las etapas tempranas del ciclo infeccioso. Las actividades biológicas de E4 y su papel en el ciclo de vida del virus se muestran en la parte derecha de la figura. (Saveira M, 2006)



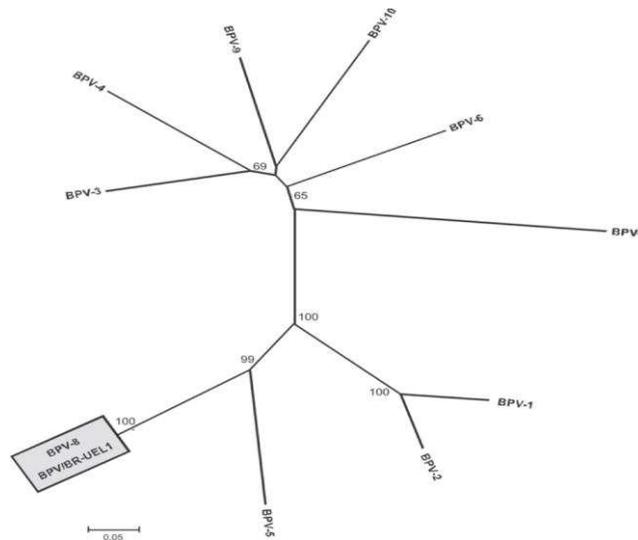
**ANEXO 19.-** Diagrama esquemático de E4: incluye las regiones que participan en las funciones biológicas conocidas y la interacción con los objetivos celulares. Las flechas blancas indican la posición de los sitios de segmentación proteolítica. Las flechas negras indican la treonina fosforilada por MAPK (Saveira M, 2006)



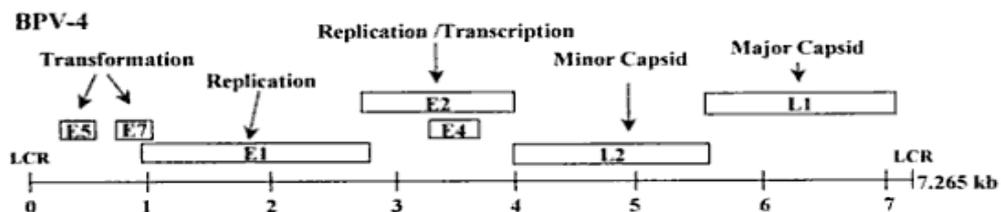
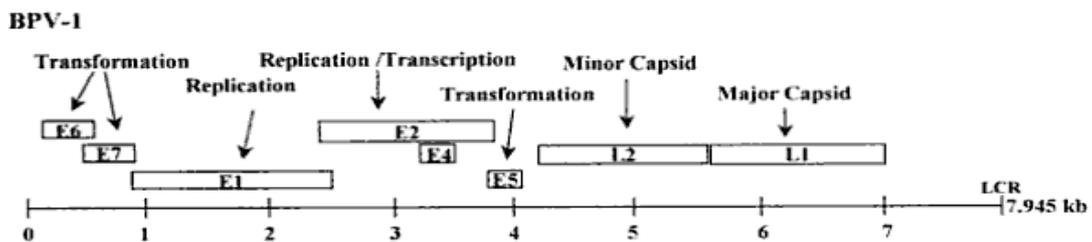
**ANEXO 20.- Proteínas de la cápside.-** Funciones de las proteínas de la cápside viral durante el establecimiento de la infección. (Saveira M, 2006)

|   |
|---|
| <p><b>L1</b></p> <p>EXTRACELLULAR PROTECTION OF GENOME<br/>ATTACHMENT TO CELL SURFACE HSPG</p>  |
| <p><b>L2</b></p> <p>SECONDARY RECEPTOR<br/>ACTIN INTERACTION<br/>ENDOSOME ESCAPE<br/>TUBULIN INTERACTION<br/>CHAPERONING GENOME TO ND10</p> |

