

**EVALUACION EXPERIMENTAL DE HISTOVACUNAS EMPLEADAS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA**

NELSON RICHARD ERAZO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYAN**

2002

**EVALUACION EXPERIMENTAL DE HISTOVACUNAS EMPLEADAS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA**

NELSON RICHARD ERAZO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

POPAYAN

2002

**EVALUACION EXPERIMENTAL DE HISTOVACUNAS EMPLEADAS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA PAPILOMATOSIS BOVINA**

NELSON RICHARD ERAZO

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar el título de Biólogo**

Director

Mag. Sci. NELSON ROJAS MARTINEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

POPAYAN

2002

Nota de aceptación

Nelson Rojas Martínez
Director de Grado

Ricardo Benítez
Jurado

Harold Salazar Anaya
Jurado

Fecha de sustentación: Popayán, marzo 25 de 2001

A mi Señora Madre
Liliana, Gracias por todo
su apoyo

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

La Universidad del Cauca por los valiosos aportes en cuanto a mi formación como persona íntegra para la sociedad.

Al profesor Nelson Rojas Martínez, Maestro en Ciencias y Director de la investigación, por su valiosa colaboración y asesoría.

A Ricardo Benítez, Maestro en química de la Universidad del Cauca por su colaboración y motivación en este trabajo.

A Humberto Granados; Profesor en Biología y Director del Bioterio de la Universidad del Cauca por su entera colaboración en el desarrollo del trabajo.

A mis compañeros de estudio por todos los momentos, Situaciones y vivencias

A todo el personal universitario que de una u otra forma sirvieron de apoyo para dar feliz termino a mi trabajo de grado.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.	14
JUSTIFICACIÓN.	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	18
OBJETIVOS.	19
4. MARCO TEORICO.	20
4.1. Papilomavirus.	20
4.1.1. Clasificación de Los Papilomavirus.	21
4.2. Características de la enfermedad.	22
4.2.1. Lesiones.	23
4.3. Neoplasias de la Piel.	24
4.4. Conceptos de Vacunación.	25
4.4.1. Respuesta inmune y Vacunas.	26
4.4.2. La respuesta Humoral Específica.	28
4.4.3. Respuesta Primaria y Respuesta Secundaria.	30
4.4.4. Memoria inmunológica.	32
4.4.5. Adyuvantes Inmunógenos.	34
4.5. Estructura de los Anticuerpos.	36
4.6. Directrices Sobre Los Procedimientos Inmunológicos Aceptables.	38
4.6.1. Inyección Intramuscular.	39
4.6.2. Examen de los Sitios de Inyección.	40
5. ANTECEDENTES.	41
5.1. Tratamientos Contra la Papilomatosis Bovina.	41
5.2. Producción de Sueros en conejo.	46
5.3. Purificación de Inmunoglobulinas.	47
5.4. Producción de Anticuerpos Policlonales en Animales de Laboratorio.	48
6. METODOLOGÍA.	50
6.1. Recolección de Muestras.	51
6.2. Obtención del macerado de papilomas.	52
6.3. Extracción de Proteínas de Papilomas Para La Extracción del Inmunógeno y antisueros.	54
6.3.1. Primera Etapa : Obtencion De La Muestra A Inducir.	55
6.3.2. Segunda Etapa: Producción Del Antisuero.	59
6.3.2.1. Inmunización Del Conejo.	61
6.3.2.2. Procedimiento de Sangrado.	62
6.3.3. Tercera Etapa: Fraccionamiento Del Plasma Sanguíneo En Sueros De Conejos.	64

6.4. Método de Bradford.	70
6.5. Diseño Experimental.	73
5.5.1. Análisis de Varianza.	75
5.5.2. Tratamientos.	75
5.5.3. Estadística Descriptiva, Análisis de Varianza de Una Vía.	76
5.5.4. Datos Estadísticos Obtenidos Mediante El Muestreo.	78
5.5.6. Tabla de Anova.	79
5.5.7. Comparaciones <i>A Priori</i> (Variable independiente IgG).	80
5.5.8. Comparaciones <i>A posteriori</i> .	81
5.5.9. Gráfica Promedio de Inmunoglobulina G en los Tratamientos.	82
6.6. Comparación de la Cuantificación Espectrofotométrica de Proteínas.	83
6.6.1 Curva e Referencia o Calibración con Albúmina Bovina.	84
6.6.2 Pasos Para la Ejecución del Método de Bradford.	85
6.6.3. Valores Descriptivos, Técnica de Bradford Para la Cuantificación de proteínas	86
6.6.5. Relación Absorbancia Versus Concentración: Albúmina Bovina, Muestras (Control, Probiol Histovac.	87
6.6.7. Promedio de Datos de IgG por el Método de Bradford.	88
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	89
CONCLUSIONES.	99
BIBLIOGRAFÍA.	101

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Recomendaciones a tomar en cuenta para la inmunización en conejos.	49
Tabla 2. Tratamientos inducidos en la muestra poblacional (conejos blancos Nuevazelandia)	76
Tabla 3. Resultado de las inmunoglobulinas (mg/ml), en los tratamientos.	77
Tabla 4. Estadística descriptiva de datos de las inmunoglobulinas obtenidas en mg/ml	78
Tabla 5. Análisis de varianza de una vía, datos estadísticos para inmunoglobulinas	79
Tabla 6. Comparaciones múltiples de los tratamientos Control Probiol e Histovac. Estas comparaciones muestran un alto grado de significancia para todos los tratamientos (significancia con un intervalo de confianza del 95%= 0.000)	80
Tabla 7. Comparaciones múltiples o <i>a posteriori</i> , los tratamientos muestran diferencia en las columnas 1, 2 y 3, para el análisis de Duncan y Scheffe; cada valor no está equivalente al siguiente para los dos casos.	81
Tabla 8. Datos de la curva de referencia.	84
Tabla 9. Datos de tabla para la grafica. los datos de la fila superior representan la ABS a 595 nm y los datos de la fila inferior representan la concentración de albúmina bovina.	84
Tabla 10. Relación de reactivo Bradford , solución de NaCl 0.15M. y la dilución Protéica de inmunoglobulina G.	85
Tabla 11. Extrapolación de la dilución de las inmunoglobulinas (alícuotas de 100 µl de las muestras problemas) en correlación con la curva patrón	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Procedimiento de extracción de papilomas, realizado con técnicas quirúrgicas adecuadas para los posteriores análisis.	51
Figura 2. Procedimiento de macerado de papilomas, estos procesos se realizan a una temperatura de 8° C. Aproximadamente	52
Figura 3. Gel discontinuo de poliacrilamida SDS-PAGE 11% para histovacunas probiol e histovac	54
Figura 4. Control de calidad como se establece en las normas sanitarias para productos biológicos para la obtención del inmunógeno y su almacenamiento en material esterilizado	56
Figura 5. Inmunización intramuscular del inmunógeno. Preparación en condiciones asépticas, población muestral a ser inducida.	62
Figura 6. Procedimiento de extracción de muestras sanguíneas de la arteria medial de la oreja, recoleta de esta en tubos de ensayo.	63
Figura 7. Método de purificación de inmunoglobulina G a partir de sangre obtenida de los conejos con sulfato de amonio saturado SAS y EDTA pH 8.0.	65
Figura 8. Extracción de inmunoglobulinas por precipitación salina con SAS y EDTA (a) y su posterior diálisis en PBS buffer fosfato de sodio, 0.1 M.	67
Figura 9. Promedio de concentración de IgG de los tratamientos en cuanto a cantidad de inmunoglobulinas por mililitro de suero datos en mg/ml	82
Figura 10. Relación de absorbancia versus concentración: albúmina bovina, muestras (control probiol y histovac). Curva de calibración ABS v/s concentración para la albúmina bovina (amarillo), muestras: control, probiol y histovac (azul, rojo y verde respectivamente), datos en µg/µl	87
Figura 11. Muestras de inmunoglobulinas por el método de Bradford, lectura a 595	88

nm de los tres tratamientos; Control (azul), Probiol(rojo), Histovac(verde);el promedio de IgG detectadas por espectrofotometría ultravioleta y visible es similar al resultado del análisis estadístico.

Figura 12. Electroforesis de poliacrilamida SDS-page 11% de Histovacunas Probiol carriles 1 y 2 con un indeterminado numero de bandas y Histovac, carriles 3 y 4 el cual presenta dos bandas. Parte superior derecha, espectro UV-vis. de muestras proteicas en solución salina 0.9% correspondientes a 1 y 2 ; parte inferior derecha espectro UV vis. de 3 y 4. 92

Figura 13. Promedio de concentración de IgG de los tratamientos en cuanto a la cantidad de inmunoglobulinas obtenidas por mililitro de suero datos en mg/ml. La figura (a) representa los tratamientos sometidos al diseño experimental y la figura (b) indica los tratamientos sometidos al método de Bradford. 94

En los dos casos se demuestra un aumento progresivo del promedio de inmunoglobulina G , específicamente para PROBIOL e HISTOVAC.

Figura 14. Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida SDS-page 11% y espectrofotometría de inmunoglobulina G en antisueros de conejo. 95

Figura 15. Curva típica de calibración obtenida con estándar de proteínas separadas por SDS-page gel discontinuo de electroforesis (11%), basado en el método de Laemmli (1970) (tomado de Current Protocols In Immunology, suplemento 11; 8.4.18). Las línea punteada verde indica el peso molecular aproximado de 50 KD para la IgG; las líneas puntadas rojas indican la histovacuna histovac con sus dos bandas 47 y 51 KD 96

RESUMEN

En esta investigación se evaluaron dos histovacunas, las cuales consisten en una histovacuna de carácter comercial (histovacuna de la papilomatosis bovina) constituida en un 70% por papilomas y un 30% de excipientes mas adyuvante; y una alternativa (Histovac). Esta histovacuna se preparó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Cauca mediante la extracción de proteínas en solución salina 2.6 M, SSC y alcoholes al 70 y 95 %a partir de los papilomas previamente desqueratinizados

Posteriormente por protocolos de inmunización con adyuvante completo e incompleto de Freund para la inmunización primaria y secundaria se indujeron las vacunas, para el análisis de su correspondiente respuesta inmune (cantidad de inmunoglobulina G producida) y con base en la extracción de inmunoglobulinas por procesos de limpieza de hemoglobina, su consecuente extracción de estas por precipitación con sulfato de amonio saturado, EDTA 0.2 M, pH 7.8 y por métodos de diálisis contra PBS 0.1 M se procedió a procesos de electroforesis por los cuales se determinan sus dos bandas, mediante la técnica de SDS page y por metodos de cuantificación de proteínas con la aplicación de la técnica de Bradford se determina la eficiencia de producción de inmunoglobulina G en relación a las dos vacunas.

La comparación de las histovacunas se sometió a análisis estadísticos (análisis de varianza) los cuales se aplicaron en tres grupos experimentales de conejos (Blanco Nuevazeland), grupos organizados aleatoriamente: grupo I, grupo II, grupo III; estos grupos se les indujo respectivamente un 0.5ml de un placebo compuesto por PBS y su adyuvante respectivo para la inducción primaria y secundaria. Posteriormente se indujo en el grupo II, 10 mg de la histovacuna Probiol en 0.5 ml de (PBS/adyuvante completo de Freund) y 10 mg de histovacuna “Histovac” en condiciones similares, por ultimo se realiza la inducción secundaria de las mismas cantidades de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund. Los resultados finales indican una producción significativa de la vacuna Histovac en relación con la de carácter comercial.

ABSTRACT

In this investigation two histology-vaccines was evaluated, which consist on a histovacuna of commercial character (histovacuna of the bovine papillomatosis) constituted in 70% by papillomas and 30% of excipients but adjuvant; and an alternative (Histovac) carried out in the laboratory of cellular and molecular biology of the university of the Cauca he/she carries out for the extraction of proteins in saline solution 2.6 M, SSC and alcohols to the 70 and 95% from of the papillomas previously nonqueratinized.

Later on for immunization protocols with complete and incomplete adjuvant of Freund's for the primary and secondary immunization the vaccines were induced, for their analysis of their corresponding immune answer (quantity of immunoglobulin produced G) and with base in the immunoglobulins extraction for processes of hemoglobin cleaning, their consequent extraction of these for precipitation with sulfate of saturated ammonium, EDTA 0.2 M, pH 7.8 and for dialysis methods against PBS 0.1 M you proceeded to electrophoresis processes for which their two bands are determined in gels of SDS page and for methods of proteins quantification with the application of Bradford the efficiency of immunoglobulin production G is determined in relation to the two vaccines

The comparison of the histology-vaccines underwent statistical analysis (variance analysis) which were applied in three experimental groups of rabbits (White), organized groups aleatorily: group I, group II, group III; these groups were induced a 0.5 ml of a compound placebo respectively by PBS and their respective adjuvant for the primary and secondary induction. Followed it was induced in the group II, 10 mg of the histovacuna Probiol in 0.5 ml of (complete PBS/adjuvant of Freund's) and 10 histovacuna mg " Histovac " under similar conditions for I finish he/she is carried out the secondary induction of the same immunógeno quantities in incomplete adjuvant of Freund's. The final results indicate a significant production of the vaccine Histovac in connection with that of commercial character.

INTRODUCCION

Se han caracterizado varios tipos de papilomavirus mediante análisis morfológicos. En el ámbito epidemiológico, así como por análisis de su DNA, datos serológicos y clínicos, que sugieren una gran diversidad viral. El conocido papiloma que afecta con mayor incidencia el ganado bovino, se identifica por lesiones epiteliales determinadas por alteración de las mucosas que están revestidas por epitelio plano estratificado, laceraciones proliferativas que regresan espontáneamente. Esta enfermedad es ocasionada por un *Papilomavirus* de ADN que infecta las células basales del epitelio indicando una hiperplasia con hiperqueratosis y acantosis a nivel del estrato corneo de la piel. La incidencia de la *Papilomatosis bovina* se observa de manera directa y es característica principal su representación en el mayor de los casos en forma de verrugas.