**ANEXO 21.-** Árbol filogenético reconstruido con secuencias FAP de BVP-BR/UEL1 aislado y descrito dentro de los tipos de BPV. Los números son los ángulos internos representan los valores de apoyo de determinados en 1000 repeticiones. (Claus M y *et al*, 2009)



**ANEXO 22.- Organización genética de los BVPs:** diagrama de la organización genómica de BPV-1 y BPV-4. Los genomas virales son representados en forma lineal, con los marcos de lectura (ORF) como rectángulos. Se indica la función de la proteína codificada en los individuales (Saveira M, 2006)



## ANEXO 23 .- Enfermedades causadas por Papilomavirus (Murphy F, 1999)

| VIRUS              | ESPECIE AFECTADA | ENFERMEDAD  |
|--------------------|------------------|---|
| BPV-1, BPV-2       | Bovinos          | Fibropapiloma cutáneo                             |
|                    | Equinos          | Sarcoide  |
| BPV-3              | Bovinos          | Papiloma cutáneo                                  |
| BPV-4              | Bovinos          | Papiloma del TGI, puede ser maligno               |
| BPV-5              | Bovinos          | Fibropapiloma en pezones "grano de arroz"         |
| BPV-6              | Bovinos          | Papiloma en pezones "papiloma frondoso"           |
| PV ovino           | Ovinos           | Fibropapiloma cutáneo                             |
| EPV -1 y -2        | Equinos          | Papiloma cutáneo                                  |
| PV porcino genital | Porcinos         | Papiloma cutáneo                                  |
| COPV               | Caninos          | Papilomas de mucosa oral                          |
| PV de venados      | Venados          | Fibropapiloma, papiloma, fibroma                  |
| CRPV y RPV         | Conejos          | Papiloma cutáneo, puede ser maligno               |
| HPV                | Humanos          | Papilomas cutáneos y mucosos, pueden ser malignos |
| PV                 | finch            | Papilomas   |
| APV                | Loros            | Papiloma  |

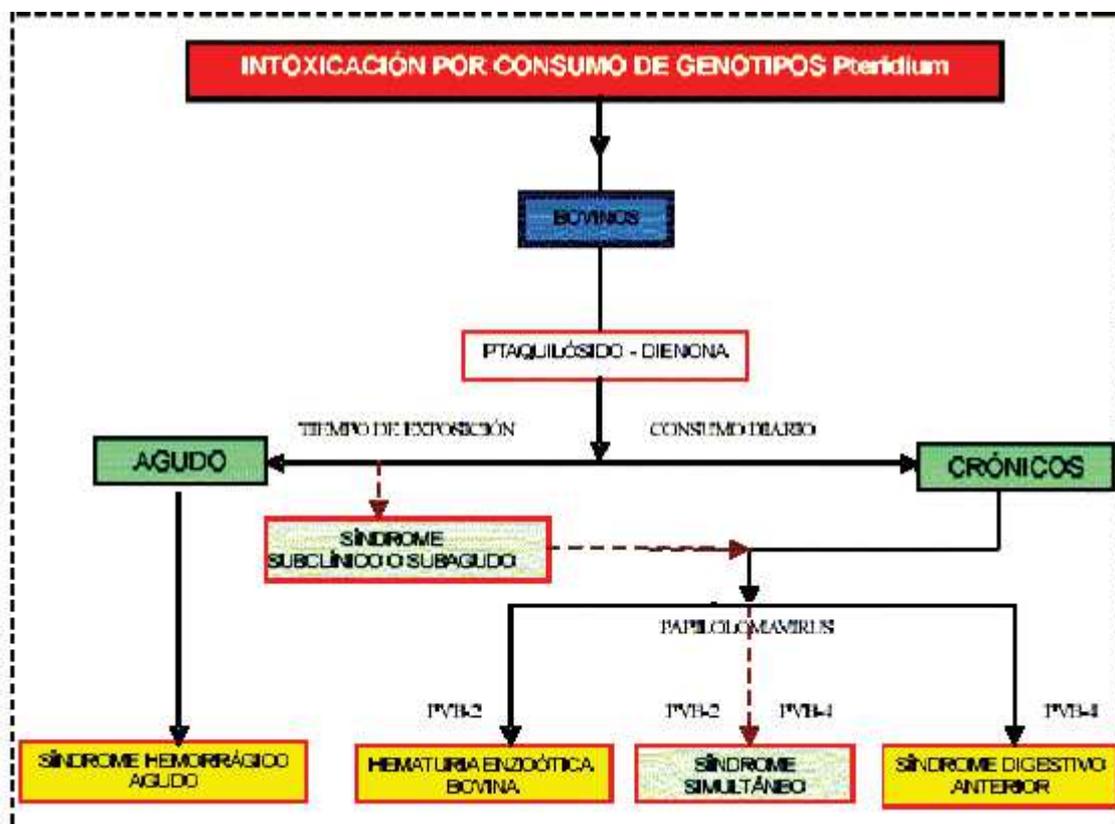
**ANEXO 24.-** Grupos de BPV dependiendo de su genoma Zeta-papilomavirus: BVP3, BVP4, BVP6, BVP9, BVP10; Delta-papilomavirus: BVP1, BVP2; Epsilon-papilomavirus: BVP5, BVP8. BVP-7: No ha podido ser ubicado en ninguno de los anteriores grupos, y se considera que podría pertenecer a un nuevo grupo. (Borzacchiello G y *et al*, 2008)