El genoma viral se encuentra en las células de la capa basal, donde la producción y maduración del virión restringe la diferenciación de células en las capas más superficiales del epitelio. Ciertos papilomavirus de rumiantes, especialmente el papiloma bovino tipo 1 y 2, causan lesiones con una composición dermal marcada. Estos se conocen como papilomas escamosos o fibropapilomas, ocasionados por varios tipos específicos de papilomavirus, virus que producen fibromas, (transformaciones de los fibroblastos

alterados por la maduración del agente patógeno) ocasionando lesiones benignas, transformadas luego en carcinomas celulares.

Considerando la papilomatosis como un problema sanitario en el departamento del Cauca y al tener en cuenta que los diversos tratamientos que se llevan a cabo para contrarrestar este problema, en su mayoría son de carácter empírico, pretendemos, por métodos científicos y prácticos, evaluar con la utilización de modelos experimentales; conejos de raza Nueva Zelanda, tres tratamientos, un grupo control al cual se tratará con un placebo, una histovacuna de laboratorios Probiol, cuyo uso comercial es muy difundido y una histovacuna elaborada en el laboratorio de Biología celular y molecular de la Universidad del Cauca; para contribuir si los resultados son óptimos de manera eficaz a la erradicación de este problema. La inducción y el estudio de la papilomatosis se realizan por evaluaciones y análisis de la respuesta inmunológica en cuanto a la producción de anticuerpos (inmunoglobulina G); teniendo en cuenta la respuesta primaria y secundaria como elemento básico en la producción de anticuerpos, los diferentes fenómenos y respuestas a nivel humoral que ocurren desde el transcurso de la inducción hasta el estado máximo en el cual la producción de inmunoglobulina G es extremo. En bloques experimentales se llevará a cabo un análisis y cuantificación de la producción de anticuerpos por extracción de estos, a partir de antisueros en sangre de conejos

1. JUSTIFICACION

Las zonas ganaderas del departamento del Cauca se concentran en el municipio de Popayán y sus alrededores. La crianza de ganado bovino en este sector es susceptible en principio a enfermedades virales y epidémicas. Uno de los problemas es el control sanitario inadecuado a las enfermedades, entre ellas la papilomatosis, inconveniente que se agrava por la ausencia de entidades que presten una verdadera atención respecto a la erradicación de enfermedades que inciden y afectan la producción.

Este proyecto se encaminó en primeras etapas a la verificación del impacto sanitario de la enfermedad en algunas zonas aledañas a la región mediante sondeo de información en relación al padecimiento; para continuar en una segunda fase en lo concerniente a estudio histopatológico e histoquímico de papilomavirus en el Municipio de Popayán; trabajo realizado por el Estudiante Pulo Sarzosa Bolaños. El Proyecto de la evaluación experimental de histovacunas empleadas para el tratamiento de la papilomatosis bovina, está encaminado y dirigido en una tercera fase a disminuir el acaecimiento y riesgo que presenta la papilomatosis en las fincas del municipio de Popayán y la región en general, puesto que este problema representa un alto riesgo sanitario que podría incidir en la economía local. Por el grado de desarrollo infectivo de la enfermedad; comprobado en las fincas asociadas a Asproleche, donde se llevó a cabo un estudio sobre el diagnóstico

sanitario de la enfermedad, entregando datos de afección superiores al treinta por ciento 30% (Molineros, 1998)

Por medio de una evaluación y comparación de los tratamientos, se evaluará mediante la determinación y optimización adecuada de diferentes métodos experimentales, para comprobar y verificar resultados óptimos que permitan una correcta aplicación y el adecuado tratamiento de control a esta enfermedad.

Hasta el momento en el Cauca ninguna institución ha aportado técnicas biotecnológicas y de análisis experimental, referentes al problema, los resultados finales deben conducir necesariamente al control y erradicación, que brinde una alternativa de mejoramiento y sostenimiento para con los ganaderos de la región.

La intención y objetivo de este trabajo es la preparación de una hisovacuna y al mismo tiempo hacer una evaluación comparativa con la vacuna comercial (Probiol), de carácter común en la zona, con la cual se trata este padecimiento.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Por análisis y comparaciones electroforéticas, cuantificación espectrofotométrica de inmunoglobulina G, así como por la evaluación de las dos histovacunas por observaciones y métodos estadísticos. Se proyecta comparar la eficiencia de los dos tratamientos, Histovacuna Probiol de carácter comercial e Histovac, preparada en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de La Universidad del Cauca. Se intenta determinar la eficacia y respuesta de estos, la propuesta es un diseño experimental de bloques aleatorios con análisis de varianza, mediante el cual se cuantificarán anticuerpos producidos por acción de los inmunógenos, esta producción se verifica por análisis colorimétricos, con la aplicación de la técnica de Bradford para la comparación de la respuesta inmune en los diferentes casos. Se desea saber si existe una diferencia entre las poblaciones o grupos experimentales implicados en el experimento, en relación a la cuantificación de anticuerpos.

El Departamento del Cauca lamentablemente no cuenta con una adecuada infraestructura y un personal capacitado para la elaboración de material destinado a la erradicación y control de enfermedades. Se ha considerado la papilomatosis como una enfermedad "erradicable" la cual puede ser tratada en su totalidad con infraestructura propia para un control total, considerándola como un inconveniente que afecta de una manera significativa el sector pecuario del municipio de Popayán.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluación experimental de histovacunas empleadas para el tratamiento de la papilomatosis bovina, mediante la valoración de anticuerpos en conejos (*Cuniculus orictalogus*) para comparar la eficiencia de las histovacunas producidas en el laboratorio de la universidad y una vacuna comercial.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar las histovacunas mediante caracterización y titulación de anticuerpos presentes en los diferentes grupos experimentales, mediante la cuantificación de anticuerpos y evaluación espectrofotométrica.
- Comparar y evaluar mediante un diseño estadístico de bloques aleatorios, las histovacunas preparadas en el laboratorio así como la de uso comercial.

4. MARCO TEORICO.

4.1. PAPILOMAVIRUS

En principio se descubrió la etiología viral de las verrugas humanas (papilomas), la cual fue reportada en 1907 por la transmisión de persona a persona, luego por inoculación de un extracto de tejidos de verrugas. Basado en los rasgos histológicos característicos. Las verrugas se han reconocido en un amplio número de especies animales, el papilomavirus del conejo, descrito en los años treinta, prevé uno de los primeros ejemplos experimentales de cáncer de mamífero y con un DNA viral oncogénico, que produce papilomas cutáneos, los cuales progresan en carcinomas en la mayoría de los casos. Muchos de los principios de la virología del DNA tumoral fueron primero aclarados en estudios del genotipo del papiloma. (Keerti et al, 1996).

La morfología del virión se describió después de la aparición del microscopio electrónico, las partículas virales abundan en las verrugas. Posteriores progresos en la caracterización de papilomavirus fueron lentos porque los virus no podían ser propagados en cultivo de tejidos. Una cantidad limitada de información acerca de las proteínas virales y acerca de las interrelaciones inmunológicas se obtuvieron por estudios de partículas virales directamente

de verrugas. En principio prevalecía la idea de que existía sólo una clase de papilomavirus (HPV) y que la naturaleza del epitelio infectado específico en un sitio particular era probablemente responsable de las características morfológicas de las verrugas. En 1960 cuando las técnicas de clonación molecular de DNA viral se volvieron accesibles, se reconoció la notable variedad de los papilomavirus humanos y animales, mediante análisis genético sistemático se aclaró parte de las funciones de los genes específicos codificados por los papilomavirus. Análisis de ADN virales aislados de lesiones individuales han llevado a la identificación de mas de 80 diferentes tipos de virus y al reconocimiento de las lesiones clínicas específicas asociadas con infecciones de diferentes tipos de virus. Hoy es claro que la mayoría de infecciones virales de papilomas son transmitidas por contacto dérmico y están etiológicamente relacionadas con algunos carcinomas celulares escamosos que producen lesiones verrugosas de un desorden dermatológico extraño (Keerti et al, 1996)

4.1.1. CLASIFICACION DE LOS PAPILOMAVIRUS.

Históricamente los papilomavirus fueron agrupados junto a los poliomasvirus, las propiedades mostradas por estos dos grupos incluyen la no presencia de envoltura viral, con cápsula icosaedra, un genoma de ADN doble circular trenzado, y un núcleo como sitio de multiplicación, de acuerdo a las características respecto a sus dimensiones, 55 nm. Para los poliomasvirus y 45 para los papilomas, se dividieron en dos grupos. Estos dos grupos de

papilomavirus están ahora considerados como familias individuales. Miembros de las familias de los papilomavirus y poliomavirus pueden realmente ser distinguidos por diferencias en el tamaño de los viriones y por la cantidad en el genoma viral. 8000 pb vs. 5000 pb (Howley, 1996)

El papiloma mejor estudiado del grupo de los papilomavirus es el BPV-1 el cual induce el origen de fibropapilomas benignos los cuales contienen componentes fibroblásticos dermales, así como componentes proliferativos escamosos y epiteliales. Otros papilomavirus, los cuales inducen también fibropapilomas, incluyen el BPV- 2, característica principal de estos papilomavirus es la habilidad para inducir fibropapilomas en el hospedero. La clasificación de tipos virales está basada en las especies de origen y las distintas composiciones genéticas. Para muchas especies, solamente un tipo de papiloma ha sido descrito, esto es debido a que los extensos estudios comparativos todavía no han sido llevados a cabo en algunas especies a nivel molecular. (Howley, 1996)

4.2. CARACTERISTICAS DE LA ENFERMEDAD.

En los bovinos los papilomas cutáneos son más frecuentes que en cualquiera otra especie doméstica, la enfermedad es más común y grave en los animales jóvenes, de menos de dos años de edad. Son más frecuentes los casos de papilomatosis en el tiempo en que los animales están albergados juntos. La región más afectada es la cabeza, pero también

aparece en el cuello, las ubres y en otras partes del cuerpo. También se presenta con menor frecuencia en equinos y caninos, en estos es notable la enfermedad en las comisuras de los labios y en la lengua. (Becerra y Martelo, 1969)

4.2.1. LESIONES.

La verruga bovina típica parece como una masa de tamaño variable y de forma irregular semejante a una (“coliflor”, “plumilla”, “grano de arroz”) que abulta sobre la piel en la que se inserta formando una base más amplia en el interior. Las lesiones se ven primero como elevaciones de la piel, redondas y lisas, pero pronto se hacen rugosas y córneas. En el microscopio las lesiones muestran engrosamiento de la epidermis con hiperqueratosis y acantosis, en forma de frondas alargadas, por una porción de dermis hiperplásica, en algunas lesiones el crecimiento exagerado de los elementos conjuntivos de la dermis es de un carácter dominante (Zarzosa, 2000)

El tamaño de los papilomas es variable, también se encuentran papilomas en rebaños lecheros, presentándose las tumoraciones especialmente en los pezones, dificultando el ordeño y evidentemente ocasionando contaminación. Existen datos clínicos de su transmisión, pero no se han comprobado experimentalmente. (Becerra y Martelo, 1969)

Las pérdidas debidas a las verrugas son considerables, inciden principalmente en el desarrollo, disminución en la producción de ordeño, imperfección de las pieles, reducción de precio de los animales infectados. Ciertas lesiones de bovinos jóvenes se dieron a conocer por varios investigadores como transmisibles, se ha demostrado que los fibropapilomas de los bovinos son causados por el virus de la papilomatosis cutánea bovina, estos papilomas difieren de las verrugas ordinarias en su estructura, que se caracteriza por la proliferación intensa de los elementos del tejido conjuntivo con un ligero crecimiento del epitelio que los cubre; la pérdida del epitelio y la infección secundaria puede ocasionar edema y mastitis que aumenta la celularidad de la lesión y acrecienta las dificultades de reconocimiento de la enfermedad. Las lesiones presentan con frecuencia problemas quirúrgicos y es posible que crezcan de nuevo después de su extirpación. (Becerra y Martelo, 1969)

4.3. NEOPLASIAS DE LA PIEL.

La papilomatosis bovina es considerada como neoplasias epiteliales, son lesiones potencialmente iniciadoras y procedidas de melanocitos, que incluyen las verrugas comunes y melanomas malignos.

La queratosis actínica Corresponde a una displasia o neoplasia intraepitelial de la epidermis. Se presenta como lesiones eritematosas, descamativas, circunscritas, en zonas

expuestas a luz solar como cara, oreja, y extremidades. Estas infecciones pueden regresar o persistir sin cambios por años. Se estima que hasta un 20% deriva hasta un carcinoma epidermoide. Además se asume que la luz ultravioleta tipo B es uno de los tantos factores causales y que produce daño inmediato acumulativo.

Histológicamente, hay hiperqueratosis y paraqueratosis con acantosis irregular y atipias de queratinocitos limitadas a los estratos basales. La dermis muestra degeneración basófila y una inflamación linfoplasmocitaria superficial. La lesión precursora del carcinoma epidermoide de la piel junto a la queilitis actínica (histológicamente similar, pero en labio) y las queratosis arsenicales secundarias a intoxicación por arsénico (Norte de Chile), se localizan especialmente en patas.