| Serotipo | Región-afecta   | Histopatología                     |
|----------|---|------------------------------------|
| BVP1     | Pezón, pene. ubre, cabeza, espalda, cuello  | Fibropapiloma                      |
| BVP2     | Ano-genital cáncer de vejiga  | Fibropapiloma                      |
| BVP3     | Espalda, cuello, cabeza   | Epiteliopapiloma                   |
| BVP4     | Esófago, en el surco esofágico, rumen, retículo y en el intestino delgado, tiene especificidad de localización en la parte alta del aparato digestivo provocando papilomas orales en el adulto; puede volverse maligno en animales alimentados con helecho. | Epiteliopapiloma                   |
| BVP5     | Ubre, pezón   | Mixto, forma de grano de arroz.    |
| BVP6     | Ubre, pezón   | Epiteliopapiloma en forma de hoja. |
| BVP8     | Ubre, pezón   | Mixto, forma de grano de arroz.    |
| BVP9     | Ubre, pezón   | Fibropapiloma                      |
| BVP10    | Ubre, pezón   | Fibropapiloma                      |

**ANEXO 25.-** Lesiones papilomatosas en diferentes regiones corporales de los bovinos.



**ANEXO 26.-** Epizootiología de la intoxicación por ingestión de *Pteridium* en bovinos. (Sánchez A y *et al*, 2008)



**ANEXO 27.- Encuesta realizada para conocer propiedades afectadas por PV**

**ENCUESTAS SOBRE PAPILOMATOSIS BOVINA**

Nombre de la hacienda: \_\_\_\_\_

Lugar (ubicación): \_\_\_\_\_

Nombre del propietario: \_\_\_\_\_

Número de animales (aproximado) \_\_\_\_\_

Raza Holstein \_\_\_\_\_ Jersey \_\_\_\_\_ Brown Swiss \_\_\_\_\_ Montpellier \_\_\_\_\_  
Brahman \_\_\_\_\_ Nelore \_\_\_\_\_ Mixtas (F1) \_\_\_\_\_  
Otras \_\_\_\_\_

**Tipo de producción**

Lechera \_\_\_\_\_ Cárnica \_\_\_\_\_ Doble propósito \_\_\_\_\_

**Tipo de Manejo**

Pastoreo \_\_\_\_\_ Estabulado \_\_\_\_\_ Semiestabulado \_\_\_\_\_

**1.- En su propiedad o alguna cercana, conocida se han presentado casos de papilomatosis bovina (verrugas)**

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ NO SABE \_\_\_\_\_ (Pase a pregunta 4)