4.4. CONCEPTO DE VACUNACIÓN.

La vacunación consiste en la inducción y producción de una respuesta inmunitaria específica protectora (anticuerpos y/o inmunidad mediada por células) por parte de un individuo sano susceptible como consecuencia de la administración de un producto inmunobiológico. La vacuna que puede estar constituida por un microorganismo, una parte de él, o un producto derivado del mismo (antígenos inmunizantes) con objeto de producir una respuesta similar a la de la infección natural, pero sin peligro para el vacunado. La

vacuna se basa en la respuesta del sistema inmunitario a cualquier elemento extraño (antígeno) y en la memoria inmunológica.

4.4.1. RESPUESTA INMUNE Y VACUNAS.

Los tres elementos claves de la respuesta inmunológica son: las **células presentadoras de antígenos (CPA)**, los **linfocitos T (Th0, Th1, Th2, Tc)** y los **linfocitos B**. Las células presentadoras de antígenos más importantes son las **células dendríticas**, que se distribuyen por todos los órganos del cuerpo, aunque son más abundantes en el **sistema linfoide**. En los ganglios linfáticos, se concentran en las áreas ricas en células T, para facilitar la activación de estas últimas. Otras células presentadoras de antígenos son los **macrófagos** y las **células B activadas**. Las células foliculares dendríticas se encuentran en los folículos linfoides y son capaces de mantener los antígenos en su superficie, cuando están recubiertos por **anticuerpos o complemento**, por medio de receptores para Fc y C3, durante mucho tiempo. Cuando el **antígeno es captado por las células dendríticas circulantes**, éstas emigran a las áreas T de los órganos linfáticos o del bazo y, después de procesarlo en su citoplasma, le presentan a los **linfocitos CD4**, en la hendidura que forman las **dos cadenas de HLA de clase II**. El reconocimiento del antígeno por el linfocito CD4 es totalmente específico, debido a que las cadenas α y β del receptor del linfocito T (TCR) poseen una región variable (V) similar a las de las inmunoglobulinas. (<http://www.vacunas.net/capitulo2.htm>)

La intensidad y características de la respuesta inmunológica depende, en gran medida, de la naturaleza del antígeno, la concentración del mismo y la vía por la que se administra. El estímulo de los linfocitos CD4 por algunos antígenos da lugar a una **respuesta TH1**, caracterizada por la secreción de **interleucina 3, GM-CSF, gamma interferón, interleucina 2, interleucina 12 y factor de necrosis tumoral (FNT- γ)**. Esta respuesta origina una población de linfocitos citotóxicos (Tc), que es fundamental en la defensa y aclaramiento de infecciones producidas por **microorganismos intracelulares**, como bacterias, protozoos y virus. Los linfocitos CD8 citotóxicos así generados, reconocen a los microorganismos intracelulares cuando se presentan en la superficie celular junto a los HLA de clase I. Esta respuesta citotóxica está dirigida contra un gran número de péptidos del agente infeccioso, lo que impide el escape de éste por variación antigénica.

Otros antígenos desencadenan una **respuesta TH2** al ser reconocidos por los linfocitos CD4. En este caso se produce una secreción de interleucina 3, GMCSF, **interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6, interleucina 10 e interleucina 13**. Esta respuesta favorece la producción de anticuerpos que median la destrucción de organismos extracelulares. Los anticuerpos neutralizantes previenen, además, las infecciones por algunos virus y otros microorganismos al neutralizarlos antes de que alcancen el receptor celular y puedan entrar en la célula. Los anticuerpos, sin embargo, pueden contribuir a la destrucción de células infectadas por virus que expresan el antígeno en su superficie, por dos mecanismos: **citotoxicidad** dependiente de anticuerpos, y **lisis** de las células por anticuerpos más complemento. Es característico que los anticuerpos estén dirigidos contra unos pocos epítomos del antígeno, a diferencia de la respuesta celular. Hay una regulación recíproca

entre las respuestas TH1 y TH2. Así, la IL-12 favorece la respuesta TH1 e inhibe la respuesta TH2, mientras que la IL-4 tiene el efecto contrario.

(<http://www.vacunas.net/capitulo2.htm>)

4.4.2. LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ESPECIFICA .

La rama humoral del sistema inmune específico está diseñada para eliminar a patógenos extracelulares y evitar la diseminación de los intracelulares aprovechando que estos últimos se transmiten de célula a célula a través de los fluidos extracelulares. Ello se consigue mediante la producción de grandes cantidades de anticuerpos específicos frente a cada agente foráneo.

Los anticuerpos, por sí mismos no suelen eliminar más que a ciertos virus o inactivar toxinas bacterianas. En la mayor parte de los casos, la eliminación efectiva del patógeno suele deberse a la inducción de las funciones efectoras de los anticuerpos, que dependen de la porción constante de las cadenas pesadas:

- activación del complemento por la ruta clásica, que puede conducir a la lisis del patógeno, quimiotaxis de fagocitos y la opsonización de fagocitos .
- Opsonización de fagocitos por inmunocomplejos (Ag-Ac)
- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC): el anticuerpo se une a

receptores para Fc en la superficie de células NK y macrófagos.

Por lo tanto, en la respuesta humoral podemos distinguir dos grandes fases: la de inducción de la producción de anticuerpos, y la fase efectora, en la que dichos anticuerpos, directamente, o más a menudo indirectamente, eliminan al patógeno. Se pueden resumir las siguientes reacciones químicas encaminadas en el desencadenamiento de la producción de anticuerpos; Podemos aclarar el proceso en tres apartados interconectados:

- El linfocito T_H virgen reconoce a su péptido antigénico (procesado) enclavado en el surco de MHC-II, en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC). Ello provoca la activación y proliferación clonal de los linfocitos T_H .
- Por otro lado (paralelamente), la célula B reconoce al antígeno nativo por medio de su BCR (con mIg), lo que desencadena la endocitosis y procesamiento endosómico de dicho antígeno. Algunos de los péptidos resultantes se "exportan" y se muestran en el surco de moléculas MHC-II del propio linfocito B.
- El T_H activado (resultante de la fase 1) interacciona ahora mediante su TCR con el complejo {epitopo-MHC-II} del linfocito B. En este contacto entre ambas células tiene lugar un intercambio de señales químicas que conduce a la activación, proliferación clonal y diferenciación de las células B en dos subclones hermanos: uno de células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y otro de células B cebadas de memoria.

4.4.3. RESPUESTA PRIMARIA Y RESPUESTA SECUNDARIA.

la respuesta inmunológica consta de las siguientes fases:

- Fase lag (de retardo): es el tiempo que se tarda en la selección de un clon específico de células B y en la producción de células plasmáticas secretoras de Ac y de células B de memoria
- Aumento exponencial (hasta un pico máximo)
- Meseta
- Declive

En total la respuesta puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la persistencia del antígeno.

En la respuesta primaria, inicialmente se produce IgM, y luego IgG, siendo en ella la contribución global de la IgM más importante. En cambio, en la respuesta secundaria se produce mucha mayor cantidad de IgG que de IgM.

Las células B de memoria quedan en reposo (G0) durante muchos años (incluso persisten durante toda la vida). La respuesta secundaria posee una serie de importantes diferencias cualitativas y cuantitativas con respecto a la respuesta primaria:

Las diferencias cuantitativas de la respuesta inmune en correlación a la inducción de un inmunógeno son::

- Iniciación más rápida (menor fase lag)
- Alcanza más intensidad (100 o 1000 veces mayor)
- Dura más tiempo, como se comprueba por la fase de meseta más prolongada y su declive más lento.

En las diferencias cualitativas ocurren los siguientes eventos:

- Cambio de clase, produciéndose preferentemente IgG, aunque también IgA e IgE
- Tiene lugar la maduración de afinidad por hipermutación somática y selección "darwiniana" de los linfocitos con receptores de mayor afinidad. (Iáñez, 1999)

4.4.4. MEMORIA INMUNOLÓGICA.

El reconocimiento del antígeno por el linfocito CD4 no sólo desencadena la respuesta inmune activa, sino que da lugar a la memoria inmunológica, que protegerá al individuo frente a ulteriores exposiciones a este antígeno. Cuando los linfocitos CD4 y CD8 reconocen a un antígeno pasan por tres fases: **activación** y expansión clonal; **muerte de las células activadas**; y, **formación de células T de la memoria**. La mayoría de las células T activadas, una vez que cumplen su función, tienen que ser destruidas ya que, debido a las potentes linfocinas que secretan, representan un peligro para el organismo. Esta destrucción se realiza por muerte celular programada o **apoptosis**, un pequeño porcentaje de células sobrevive y origina una población estable de células de memoria. Cuando hay re-exposición al antígeno, se produce una respuesta acelerada de las células T que sufren una gran expansión clonal, muy superior a la del primer contacto, convirtiéndose rápidamente en células efectoras muy eficaces (*respuesta secundaria*). Sin embargo, los mecanismos íntimos por los que se forman las células de memoria no se conocen, el más convencional es el conocido como **diferenciación lineal**, según el cual el estímulo antigénico da lugar a células efectoras de las que, a su vez, derivan las células de memoria. Se ha propuesto que el balance entre células efectoras y células de memoria depende del nivel de estimulación antigénica. Así, si el estímulo antigénico es demasiado intenso y mantenido, las células se van activando de forma lineal y haciéndose susceptibles a la apoptosis, hasta que finalmente se destruyen todas, sin posibilidad de que se formen células de memoria.

Cuando un individuo se expone a un antígeno, que da lugar a una respuesta TH2, por primera vez, se produce una ***respuesta primaria de anticuerpos***. Esto es, aparecen de forma lenta, anticuerpos de clase IgM y poco después de IgG y del resto de inmunoglobulinas. Ante una exposición posterior al mismo antígeno se produce una ***respuesta secundaria*** caracterizada por: aparición más rápida; predominio de la globulina IgG frente a la IgM; títulos mucho más altos; y, anticuerpos con más afinidad por el antígeno. Esta respuesta secundaria se debe a células de memoria CD4 y B, características de los antígenos dependientes de las células T, que se forman tras la primera exposición. Una vez que la célula B se activa por un antígeno dependiente de la célula T, puede tomar dos caminos diferentes – hacia célula plasmática o hacia célula de memoria – dependiendo de diferentes factores o de distinto microambiente. La supervivencia a largo plazo de las células B de memoria está en relación con un estímulo antigénico mantenido.

La respuesta inmunológica frente al antígeno inmunizante es específica y depende, entre otras cosas, de la naturaleza de aquél. Algunos antígenos, como los polisacáridos que forman las cápsulas de muchas bacterias comunes (neumococo, *H. influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* etc.) estimulan directamente a la célula B, sin ninguna intervención del linfocito T (*antígenos independientes de la célula T*). La estimulación se hace mediante la unión del antígeno a las inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B. Sólo unos pocos clones de linfocitos B – aquellos cuyas inmunoglobulinas son capaces de reconocer específicamente al antígeno – se activan, proliferan y se diferencian a células plasmáticas que secretan anticuerpos. En este caso, no se generan células de la memoria, por lo que no se produce refuerzo de la inmunidad específica ni respuestas secundarias de anticuerpos con las dosis de recuerdo de vacuna. (<http://www.vacunas.net/capitulo2.htm>)

4.4.5. ADYUVANTES INMUNÓGENOS.

Un **adyuvante** inmunógeno puede definirse como cualquier sustancia que incorporada a una vacuna, acelera, prolonga o potencia la respuesta inmunogénica frente a la misma. Tienen gran importancia y se diferencian de las proteínas transportadoras o *carriers* (proteínas extrañas que se unen a un antígeno no inmunógeno para convertirlo en inmunógeno) en que no forman uniones estables con el inmunógeno. Los adyuvantes son básicamente necesarios en la inmunización inicial mientras que los carriers se necesitan tanto en la respuesta primaria como en las sucesivas. La mayoría de las nuevas vacunas compuestas por subunidades antigénicas altamente purificadas son muy seguras pero de menor inmunogenicidad que otras vacunas con más impurezas. Esta inmunogenicidad puede ser potenciada por los adyuvantes. La utilización de estos compuestos puede tener otras ventajas:

Immunización eficaz de individuos con capacidad inmune disminuida, como neonatos, e individuos inmunodeprimidos; b) elaboración de vacunas con menos cantidad de antígeno y, por tanto, más aptas para crear vacunas combinadas; y, c) menor número de dosis de recuerdo.

Uno de los primeros adyuvantes, desarrollado por Freund hace más de 50 años, está compuesto por una emulsión de aceite; monooleato de manitol + aceite de parafina

(Cooper, 1984) en agua con micobacterias muertas (adyuvante completo de Freund), y el adyuvante incompleto (sin las micobacterias). También son utilizados los adyuvantes compuestos de aluminio (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), Los adyuvantes actúan mediante tres mecanismos:

1-"Efecto depot", por el que los adyuvantes de aluminio, las emulsiones oleosas y los liposomas o microesferas, mantienen al antígeno atrapado en el sitio de la administración de la vacuna, permitiendo un estímulo inmune prolongado. Este efecto es particularmente importante cuando se utilizan pequeños antígenos solubles que podrían ser aclarados rápidamente. Además el mismo "efecto depot" impide una liberación masiva del antígeno, que podría dar lugar a tolerancia inmune, y causar una respuesta inflamatoria local que atrae a macrófagos y a otras células presentadoras de antígenos.

2- Mejorar la presentación del antígeno a las células APC y actuando como coestimuladores de los macrófagos, como en el caso de los iones de aluminio, liposomas y copolímeros de bloqueo no-iónico. 3- Induciendo la secreción de citocinas que actúan sobre los linfocitos T y B.

Algunos adyuvantes, como el ión aluminio, generan exclusivamente respuestas TH2, siendo muy útiles cuando se quieren obtener títulos de anticuerpos muy elevados, que neutralicen toxinas (los toxoides tetánico y diftérico) o virus, antes de que se adhieran al receptor celular (vacuna de hepatitis). Por el contrario, otros adyuvantes como los péptidos de muramilo vehiculizados en aceite, el lípido A de las endotoxinas y el adyuvante completo de Freund estimulan preferentemente respuestas TH1 que dan lugar a

citotoxicidad. Por último, algunas citocinas podrían ser utilizadas como adyuvantes, dada su capacidad para favorecer respuestas TH1 o TH2. El interferón α y el interferón γ han sido utilizados para lograr respuestas a la vacuna de hepatitis B en personas que no desarrollan anticuerpos frente a la misma. Sin embargo, el uso de citocinas como adyuvantes puede verse dificultado por las numerosas e imprevistas acciones de estos mediadores en el sistema inmune. La elección de un adyuvante determinado en la elaboración de una vacuna, depende de la naturaleza de ésta y del efecto deseado. (<http://www.vacunas.net/capitulo2.htm>)

4.5. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glucoproteínas presentes en el plasma y líquidos intersticiales, que el organismo elabora ante la entrada de un antígeno y que tienen la capacidad de unirse específicamente al mismo. Son producidos y secretados en gran cantidad por las células plasmáticas resultantes de la activación y diferenciación de los linfocitos B.

Los anticuerpos poseen sitios de reconocimiento y unión con determinantes antigénicos, que se denominan paratopes; todas las moléculas de anticuerpos secretadas por un plasmocito dado, poseen la misma especificidad antigénica, es decir, reconocen el mismo antígeno. La función esencial de los anticuerpos es activar mecanismos efectores que permitan la eliminación del antígeno del organismo. Una molécula de anticuerpo está

constituida por cuatro cadenas polipeptídicas: Dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 - 70 kd, idénticas entre sí, y dos cadenas livianas (L) de aproximadamente 23 - 25 kd, iguales entre sí. Las dos cadenas pesadas están unidas por enlaces disulfuro y a su vez cada cadena liviana esta unida a cada cadena pesada por enlaces disulfuro.

Las cadenas livianas pueden ser de dos tipos: kappa o lambda. En el humano, el 65% de los anticuerpos poseen cadenas kappa y el 35% lambda. Ambas poseen aproximadamente 214 aminoácidos de longitud, que se dividen en dos regiones o *dominios*: uno llamado región variable de la cadena liviana (V1) que incluye los primeros 107 aminoácidos, y la llamada región constante de la cadena liviana (c1) que incluye la segunda mitad de la cadena. Cada uno de estos dominios posee puentes disulfuro intercatenarios entre las regiones variable y constante.

Las cadenas pesadas son esencialmente de 5 tipos diferentes: mu, delta, gamma, epsilon y alfa. Según la cadena pesada que use el anticuerpo se define su clase o isotipo: si posee cadenas mu el anticuerpo se denomina inmunoglobulina M o IgM; si posee delta se llama IgD, si posee gamma IgG. Para algunas cadenas pesadas existen subclases diferentes: hay cuatro subclases de gamma: gama 1, 2, 3, y 4, que originan IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Hay 9 cadenas pesadas distintas para el humano.

Las cadenas pesadas también poseen un dominio o región variable de la cadena pesada (VH), que involucra a los primeros 115 aminoácidos de la cadena. Poseen a continuación una región constante de la cadena pesada (CH) que se subdivide en 3 dominios, de

aproximadamente 110 aminoácidos cada una (CH1, CH2 y CH3). La región Vh posee un puente disulfuro intercatenario, mientras que cada dominio CH también posee enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro que unen entre sí a las cadenas pesadas (numero que varía en las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas) están localizados entre los dominio CH1 y CH2; esta porción de la molécula recibe el nombre de región bisagra.

El sitio de combinación del anticuerpo con el antígeno esta determinado en forma conjunta por la estructura espacial de las regiones VL y VH. Por lo tanto, una molécula de anticuerpo posee dos sitios de combinación, es decir, es bivalente. La digestión enzimática de un anticuerpo genera dos fragmentos llamados Fab (cada uno con un sitio de combinación) y un fragmento llamado Fc, que incluye los dominios CH2 y CH3. Esta porción Fc es la que define las propiedades efectoras de los diferentes anticuerpos.

(<http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/estruc%5Fanticu/default.htm>)

4.6. DIRECTRICES SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS INMUNOLOGICOS ACEPTABLES.

Cuando se empieza una inmunización, la elección del adyuvante correcto puede ser difícil. El adyuvante completo de Freund (ACF) puede ser utilizado solamente cuando hay cantidades pequeñas de antígenos solubles disponibles. El ACF es una emulsión que consiste en volúmenes iguales de ACF y de antígeno (1 parte o menos de ACF por 1 parte

de antígeno). Sin embargo, si hay cantidades grandes de material altamente antigénico, se debería considerar el uso de otros adyuvantes.

Un aspecto importante en los procedimientos de inmunización es la disponibilidad de personal técnico competente y experimentado en la manipulación de las especies utilizadas. Ellos deben conocer bien y ser capaces de reconocer señales de angustia en los animales inyectados, y ser también capaces de tomar la responsabilidad de intervenir cuando sea necesario.

El ACF debería usarse únicamente en casos de inmunización más problemática. Nunca debe ser administrado por vía intravenosa o en dosis repetidas. El ACF no debe usarse en caballos.

4.6.1. INYECCIÓN INTRAMUSCULAR .

En conejos, las inyecciones intramusculares de ACF se pueden administrar preferentemente en el músculo del muslo; hasta 0.5 ml (500 μ l), preferentemente por sitio. La inyección intramuscular ACF no está recomendada en animales pequeños de laboratorio tales como ratas, ratones, hámsteres, jerbos, etc. Con animales más grandes tales como gatos, perros y aves de corral, un máximo de 1ml de ACF puede ser inyectado en los músculos del muslo. La vía intramuscular es aceptable en el ganado, el cerdo, el carnero y la cabra.

4.6.2. EXAMEN DE LOS SITIOS DE INYECCIÓN.

Los sitios de inyección deben ser observados por el investigador o por la persona designada, por lo menos tres veces por semana, durante cuatro semanas después de cada inyección.

Si una o más lesiones se desarrollan en cualquier sitio de inyección, se debe informar a las personas responsables como el veterinario o el director del Bioterio, para que los animales reciban el tratamiento apropiado. Las lesiones deben ser examinadas por lo menos tres veces por semana por el investigador o por la persona designada, hasta que estén completamente curadas. (Marlies *et al* 1994)

5. ANTECEDENTES

El desarrollo de métodos así como trabajos preventivos adecuados para la erradicación de la papilomatosis bovina en Colombia no cuenta con un desarrollo óptimo, solo se limitan a aplicaciones de uso tópico y el uso de histovacunas de carácter comercial, métodos que no brindan la suficiencia en cuanto a la desaparición de la enfermedad

5.1. TRATAMIENTOS CONTRA LA PAPILOMATOSIS BOVINA.

Prácticamente en los últimos años no se han llevado a cabo procedimientos adecuados contra la papilomatosis bovina, la cual continúa sin ningún tratamiento específico y se sigue aplicando métodos "citodestructores" químicos o físicos (electrocirugía, láser, crioterapia, curetaje). Estas terapéuticas eliminan la neoplasia visible pero no la carga viral. Más del 30% de las verrugas desaparecen espontáneamente en 6 meses y la mayoría en 3 años. Tratamientos disponibles para cada caso o tipo de verruga se resumen a continuación :

Verrugas comunes, las cuales presentan una regresión espontánea, las 2/3 partes de los casos en los dos primeros años. Se utilizan múltiples métodos físicos y químicos para su erradicación. Otro tipo de verrugas de aparición constante son los condilomas acuminados los cuales en etapas juveniles disminuyen espontáneamente en el 50% de los casos. No se tienen aprobados tratamientos específicos. Se puede tratar con ácido salicílico al 3-5%, crioterapia y en casos graves valorar cirugía.

Las verrugas filiformes por lo general son tratadas con crioterapias de elección. Las verrugas planas contrarrestan con ácido retinóico (tretionin al 0,025%). Por unltimo otro tipo de verrugas son las plantares que para proteger su diseminación se neutralizan por la aplicación de queratolíticos como ácido salicílico (10-40%), Glutaraldehido al 10%. (Morter et al, 2000)

Nuevas terapéuticas son las antivirales e inmunomoduladoras, básicamente: interferón alfa, imiquimod, cidofovir, vacunas. Se cree que en el futuro, especialmente la medicación tópica como el imiquimod en crema al 5% y el cidofovir al 3% (aún no comercializado). Las vacunas son complicadas por la falta de conocimientos de los antígenos virales. Múltiples inyecciones de vacunas tienen crédito para la una cura efectiva de la papilomatosis pero en definitiva no ha sido encontrado un verdadero tratamiento. Las verrugas pueden ser removidas quirúrgicamente con unas tijeras esterilizadas o con láminas de bisturís y el consecuente sangrado puede ser controlado con aplicaciones de nitrato de plata. (Morter et al, 2000)

En el municipio de Popayán no se han desarrollado procedimientos para el tratamiento adecuado de la papilomatosis bovina, en el mayor de los casos se utilizan formas empíricas o rutinarias y en otros de carácter quirúrgico. De acuerdo a datos de observación los procedimientos llevados a cabo para la erradicación actúan a nivel externo y no inmediato. (Sarzosa,2000)

Algunos tratamientos, como los terapéuticos, en muchos casos se realizan por la escisión de las verruga, procurando incluir en ella su prolongación eventual hacia la profundidad extirpación que va seguida de una rápida regresión y desaparición de las remanentes verrugosos; asumiendo que los virus salen de los tumores en el momento de la operación, es absorbido por la herida y provoca la inmunización. Esta práctica rutinaria no ha tenido confirmación experimental, puesto que las verrugas involucionan espontáneamente. Por ello se consideran estos procedimientos terapéuticos con algunas reservas. La ligadura de las verrugas sólo es eficaz en las pediculadas. La herida de la piel suele suturarse, pero también puede dejarse abierta, cubriéndola de algodón con percloruro de hierro para evitar la hemorragia. Se han preparado vacunas comerciales elaboradas a partir de virus cultivados en huevos embrionarios, estas vacunas se administran por vía subcutánea o intradérmica. Se afirma que una sola inyección de vacuna provoca, en la mayoría de los casos la rápida regresión de las verrugas. Observaciones demuestran que las autovacunas confieren inmunidad parcial y esta impide el desarrollo de los elementos epiteliales de los papilomas, pero no de los elementos del tejido conectivo, la reinoculación solo produce crecimiento del tejido conectivo. La inyección de papilas de verrugas es un método que consiste en la extracción de una verrugas la cual se lava y se coloca en una solución

fisiológica de sal común, se fracciona con material estéril, se le añade formol y se filtra. Así se inyecta subcutáneamente a los animales menores de uno a dos ml., repitiendo las inyecciones tres veces con intervalos de tres a ocho días. (Becerra y Martelo, 1969)

La roentgenoterapia suele dar muy buenos resultados especialmente en las verrugas juveniles, que a menudo aparecen, después de una irradiación eficaz contra el eczema, pero muchas veces puede observarse que se reducen de dos a tres meses mas tarde. Por eso es conveniente irradiar nuevamente las verrugas que quedan, pero solo pasado este tiempo. También se ha observado que después del tratamiento de masas de verrugas jóvenes, desaparecen, así como las que no fueron irradiadas, echo que se atribuye a un proceso de inmunización provocado por los productos de destrucción de verrugas irradiadas. Las verrugas viejas, mas queratinizadas, que se hayan aislado de la piel sana, resultan mas “rebeldes” y solo reaccionan a cantidades mayores de rayos. (Becerra y Martelo, 1969)

Otro tipo de tratamientos efectuados por algunos ganaderos consisten en aplicaciones a nivel cutáneo de agentes químicos, como el Diaceturato de 4,4-Diazominibenzamidina. Agentes que causan la desaparición temporal y no definitiva de las verrugas, puesto que estas regresan espontáneamente. Las diamidinas funcionan adecuadamente, suministrada en dosis de 7.5 mg/kpv; kilogramo por peso vivo, y aplicaciones con intervalos de 8 días. (Robayo, 1974)

En el campo de la prevención de la papilomatosis bovina se encuentran vacunas de carácter comercial, las cuales pueden ayudar a prevenir las verrugas en el ganado, siendo mas efectivas en los hatos no previamente infectado. Son conocidas como vacunas autógenas,

las cuales son preparadas con procedimientos químicos desde las propias verrugas del animal infectado. El animal infectado no necesariamente mantiene visibles sus verrugas pero sin embargo es recomendable mantenerlo en condiciones adecuadas para la prevención sanitaria asimismo el uso antiséptico del equipamiento mediante el cual se tratan dichos procedimientos.