**2.-Tiene actualmente animales que presentan la enfermedad**

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ NO SABE \_\_\_\_\_

**3.- Cada cuánto tiempo se presenta la enfermedad** \_\_\_\_\_

**5.- Cuántos animales infectados (aproximadamente) hay en su propiedad** \_\_\_\_\_

**4.- En caso de que se haya presentado la enfermedad, a qué grupo de animales ha afectado más**

Terneros (Hasta 6 meses) \_\_\_\_\_ Vacas de 1er servicio \_\_\_\_\_ Vacas 1er parto \_\_\_\_\_  
Vacas secas \_\_\_\_\_ Rejo \_\_\_\_\_ Animales con alguna otra patología \_\_\_\_\_ Toro \_\_\_\_\_

**4.- Utiliza algún tipo de tratamiento o control para la papilomatosis**

Autovacuna \_\_\_\_\_ Hemoterapia \_\_\_\_\_ Autorecuperación \_\_\_\_\_  
Antibióticos \_\_\_\_\_ Otras \_\_\_\_\_

**5.- Estaría interesado y dispuesto a que se pueda muestrear sus animales para realizar el estudio sobre la papilomatosis bovina**

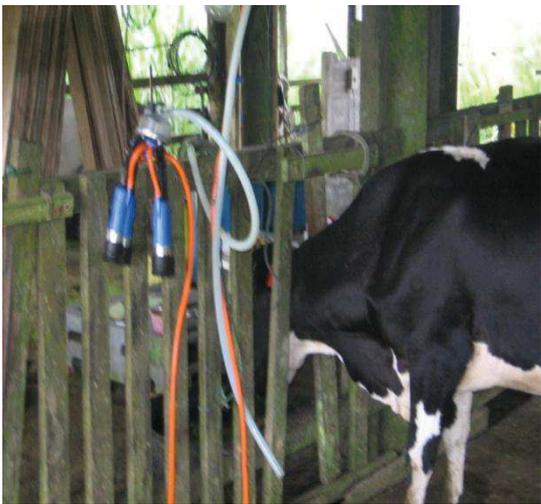
SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Contacto: \_\_\_\_\_

**ANEXO 28.-** Visita a las distintas propiedades en estudio, ubicadas en el cantón Pedro Vicente Maldonado.

Hacienda “El Porvenir”





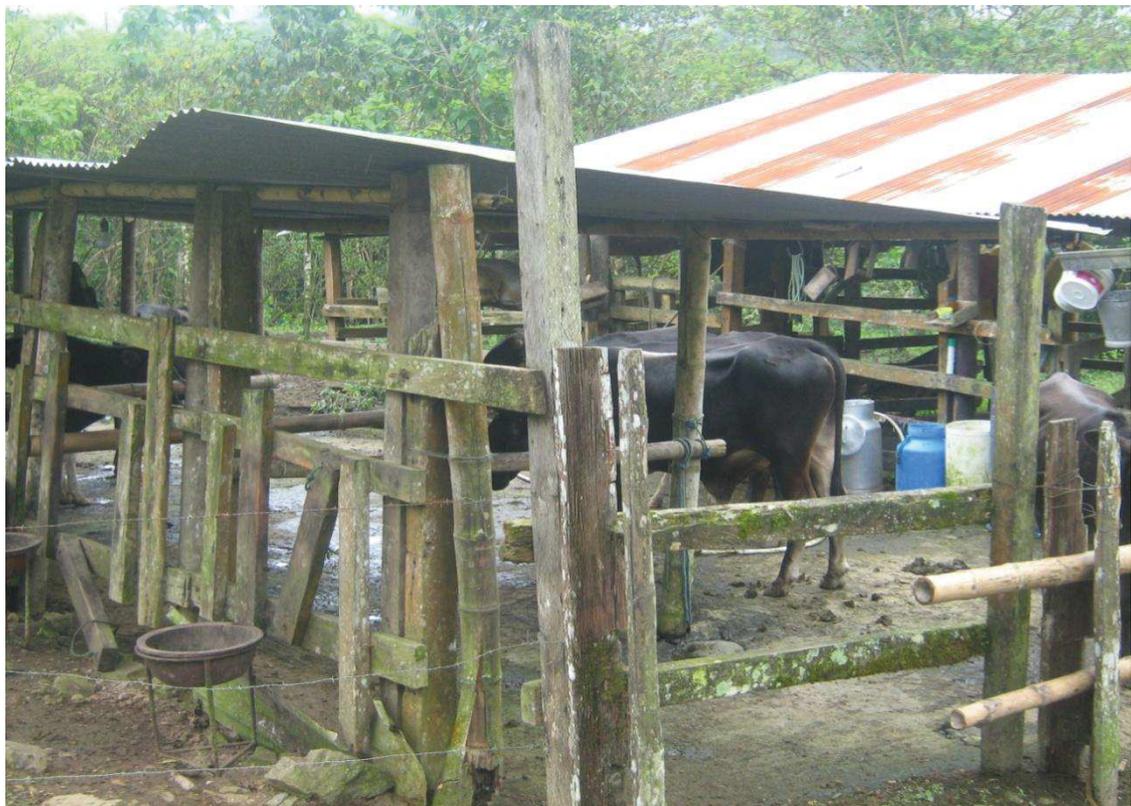
Hacienda "Cochamora"