Para la manipulación de las verrugas se recomienda trabajar con desinfectantes como la solución de formaldehído 2-4% y lavar la zona afectada. Otros informes correspondientes a los tratamientos más adecuados para la erradicación igualmente muestran las vacunas autógenas, obtenidas a través de macerados inactivados de papilomas colectados de animales infectado; indicando asimismo resultados poco satisfactorios en relación a la erradicación total de la enfermedad. Otras formas de tratamiento se describen como resultados inconsistentes extirpación quirúrgica de algunos o todos los papilomas, también se frecuentan tratamientos medicinales locales o sistémicos con diversos productos. (Kleysler,2000)

5.2. PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS EN CONEJO.

Perrotta *et al*, comprobaron un método de inoculación en conejos, por vía intradérmica para la producción de antisueros fúngicos contra *Aspergillus fumigatus* (AF), *Histoplasma capsulatum* (HC), *Paracocci-dioides brasiliensis* (PB) y *Coccidioides immitis* (CI), En este trabajo se prepararon los inmunógenos por métodos descritos para la inmunización adecuada de animales de laboratorio descritos por el Center for Disease Control (CDC), y el de PB, técnica descrita por Camargo y col, 1990. Todos los conejos produjeron anticuerpos contra los diferentes antígenos específicos, en el momento en que se alcanzaron los picos de respuesta primaria y luego de cada refuerzo, la respuesta secundaria mayor que la primaria. (Perrotta *et a* 1994).

Ochoa y Trujillo, desarrollaron una metodología para la preparación de antisuero contra el virus de la tristeza de los cítricos, Esta suspensión se utilizó para la inmunización de conejos, mediante cuatro inyecciones intramusculares (antígeno + adyuvante incompleto) y cinco intravenosas, a intervalos de 3 y 4 d. Los procedimientos de inmunización se realizan con la ayuda de coadyuvantes de freund's completo e incompleto par la primera y seunda inducción respectivamente, Ochoa y Trujillo 1993)

LEŠNÍK, F *et al.*, presentaron un seguimiento entre la relación de la vacunación profiláctica y la vacunación autógena terapéutica contra la papilomatosis bovina con dos tipos de vacunas, se prepararon tejidos de la verruga (vacuna no-purificada y una vacuna semipurificada). Cada animal se inoculó dos veces por vía intramuscular (con intervalo de diez días) con 5 ml (11.50 mg de proteínas) y la otra vacuna (3.17 mg proteínas). El tratamiento con la primera vacuna mostró 93.5% eficacia; después de 105 días de vacunación: La infección de Papillomavirus de animales se relacionó con desórdenes serios del metabolismo (principalmente minerales) probablemente causando daños al hígado y riñón por agentes mutagénicos y carcinogénicos como cadmio y arsénico, que se observaron en el suero de animales de experimentación. Lešník, *et al* 2000

5.3. PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS.

En varios estudios se utilizó un método basado en la precipitación salina, precipitando 10 ml de suero normal de ratón con sulfato de amonio (MERCK) a una concentración final de 50 % y posteriormente, dializaron toda la noche contra tampón fosfato de sodio 17,5 mM pH 6,5 previamente equilibrada con el mismo tampón, a un flujo de 30 mL/h y recogen fracciones de 3 mL/tubo. Monitoreadas por espectrofotetría a 280 nm seguido se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry, el resto de las proteínas del suero que interaccionan con la matriz fueron eluidas con tampón fosfato de sodio 200 mM pH 6,5. La IgG purificada se utiliza como inmunógeno para producir el anticuerpo

policlonal específico. Por último se evalúa por inmunoelectroforesis el grado de pureza de la IgG purificada.

5.4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN ANIMALES DE LABORATORIO (CONEJOS)

Estudios compilados en un taller organizado por el centro europeo para la validación de métodos alternativos (ECVAM), cuyo objetivo es discutir y evaluar los procesos de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales (incluyendo la ruta de inyección, la especie animal y el adyuvante), así como bosquejar recomendaciones y guías para los procedimientos de inmunización (antígeno usado, métodos de colección de sangre) con consideraciones para el bienestar y la optimización de protocolos de inmunización. También incluyen la salud y el estado genético de la especie, la experiencia y competencia del personal a cargo, la higiene, dieta y albergue de los animales. En este reporte se toman en cuenta las discusiones y otras recomendaciones para la inmunización en conejos (Blancos Nueva Zelanda), ver la tabla 1. (Marlies *et al*) :

Recomendaciones de la edad a la cual los animales deben ser usados para la producción de anticuerpos policlonales	3-6 meses	
Rutas sugeridas para la inyección con adyuvante de Freund	Inyección primaria	Intramuscular con adyuvante completo de Freund
	Inyección secundaria	Intramuscular con adyuvante completo de Freund
Volumen máximo por inyección de mezcla de adyuvante antígeno/depot-forming por sitio de inyección	250- 500 μ l	
Colección de sangre	Máximo 20 ml. Por animal 15% del total de la sangre (intervalos de 15 días)	
Designación de inducciones secundarias	2-3 semanas después de la primera inducción	

Tabla 1. Recomendaciones a tomar en cuenta para la inmunización en conejos

6. METODOLOGIA

Para los efectos de crianza, mantenimiento, manejo, albergue, entre otros, para con el grupo en el cual se realiza la inmunización se utilizaron conejos de raza Nueva-Zelanda (machos), los cuales se suministraron por parte de la dirección administrativa del Bioterio de la facultad de Medicina que cuenta con un adecuado cuidado en el control de calidad de estos animales. Para este tipo de estudio los animales distribuidos en sus respectivas jaulas, se conservaron en su totalidad en el Bioterio por un periodo de varias semanas en condiciones de luz, temperatura ambiente (18 a 23 °C), nutrición, mantenimiento adecuados, para la adaptación y respuesta inmunológica propicia de acuerdo a las exigencias de la investigación.

Inicialmente los conejos se pesan hasta mantenerlos entre (2.5-3 kg) peso ideal para los protocolos de inmunización; el volumen de antígeno que se debe inducir se establece de acuerdo a referencia bibliográficas en una cantidad de 10mg en 0.5 ml de PBS-adyuvante (1:1), la ruta de inducción del antígeno es la vía intramuscular. La nutrición para los gazapos está basada en conejina (alimento concentrado comercial), agua, zanahorias pequeñas y hierba, suministradas diariamente y a la misma hora con un adecuado control de higiene y mantenimiento.

6.1. RECOLECCION DE MUESTRAS DE PAPILOMAS.

El proceso de la recolección de muestras tejido infectado de papilomas se realizó en las instalaciones del matadero municipal de la ciudad de Popayán, barrio “Las Ferias”, dicho proceso se llevó acabo con adecuadas medidas y controles de sanidad con relación a la extracción de las verrugas las zonas en mayor afección, ubres y cuello, el transporte de éstas, así como la atención adecuada respecto a las medidas de bioseguridad personal.

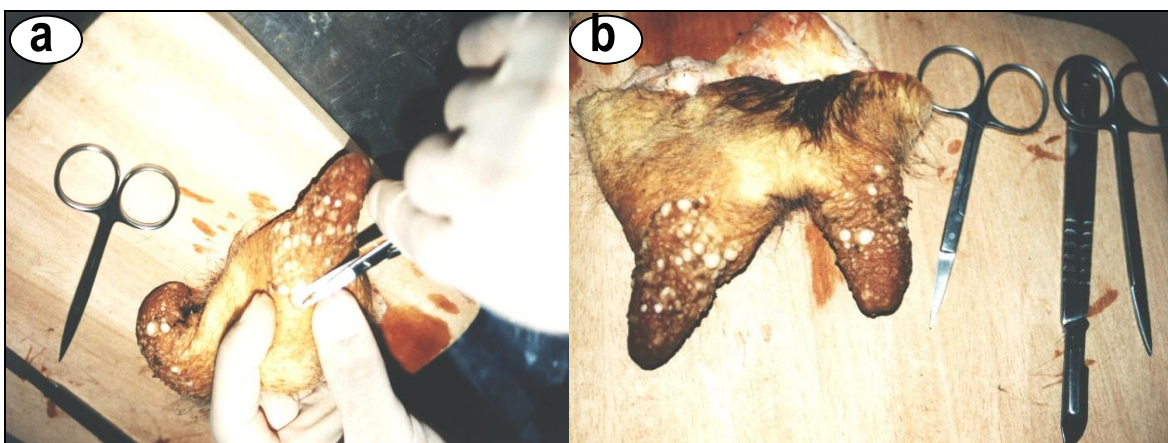


Figura 1. Procedimiento de extracción de papilomas (a), realizado con técnicas quirúrgicas adecuadas para los posteriores análisis (b).

6.2. OBTENCION DEL MACERADO DE PAPILOMAS.

El proceso de extracción de los papilomas se realiza por escisiones de la verruga, tomados desde la base (dermis) Para la extracción de estas se utilizó material quirúrgico y esterilizado (bisturís y tijeras), estas técnicas se realizan con normas adecuadas de bioseguridad, así como de limpieza con desinfectantes adecuados (hipoclorito de sodio, alcohol antiséptico, entre otros), las muestras extraídas se colocan en un buffer fosfato de sodio (PBS 0.1 M) apropiado a las condiciones fisiológicas del tejido, con un pH de 7.0, dicho material se procesó mediante el macerado de los papilomas, previamente se desqueratinizó mecánicamente, estos procesos se realizan a una temperatura de 8° C.

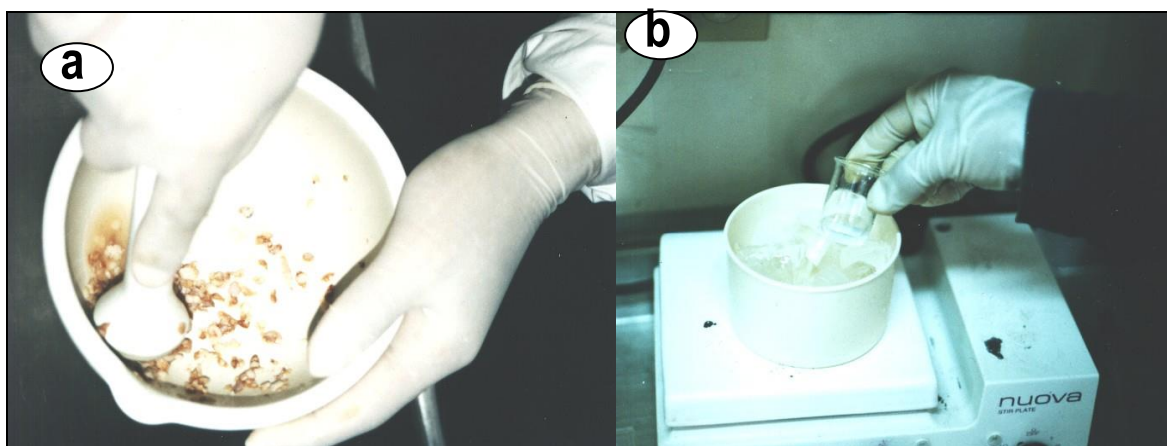


Figura 2. Procedimiento de macerado de papilomas (a), estos procesos se realizan a una temperatura de 8° C (b)

El material macerado se trabajó posteriormente para la extracción de proteínas por el protocolo que se indica adelante, consecutivamente se realizan procedimientos de diálisis contra PBS 0.1 M inmediatamente después de los procesos de extracción de proteínas y de la diálisis se procedió a la liofilización del material obtenido, empacó en frascos esterilizados en cantidades de 10 mg.

El procedimiento para el corrimiento de geles se realizó en una cámara de electroforesis con el **sistema de gel mini-vertical EC120**, el cual está diseñado para separaciones electroforéticas de macromoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos. El método de separación general de proteínas es el Laemmli y los geles se preparan en un porcentaje del 11 %. Se corren muestras de las histovacunas (Probiol y histovac, realizada en el laboratorio), así como de las inmunoglobulinas en extracción (ver figuras 3 y 11), de acuerdo a los procedimientos generales de separación de proteínas.

El material liofilizado se somete a procesos comparativos de electroforesis SDS- PAGE 11% en relación a la histovacuna de Probiol para determinar en posteriores análisis del número de bandas y los posibles pesos moleculares de proteínas de acuerdo al coeficiente de movilidad relativa de las bandas analizadas.

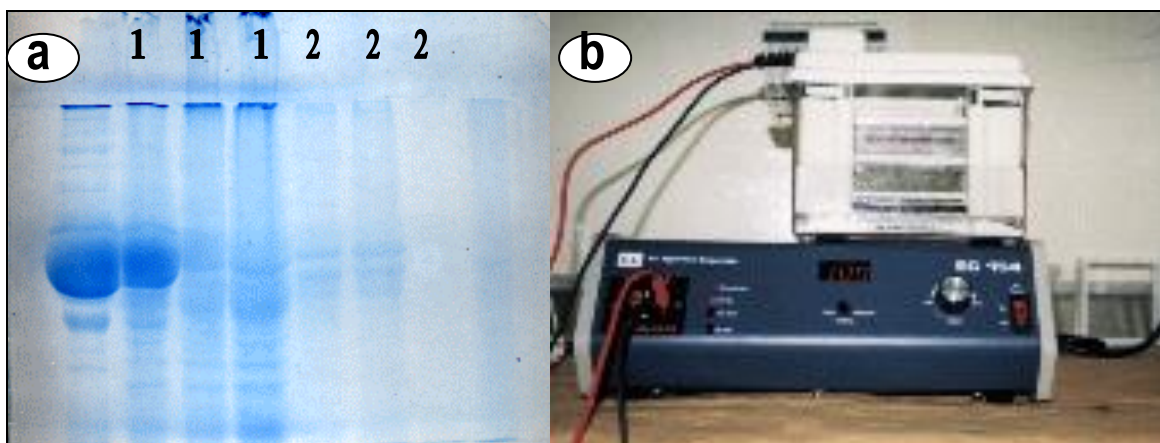


Figura 3. Gel discontinuo de poliacrilamida SDS-PAGE 11% para histovacunas probiol e histovac 1 y 2 respectivamente (a). Cámara de electroforesis para el corrimiento de geles (b).

6.3. EXTRACCION DE PROTEINAS DE PAPILOMAS PARA LA OBTENCION DEL INMUNOGENO Y LOS ANTISUEROS.

Los procedimientos para la preparación del inmunógeno para el caso de la histovacuna Histovac y la inducción de Probiol (histovacuna comercial) así como la obtención de antisueros, se realizó con técnicas adecuadas de bioseguridad, tanto de la población muestral, como de las pruebas sucesivas de inmunización del ganado afectado con la papilomatosis bovina.

6.3.1. PRIMERA ETAPA : OBTENCION DE LA MUESTRA A INDUCIR.

Los papilomas constituyen la materia prima indispensable para la producción de los antisueros, para este efecto existe una planeación para la recolección de muestras de tal forma que los papilomas recolectados del ganado se trasladen y mantengan en condiciones de temperatura adecuadas para que no se altere su composición.

Las técnicas a asumir en cuenta para la realización de la histovacuna están encaminadas en especial a la obtención de las proteínas por procesos de extracción salina; material previamente desqueratinizado de manera quirúrgica con bisturís al cual se le realiza procesos de extracción protéica, con técnicas adecuadas de esterilización y por la aplicación un adecuado control, requerimientos que se efectúan, como se establece en las normas sanitarias para productos biológicos. Por tanto para cumplir con esas normas a este proceso se le realizan con **procedimientos biológicos**, donde se evalúa la potencia (neutralización), la esterilidad (ausencia de bacterias y hongos), pirógenos, inocuidad y seguridad; **procedimientos químicos**, como el contenido de sulfato de amonio, cloruro de sodio, pH , etc. Y por ultimo los **procedimientos físicos** donde se analizó la presencia de partículas turbidez y color del producto.

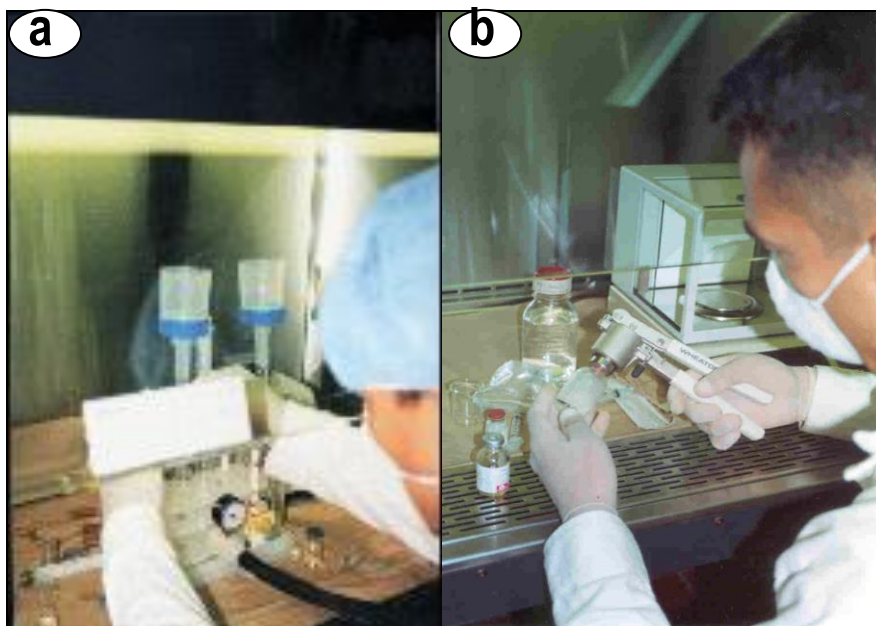
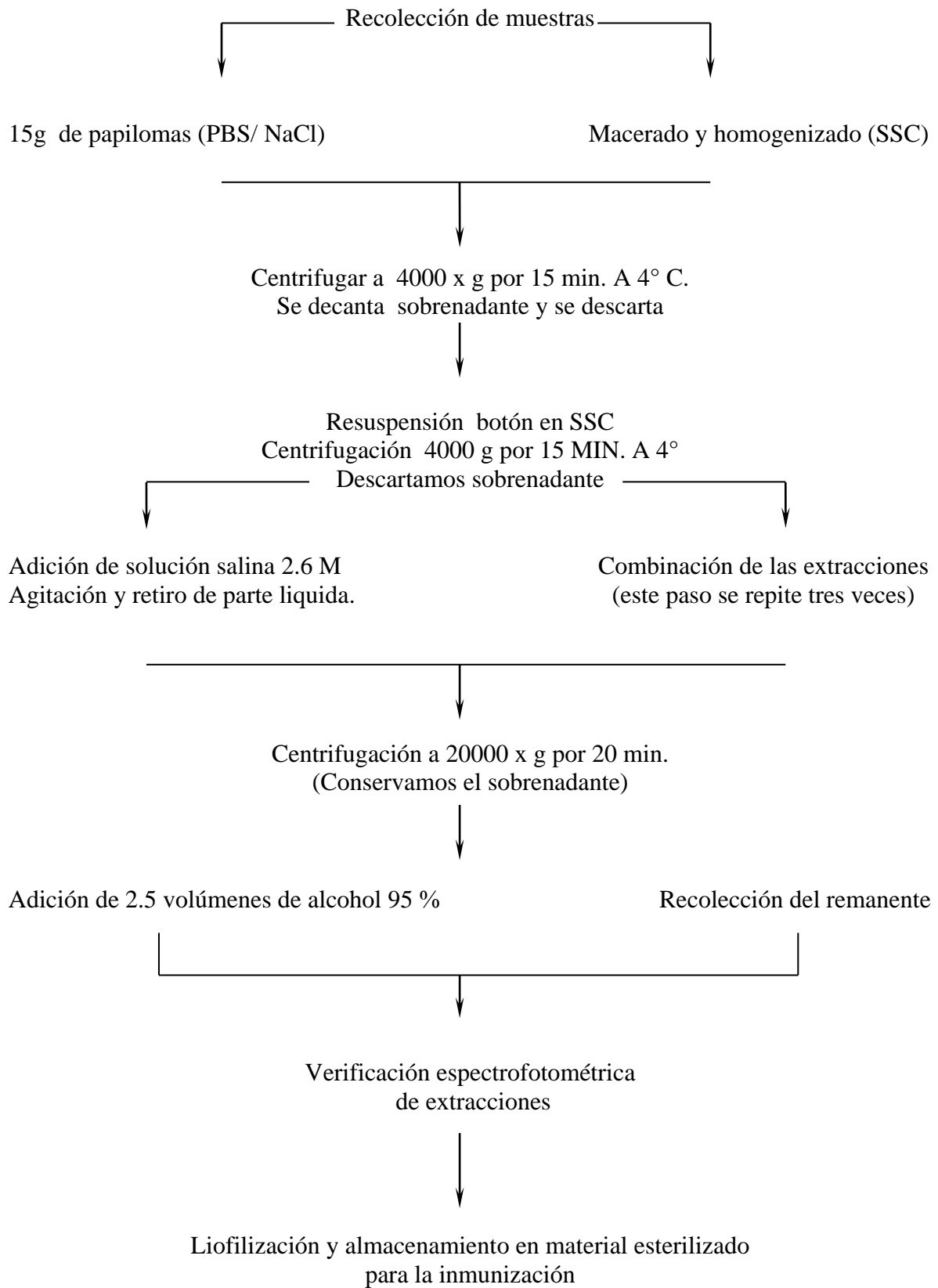


Figura 4. Control de calidad como se establece en las normas sanitarias para productos biológicos para la obtención del inmunógeno (a) y su almacenamiento en material esterilizado (b)

De esta manera solo se procesó el material cutáneo de mayor afección del eczema. La extracción de proteínas de las muestras previamente lavadas en NaCl 0.1% y PBS 0.1 M con una temperatura de 6 °C. se inició con el peso de 15 g de la muestra anticipadamente congelada, tejidos que se llevó a un homogenizador y se agregan 50 ml de amortiguador de citrato salino 0,1 M (SSC), la suspensión se homogenizó hasta obtener un completo macerado (sin permitir que el contenido llegue a temperatura ambiente); terminado este paso colocamos el homogenizado en tubos de centrifuga y se centrifuga a 4000 g por 15 min. a 4° C, **centrífuga refrigerada IECB-22M**, a continuación se decanta el sobrenadante; posteriormente se resuspende el botón en 10 ml de amortiguador y mediante

agitación leve con una varilla redonda, el botón se dispersa con un mezclador tipo vortex, se centrifuga una vez más en las condiciones anteriores luego se descarga adicionando 10 ml de solución salina 2.6 M y dispersando el botón con una varilla de vidrio con agitación constante, la parte líquida de este proceso y se recupera para el último paso que consiste en añadir otros 10 ml de solución salina 2.6 M. y agitar vigorosamente. Este procedimiento se repite dos veces con la solución salina fría y agitación constante, para dispersar el botón con una varilla de vidrio.

A continuación se reúnen las extracciones anteriores, para centrifugar a 20,000 g durante 20 min. Este procedimiento permitirá la formación de un botón con las proteínas insolubles. Las cuales se colocan cuidadosamente en un vaso de precipitado adicionando 2.5 volúmenes de etanol frío al 95% el cual se adiciona por las paredes del vaso y encima de la solución salina. Por último se colecta el remanente mediante agitación cuidadosa de la mezcla, si el remanente está altamente polimerizado se devana con una varilla de vidrio limpia de la solución salina que está mezclada con el alcohol y se liofiliza en un equipo **Freezer dryer 4.5 Labconco**, durante 24 horas, posteriormente se toman alícuotas de proteínas previamente disueltas en PBS 0.1 M. Para llevarlas a las cubetas del espectrofotómetro donde se toman datos entre los 200 y 300 nm (**espectrofotómetro UV-vis Spectronic Genesis 5**) resaltando los picos máximos de absorbancia, finalmente se guarda el material en extracción en frascos esteriles para su posterior utilización en la inmunización. A continuación se presenta un diagrama de flujo, representando el anterior método:



6.3.2. SEGUNDA ETAPA: PRODUCCION DEL ANTISUERO.

Esta fase se inició mediante la inmunización de los animales con el inmunógeno preparado a partir de las muestras de papilomas y de la histovacuna probiol. Los conejos para la inmunización (**Blanco Nuevazelandia**) se mantienen hasta la edad de seis meses; tiempo estimado conveniente para la inmunización, se utilizan estos por las facilidades en el manejo y por los buenos volúmenes de sangre que permiten obtener durante el periodo de producción de antisueros. La inmunización consistió en dos inyecciones intramusculares de las histovacunas **PROBIOL de carácter comercial** e **HISTOVAC** diluidas en cantidades de 10 mg en 0.3 ml de buffer fosfato de sodio con un pH fisiológico de 7.0.

La histovacuna comercial consta de extractos de papilomas + excipientes y preservantes (www.geocities.com/labprobiol/biovet2.htm.) la cual se somete a procesos de centrifugación a 2.000 g para precipitar los papilomas previamente macerados y tratados por los laboratorios Probiol. A continuación se procede a separar el precipitado y realizar análisis espectrofotométricos para las comparaciones en correlación con la vacuna histovac. Enseguida se procede a liofilizar los extractos en material apropiado para dicho caso; de esta manera obtenemos el inmunógeno listo para los procesos de inducción referentes a la vacuna comercial. Por su parte la histovacuna Histovac obtenida mediante protocolos de extracción (protocolo indicado anteriormente) de proteínas de tejido infectado por los papilomavirus se trabaja a partir del material anteriormente liofilizado.

Los dos inmunógenos se diluyen en 0.3 ml de PBS + 0.2 ml de adyuvante completo de Freund's para la inducción primaria e inducción secundaria de igual manera se prepara un placebo el cual consiste en la preparación de 0.3 ml de PBS + 0.2 ml de adyuvantes libres de inmunógeno los cuales se utilizan en el grupo **CONTROL**, para la comparación en relación a los bloques experimentales **PROBIOL e HISTOVAC**, bloques constituidos por diez conejos cada uno

Para la primera inducción en los tres bloques utiliza adyuvante completo de Freund's y para la segunda se utiliza adyuvante incompleto de Freund's, los cuales actúan como potenciadores de la respuesta inmune. Los animales son inmunizados en dos ocasiones (cada veintiún días) para obtener una adecuada producción de anticuerpos.

Para el protocolo de inmunización de los conejos blanco Nuevazelandia en cuanto a la producción de anticuerpos policlonales en animales de laboratorio (Marlies et al 2000) es recomendable un peso de 3kg y entre tres a seis meses de edad. Las condiciones de crianza, mantenimiento y saneamiento deben ser óptimas y adecuadas para todos los miembros de cada grupo con el objeto de obtener una respuesta inmune apropiada e igual en los bloques experimentales.

6.3.2.1. INMUNIZACION DEL CONEJO.

Para el procedimiento de inmunización del conejo se procede a tomar en jeringas desechables, con agujas de calibre 20 G la preparación del inmunógeno + adyuvantes + PBS preparados y mencionados anteriormente en una proporción de 0.5 ml los cuales se inducen en los conejos de acuerdo al bloque del experimento: para el grupo denominado control se induce un placebo descrito con antelación , de igual manera se procede con los grupos Probiol e Histovac a cuyos miembros se les induce los inmunógenos probiol e histovac respectiva en cada uno de los casos. La mezcla se emulsifica y se evitan las burbujas de aire.

Se inmoviliza el animal y se inicia la inducción primaria inyectando por vía intramuscular y procurando que los músculos del conejo no se encuentren extendidos, el área a ser inyectada se desinfecta con alcohol al 70%, se inserta la aguja aproximadamente 1 cm en el músculo del muslo de cada pierna posterior, inyectando 0.25 ml de emulsión dividida en cada músculo del muslo, para un conejo. Después de veintiún días se inicia la inmunización secundaria con 10 mg del antígeno emulsificado con adyuvante incompleto de Freund siguiendo las mismas recomendaciones anteriores.