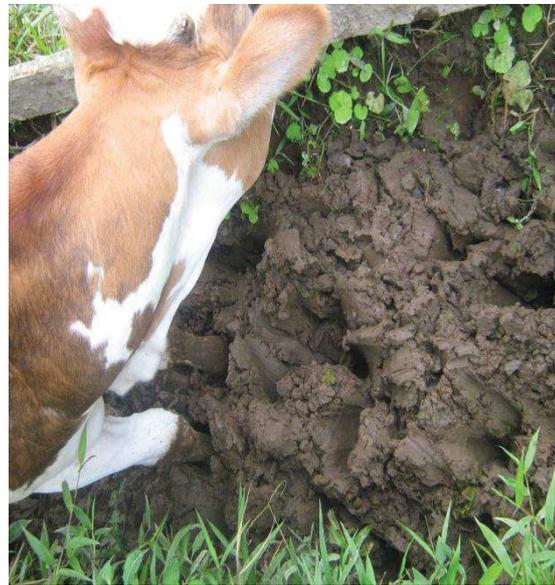




Hacienda "Bernabé"



Hacienda Solánica



**ANEXO 29 : Fichas y Tablas de manejo nutricional y sanitario. (Charry J, Hinojosa M., 2011)**

| Hacienda.                 |          |                 |          |                |        |  |  |
|---------------------------|----------|-----------------|----------|----------------|--------|--|--|
| Propietario               |          |                 |          |                |        |  |  |
| Ubicación                 |          |                 |          |                |        |  |  |
| N° de animales total      |          |                 |          |                |        |  |  |
| <u>NUTRICIÓN</u>          |          |                 |          |                |        |  |  |
| Alimento                  | Edad     | Tiempo          | Ración   | Cantidad       | Tipo   |  |  |
| Calostro                  |          |                 |          |                |        |  |  |
| Leche/ sustituto de leche |          |                 |          |                |        |  |  |
| Pastos                    |          |                 |          |                |        |  |  |
| Salas minerales           |          |                 |          |                |        |  |  |
| Ca                        |          |                 |          |                |        |  |  |
| Agua                      |          |                 |          |                |        |  |  |
| <u>VACUNAS</u>            |          |                 |          |                |        |  |  |
| Columna1                  | Columna2 | 1era vacunación | Refuerzo | Tipo de vacuna | Manejo |  |  |
| Triple                    |          |                 |          |                |        |  |  |
| Brucella                  |          |                 |          |                |        |  |  |
| Altosa                    |          |                 |          |                |        |  |  |
| Leptospira                |          |                 |          |                |        |  |  |
| BR-DVB                    |          |                 |          |                |        |  |  |
| TB                        |          |                 |          |                |        |  |  |





**ANEXO 31: Cálculo del Balance Energético Promedio (Charry J, Hinjosa M)**

**DATOS Y CONSTANTES UTILIZADOS PARA LOS CÁLCULOS**

|                                       |  |              |  |     |         |
|---------------------------------------|--|--------------|--|-----|---------|
| <b>PESO METABOLICO (PM)</b>           | Peso vivo elevado a 0.75 y multiplicado por 0,133 Mcal/kgf PV <sup>0,75</sup> *0,133 |              |  |     |         |
| <b>POR ACTIVIDAD</b>                  | 10% por pastoreo   |              |  |     |         |
| <b>POR ORDEÑO</b>                     | 10 % por lactancia y ordeño  |              |  |     |         |
| <b>CAMBIOS DE PESO Antes De:</b>      | 6  | Post Destete | 9  |     |         |
| <b>PRODUCCIÓN ILACTANCIA Mcal/lt=</b> | HOLST  | 1,2          | JERS   | 1,5 | Mcal/lt |
| <b>POR PR</b>                         | 270 Mcal   | 1,96 Mcal/lt | (Se agrega desde el 6to mes,pero ya no en el seco) |     |         |

CC Aumentar energía de acuerdo a la tabla

|     |    |
|-----|----|
| CC  | 10 |
| 2,3 | 6  |
| 2,5 | 4  |
| 2,8 | 3  |
| 3   | 0  |

**CÁLCULO DE REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS DIARIOS DE LOS ANIMALES MUESTREADOS**

| Nº                   | PV | CC | Prod. l/d | Meta Activ. 10% | Lact. 10% | bd. Lec. 1,2 | Preñez: 1,96 | ambic. CC | TOTAL Mcal | Consumo Mcal de pastura Kg MS/d | Balance Mcal/kg | DEFICIT     |
|----------------------|----|----|-----------|-----------------|-----------|--------------|--------------|-----------|------------|---------------------------------|-----------------|-------------|
|                      | 0  | 0  | 0         | 0,00            | 0,00      | 0,00         | 0,00         | 0,00      | 0,00       | 0                               | 0,00            | 0,00        |
|                      | 0  | 0  | 0         | 0,00            | 0,00      | 0,00         | 0,00         | 0,00      | 0,00       | 0                               | 0,00            | 0,00        |
|                      | 0  | 0  | 0         | 0,00            | 0,00      | 0,00         | 0,00         | 0,00      | 0,00       | 0                               | 0,00            | 0,00        |
|                      |    |    |           | 0,00            | 0,00      | 0,00         | 0,00         | 0,00      | 0,00       | 0                               | 0,00            | 0,00        |
| <b>NECESITA 0,00</b> |    |    |           |                 |           |              |              |           |            | <b>CONSUME</b>                  | <b>0</b>        | <b>0,00</b> |

## CÁLCULO DE ENERGÍA DE LA PASTURA

| PASTO | %  | EM | E Mcal/kg pastura |
|-------|----|----|-------------------|
|       | 0% | 0  | 0                 |
|       | 0% | 0  | 0                 |
|       |    |    | 0                 |

|            |            |   |
|------------|------------|---|
| Balanceado | EM Mcal/kg | 0 |
|------------|------------|---|