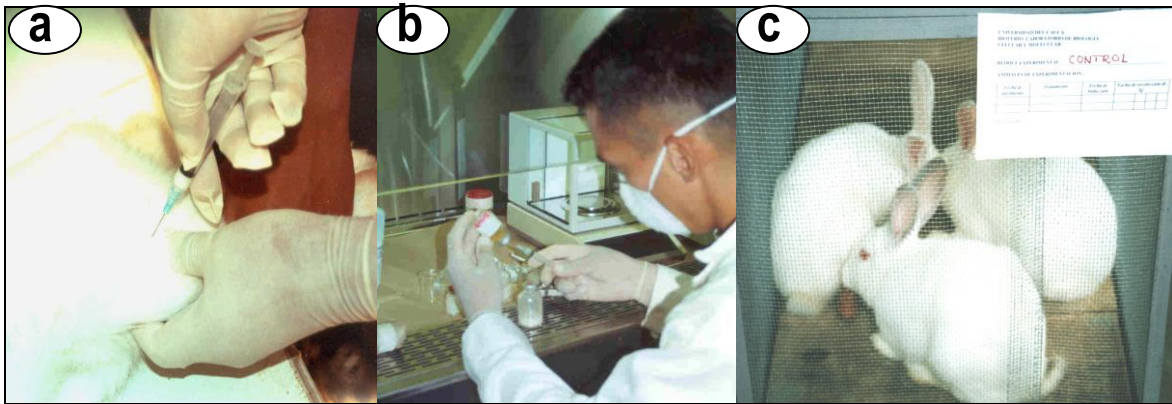


Figura 5. Inmunización intramuscular del inmunógeno (a). Preparación en condiciones asépticas (b) , población muestral a ser inducida (c)

Una vez terminado el proceso de inmunización y luego de las evaluaciones pertinentes que evidencian un título adecuado de anticuerpos presentes en el suero, (0.2235 mg/ml, de IgG) promedio para un ml de antisuero, se realiza un sangrado que consiste en obtener 5 ml, la cual es inmediatamente colectada en condiciones asépticas, en recipientes esterilizados.

6.3.2.2. PROCEDIMIENTO DE SANGRADO.

El procedimiento de sangrado de los conejos se realiza por la arteria medial de la oreja, ocho días después de la segunda estimulación para la obtención de la sangre 5ml aproximadamente

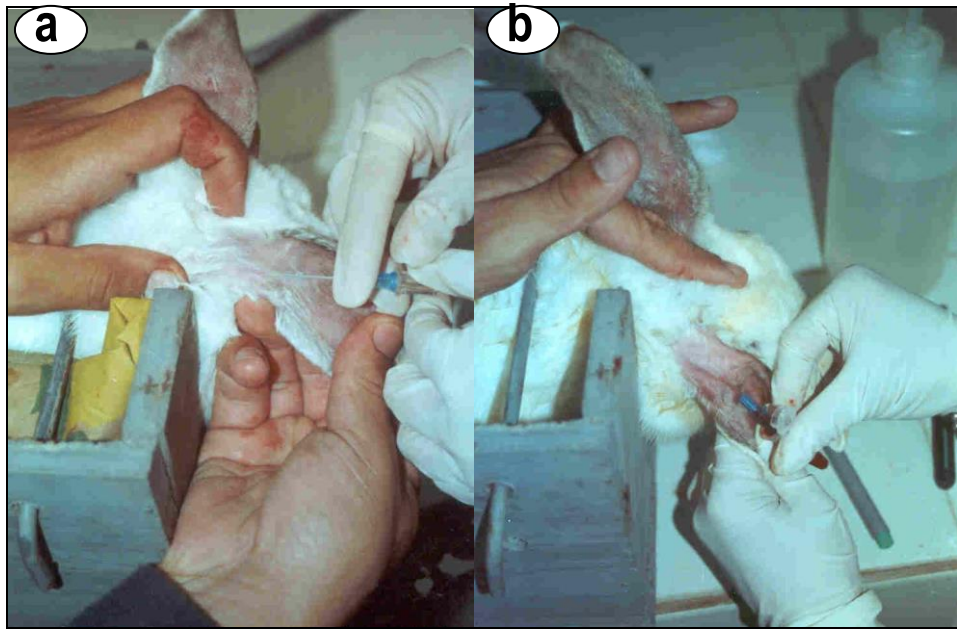


Figura 6. Procedimiento de extracción de muestras sanguíneas de la arteria medial de la oreja (a), recoleta de esta en tubos de ensayo (b).

Para el transcurso del sangrado de los animales se procede a mantener el conejo en completa calma en una jaula de sujeción y se permite que las orejas queden accesibles al proceso de sangrado. Con las técnicas mas adecuadas de desinfección se procede a realizar el protocolo de extracción sanguínea, con la aplicación de xilocaína 40%, como analgésico local preventivo al dolor. Los volúmenes de sangre se extraen de la arteria medial que corre abajo el centro de la superficie dorsal de la oreja, se coloca la aguja hipodérmica (yelco 20 G) en la arteria y se puntea en dirección de la base de la oreja; la aguja se inserta aproximadamente de 5 a 10 mm y se colecta la sangre para la centrifugación como indica el protocolo básico, el fluido se interrumpe con algodón y alcohol antiséptico, por ultimo se realiza un proceso de desinfección limpiando la oreja con alcohol y algodón. el conejo

debe estar reposado para permitir el retorno hematocrítico normal. El antisuero se prepara como se indica en la tercera etapa.

6.3.3. TERCERA ETAPA: FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA SANGUINEO EN SUEROS DE CONEJOS.

La sangre obtenida de los conejos se lleva al laboratorio y se deja reposar a 4 °C, luego se procede a separar el plasma por centrifugación (sobrenadante donde se encuentran las globulinas o anticuerpos) a 3500 x g durante 10 min. repitiendo este proceso por segunda vez a 4,000 x g en una **centrífuga de refrigeración IECB-22M** durante 10 minutos; en el precipitado permanecen los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. El plasma obtenido se separa para iniciar los procesos de fraccionamiento de anticuerpos presentes.

La purificación implica la eliminación de otras sustancias como el fibrinógeno y proteínas del complemento (por calentamiento al baño María a 56 °C por diez minutos). Dentro de los métodos de fraccionamiento se utilizó el método de precipitación salina con sulfato de amonio.

El método de purificación con sulfato de amonio, consiste en mezclar el plasma con una solución de sulfato de amonio y EDTA pH 8.0, con el fin de que las inmunoglobulinas

precipiten. De esta manera el precipitado se reconstituye con PBS y se dializa en el mismo PBS 0.1 M. Ver figura.

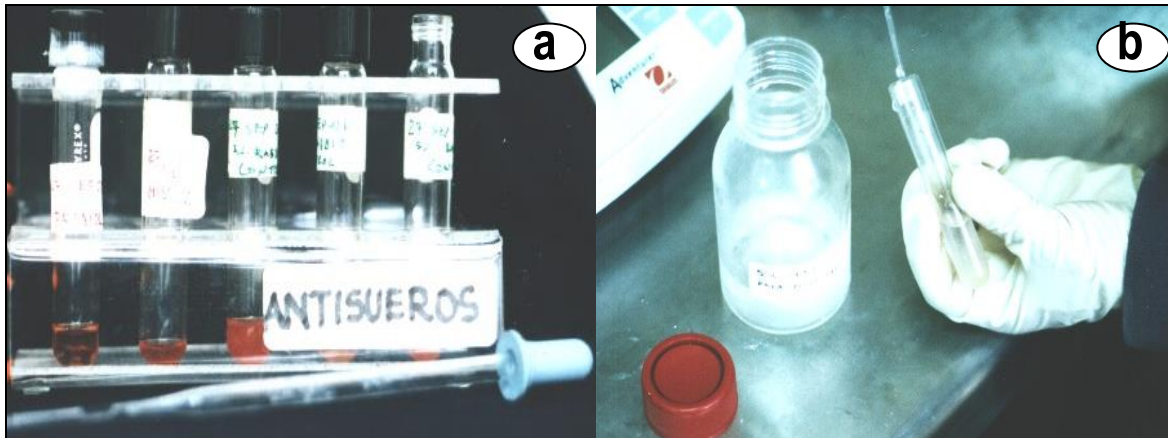


Figura 7. Método de purificación de inmunoglobulina G a partir de sangre obtenida de los conejos con sulfato de amonio saturado SAS y EDTA pH 8.0. La figura a, muestra los antisueros y la figura b, el proceso de extracción

Este proceso de precipitación con sulfato de amonio de las inmunoglobulinas del antisuero se lleva a cabo en condiciones apropiadas para una obtención conveniente de las fracciones. En principio se mide en una pipeta 1 ml de antisuero, se lleva a tubos previamente lavados con PBS, posteriormente se agrega $2/3$ del volumen de inicial (0.33 ml) de sulfato de amonio saturado, EDTA 2 mM, pH 8.0.

Esta solución se agrega gota a gota en agitación constante a 4 °C , se deja en agitación por 15 min. posteriormente se transfiere el resultado a tubos de centrifuga previamente lavados con 3 parte PBS por 2 de sulfato de amonio para centrifugar a 12,000 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante.

El precipitado se resuspende en PBS (0.5 ml) y se centrifuga a 12,000 g durante 10 min, se descarta el precipitado y el sobrenadante se colecta en una vaso y se lavan las paredes del beacker con PBS. Consecutivamente se adiciona 2/3 de un ml de sulfato de amonio saturado (SAS), en agitación constante, se agitó en frío durante 15 minutos, la suspensión se transfiere a tubos de centrifuga y se lava el beacker con PBS/sulfato de amonio, en proporción 3:2, para centrifugar a 12,000 g durante 10 min. se descarta el sobrenadante.

El precipitado se resuspende en 0.25 ml de PBS. y se dializa contra el mismo, con tres cambios de la solución cada seis horas, se enjuaga la bolsa de diálisis y se determina la existencia de inmunoglobulina G extrayendo una alícuota y midiendo la absorción a 280 nm. En un **espectrofotómetro ultravioleta y visible UV- vis Spectronic Genesis 5**.

La figura 8, a continuación muestra imágenes de los procesos llevados a cabo en la extracción de inmunoglobulina, así como la diálisis de estas en buffer fosfato de sodio (PBS) 0.1 M, las correspondientes lecturas espectrofotométricas y su posterior liofilización