**TOTAL EM CONSUMIDA** 0 Mcal/kg

%

Porcentaje en la mezcla

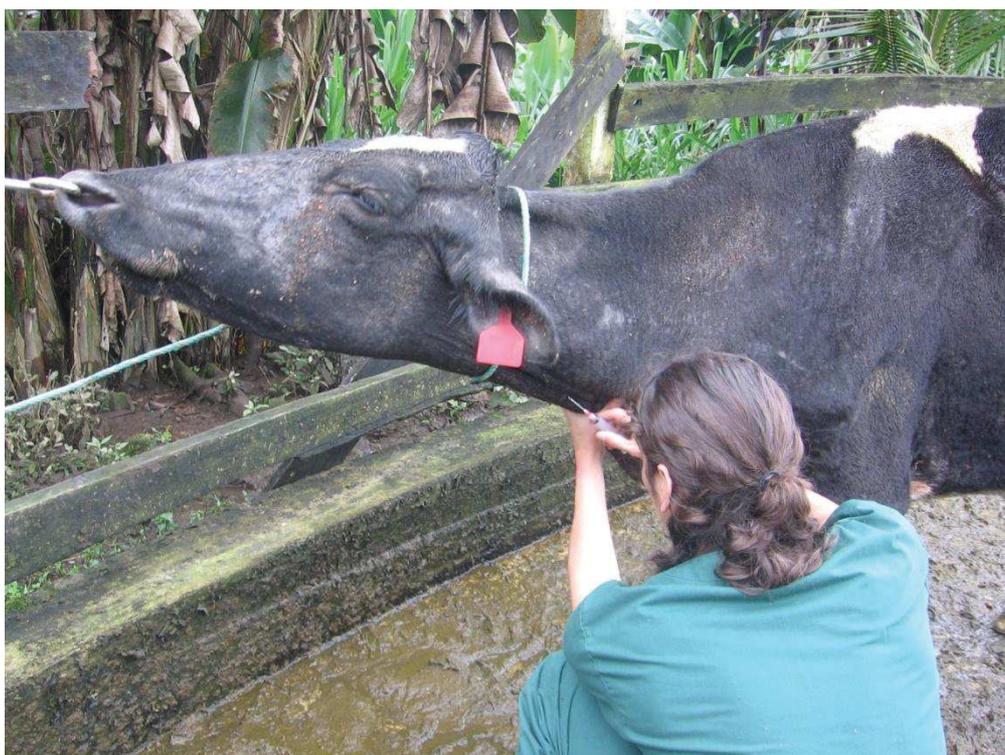
EM

Energía Metabolizable (Mcal) en 1 kg de Materia Seca del pasto

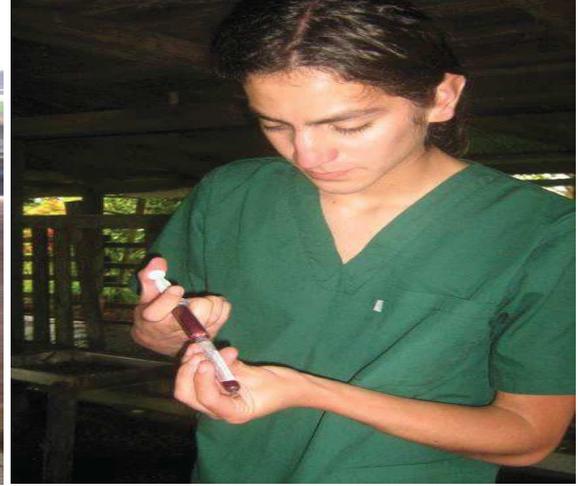
Consumo promedio de balanceado

0 kg/d

## ANEXO 32.- Toma de muestras sanguíneas







| A  | B  | C       | D | E |
|--|--|---------|---|---|
| <b>ANEXO 33: Fichas de identificación individuales de los animales</b>             |  |         |   |   |
| Hacienda.  |  |         |   |   |
| Propietario  |  |         |   |   |
| Ubicación  |  |         |   |   |
| <b>ANIMAL</b>  |  |         |   |   |
| Nombre   |  |         |   |   |
| Número   |  |         |   |   |
| Sexo   |  |         |   |   |
| edad   |  |         |   |   |
| Fecha de nacimiento  |  |         |   |   |
| <b>Ubicación de los papilomas</b>  |  |         |   |   |
|  |  |         |   |   |
| <b>Descripción del papiloma</b>  |  |         |   |   |
| M1   |  |         |   |   |
| M2   |  |         |   |   |
| M3   |  |         |   |   |
| <b>Observaciones</b>   |  |         |   |   |
|  |  |         |   |   |
| <b>Signos clínicos</b>   |  |         |   |   |
| FC   | N  | Mucosas | N |   |
| FR   | N  | T:      |   |   |
| TLCC   |  | 2       |   |   |

**ANEXO 34.- Toma de muestras de papilomas para análisis histopatológico**





**AMEXO 35: HEMOGRAMA Y PROTEINAS (Charr J. Hijaosa M: 2011)**

Columna1  FECHA  Columna2  Columna3  Columna4  Columna5

|           |                 |               |               |  |
|-----------|-----------------|---------------|---------------|--|
| Muestra 1 | Toma de muestra | Procesamiento | Observaciones |  |
| Muestra 2 |                 |               |               |  |
| Muestra 3 |                 |               |               |  |

**RESULTADOS**

|                   | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Referenciales        |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| GRT               |           |           |           | 5.0 - 8.0 x 10E6 /uL |
| GBT               |           |           |           | 5000 - 10000 /uL     |
| Ht                |           |           |           | 30 - 40%             |
| Hemoglobina       |           |           |           | 90 - 140 g / L       |
| Plaquetas Totales |           |           |           | 100000-300000/uL     |

**CÉLULAS**

|             | M1 % | M2 % | Muestra 3 | Referenciales | CELULAS     | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Ref. min  |
|-------------|------|------|-----------|---------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Linfocitos  |      |      |           | 45-65%        | Linfocitos  |           |           |           | 2000-6500 |
| Monocitos   |      |      |           | 0-6%          | Monocitos   |           |           |           | 0-800     |
| n segm      |      |      |           | 20-50%        | n segm      |           |           |           | 1000-4000 |
| banda       |      |      |           | 0-2%          | banda       |           |           |           | 0-120     |
| juveniles   |      |      |           | 0             | juveniles   |           |           |           | 0         |
| Mielocitos  |      |      |           | 0             | Mielocitos  |           |           |           | 0         |
| Bazófilos   |      |      |           | 0-2%          | Bazófilos   |           |           |           | 0-100     |
| Eosinófilos |      |      |           | 1-10%         | Eosinófilos |           |           |           | 25-800    |

**TOTAL**

0 0 0 0

**Referencias**

|                   |             |
|-------------------|-------------|
| Proteinas totales | 6-8 gr/dL   |
| Albumina          | 3-3,6 gr/dL |
| Globulinas        | 2-7,5 gr/dL |

**RESULTADOS**

# ANEXO 36.- Análisis de muestras sanguíneas







## ANEXO 37.- Resultado del Análisis Histopatológico



Especie : BOVINA      Raza :  
Dirección  
ESTUDIO SOLICITADO POR : JUAN CHARRY BERNARDA HINOJOSA

LABORATORIO DE HISTOPATOLOGIA

INFORME

MACROSCOPICO: Se reciben 6 impresiones de cortes tumorales epiteliales (Papilomas) de CONSISTENCIA DURA

MICROSCOPICO: Células pleomorficas con núcleos de tamaño y formas muy irregulares; citoplasmas de color azul brillante con incrustaciones macrocíticas e infiltrado linfocítico degenerativo.

Fuertes procesos inflamatorios de todo el estroma espicular CORNEAL con abundante tejido infiltrativo fibroso y mitosis MUY desarrollada.

DICTAMEN DIAGNOSTICO: CARCINOMA INFILTRATIVO FIBROSO DEGENERATIVO.

QUITO , 26 DE FEBRERO 2011.



DR CARLOS FIERRO BOLAÑOS  
PATOLOGO CLINICO.



[www.veterinariarenacer.com](http://www.veterinariarenacer.com)  
Francisco Pacheco N62-48 y Sabanilla  
Telfs: 229 - 9567 / 096 - 224 - 414  
Telefax: 229 - 9903  
e-mail: cfierro1001@hotmail.com

**ANEXO 38.- Lesiones de papilomatosis en las haciendas muestreadas**