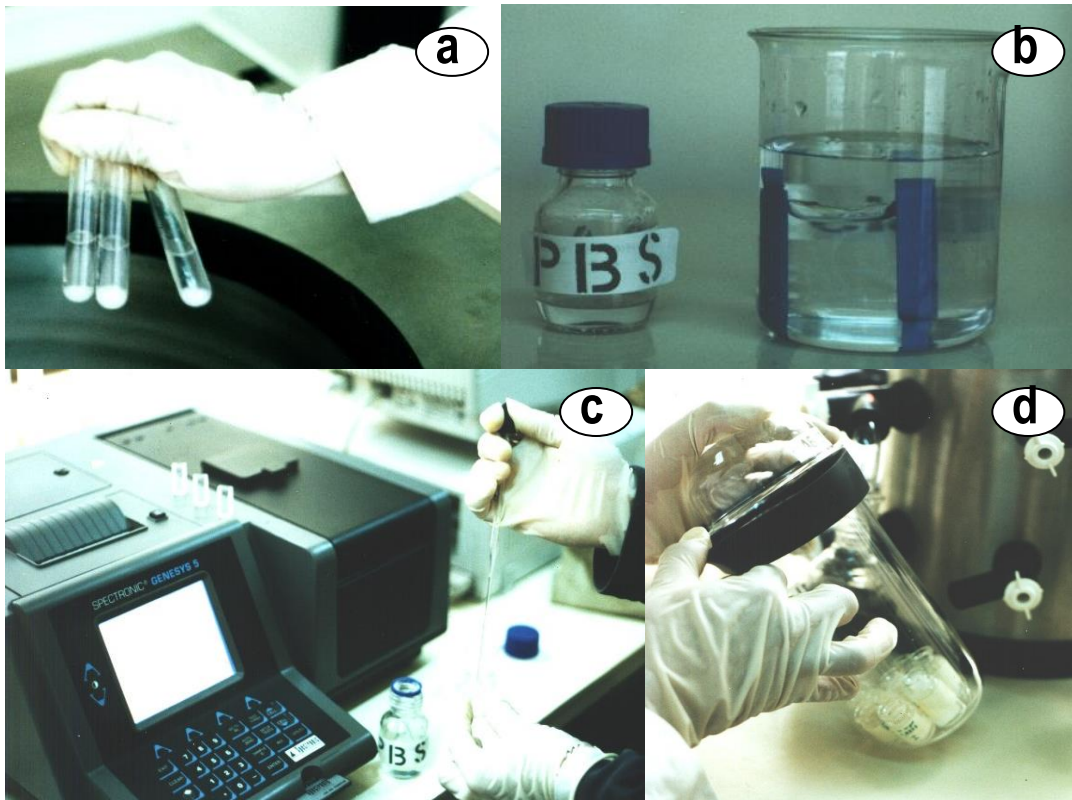
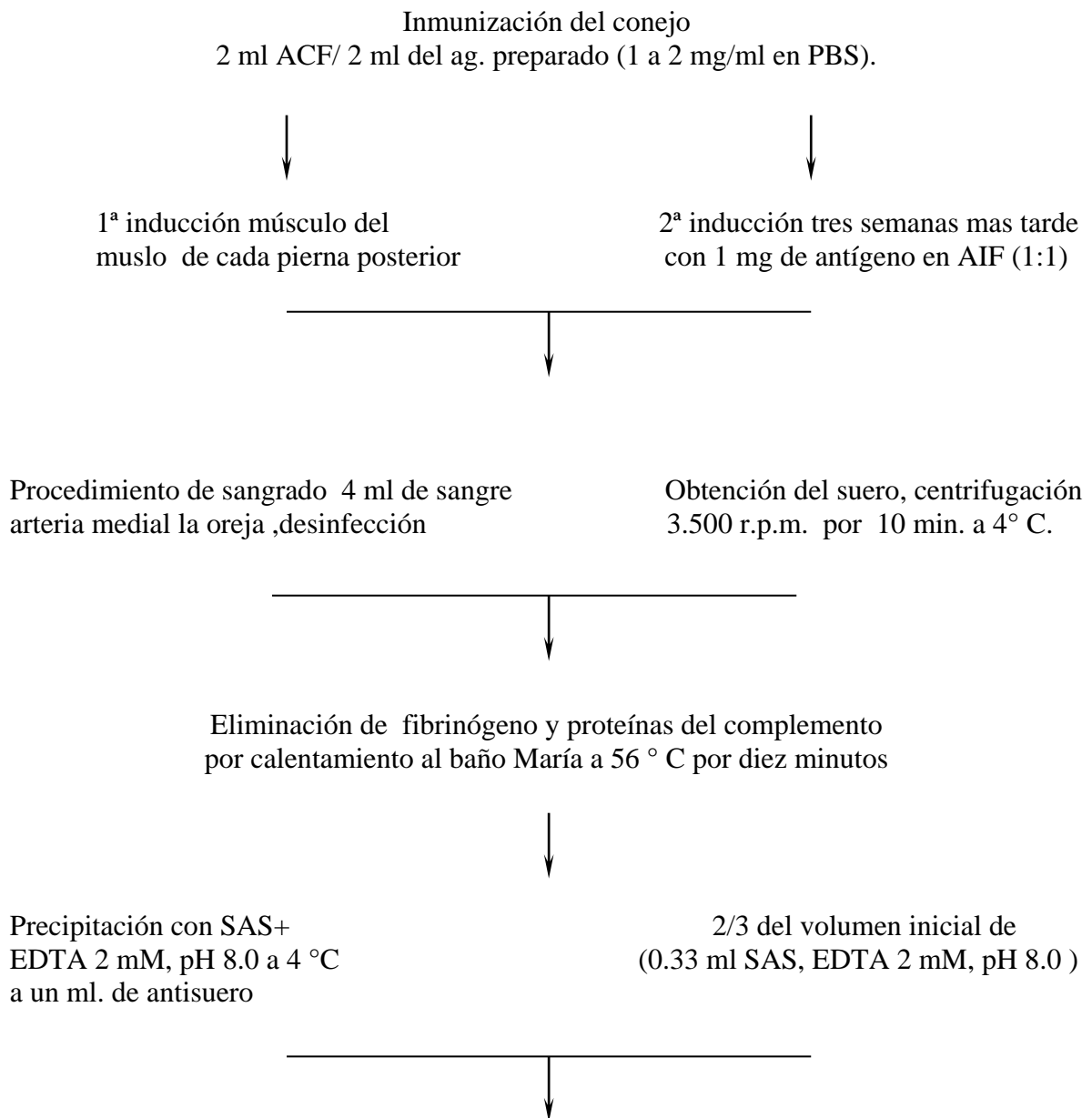


Figura 8. Extracción de inmunoglobulinas por precipitación salina con SAS y EDTA (a) y su posterior diálisis en PBS buffer fosfato de sodio, 0.1 M. (b). Comprobación espectrofotométrica (c) y liofilización (d).

Por último el resultado final de las inmunoglobulinas se pasa al liofilizador **Freezer Dryer 4.5 Labconco**, para el posterior análisis electroforético de las fracciones de IgG obtenidas, esta técnica se realizó en una **cámara electroforética para minigeles IEC120**.

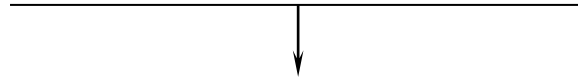
La interpretación de los geles de SDS se hace de forma directa, mediante la comparación de un patrón de bandas características que está conformada por una curva estándar de pesos moleculares, con una variación entre los 10 y 200 (ver análisis y resultados) Kd y los datos de movilidad relativa de los electroferogramas de las muestras de histovacunas e

inmunoglobulinas. Se hace una relación directa entre la movilidad relativa de la muestras y se compara con la curva estándar, con base en su movilidad relativa y extrapolada en la curva patrón. A continuación se presenta un diagrama de flujo resumiendo los procesos, desde la obtención del inmunógeno hasta la liofilización para su posterior electroforesis.



Agitación constante A 4 °C (15 min)

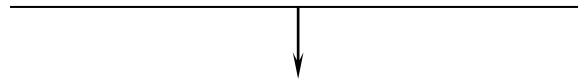
Lavar beacker con PBS 0.1 M



Centrifugar a 12,000 x g (10 min)

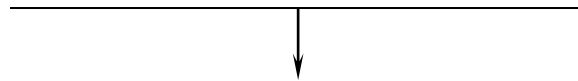
SAS)

Sobrenadante + (2/3 de un ml



Agitación constante A 4 °C (15 min)

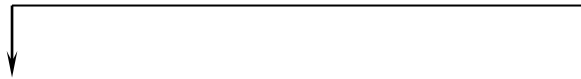
Lavar beacker con PBS/SAS (3:2)



Centrifugar a 12,000 x g durante 10 min.
Resuspensión del precipitado (0.25 ml PBS.)



Diálisis contra PBS,
Tres cambios cada seis horas



Medida de ABS a 280 nm.

Liofilización Para
Electroforesis

6.4. METODO DE BRADFORD.

El método de Bradford se realiza para una comparación análoga al análisis estadístico, para dicho propósito se realiza la extracción de IgG a un ml de sangre con los mismos procesos y técnicas de extracción mencionados anteriormente.

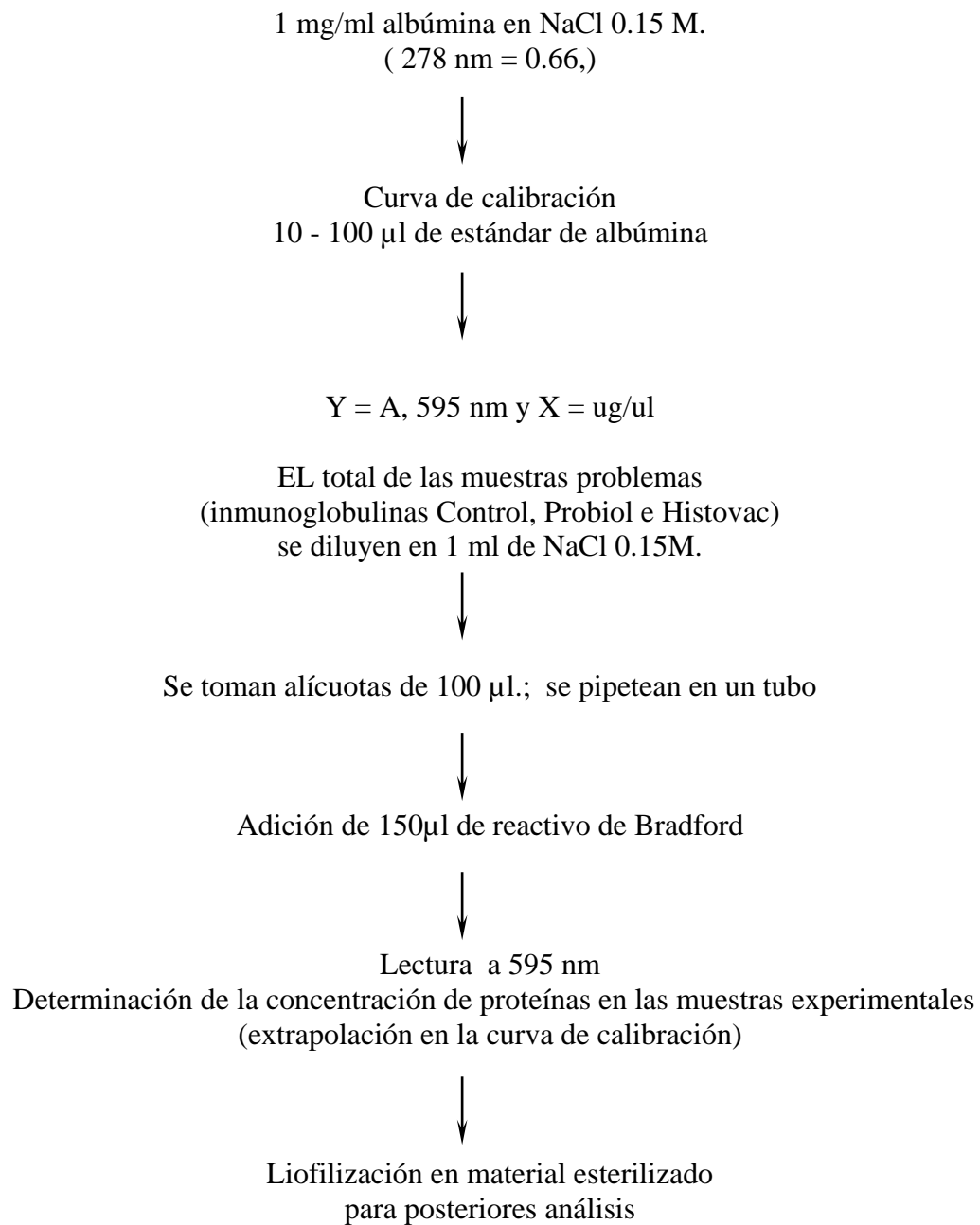
En principio se preparó una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg disueltos en 10 ml de NaCl 0.15 M, la concentración de albúmina en la solución se comprueba con un análisis espectrofotométrico a 278 nm, en el espectro UV-vis; donde la absorbancia a esta longitud de onda, debe ser de 0.66, si este dato no se obtiene es necesario ajustar la concentración

Las soluciones conteniendo de 10 a 100 μ l de estándar de albúmina, se pipetearon en tubos de 12 x 100 mm y en un volumen de 0.1 ml. El volumen en el tubo de prueba también se ajusta a 0.1 ml con solución de NaCl 0.15 M. Se le agregan 1.5 ml de reactivo, el cual se prepara disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1 litro.

Se dibujó una gráfica patrón de proteínas, donde los ejes son comúnmente denominados como $Y = A$, 595 nm y $X = \mu\text{g}/\mu\text{l}$, para determinar la concentración se utiliza la curva de proteínas en las muestras experimentales.

El total de las soluciones problemas de inmunoglobulinas Control, Probiol e Histovac se diluyen en 1 ml de NaCl 0.15M. de las cuales se toman alícuotas de 100 μl .; se pipetea en un tubo y se les agregan 150 μl de reactivo, enseguida se lee a una longitud de onda de 595 nm. Posteriormente Se prepara un blanco o muestra patrona que contenga 0.1 ml de NaCl 0.15 M más 150 μl de reactivo. La absorbancia resultante del problema se interpola a la curva patrón y se extrapola de esta al eje de las X para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra

El siguiente diagrama de flujo corresponde al protocolo de Bradford para la cuantificación de proteínas por espectrofotometría ultravioleta.



6.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para el diseño experimental se utilizó el análisis de varianza, considerando que la variancia total del conjunto de datos se divide en varios componentes y cada uno de ellos se asocia a una fuente específica de variación de manera que mediante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total (Shefler, 1981). Para analizar los experimentos se utilizó el diseño de bloques aleatorios simples y por análisis de varianza se discute el resultado de las diferentes pruebas; para este diseño se tiene en cuenta el siguiente formato:

Modelo: Se hace una representación simbólica de valores típicos tomados de los datos que se están analizando; datos en cantidad de inmunoglobulina G, por métodos de extracción, determinación espectrofotometría y electroforética.

Suposiciones: Se pretende comprobar la eficacia de las histovacunas probiol y/o histovac y que brinde la mejor inducción de respuesta en el modelo a experimentar. Para el presente caso lo que se proyecta es determinar la calidad de la histovacuna producida en la Universidad del Cauca (Histovacuna Histovac), y compararla con la histovacuna comercial Probiol.

Hipótesis: Las que pueden probarse bajo el modelo. La hipótesis nula determina que los tratamientos sean iguales en representación de la respuesta que promuevan, de acuerdo al promedio de inmunoglobulina obtenido por tratamiento. Por su parte la hipótesis alternativa se define como la representación de las medias de los dos tratamientos. De acuerdo a los análisis expuestos en la tabla de anova (tabla 5), donde los datos enseñan una significancia concreta (0.000; altamente significativa, se toma la decisión estadística, para el rechazo o no de las hipótesis (Shefler, 1981). De esta manera según los datos y los análisis estadísticos se determina por comparaciones *a priori* y *a posteriori* (si el anova sea significativo), tabla 6 y tabla 7 respectivamente; las cuales constituyen comparaciones de los tratamientos y establecen diferencias notables entre los mismos. De esta manera se asume un contraste suficiente entre los tres tratamientos: **CONTROL, PROBIOL, HISTOVAC**, especialmente los dos últimos, los cuales ilustran una diferencia significativa y concluyente para el análisis de Probiol respecto a Histovac.

El diseño en bloques aleatorios simples es un diseño en el cual las unidades (unidades experimentales) a las cuales se les aplican los tratamientos, se reparten en grupos homogéneos, llamados bloques, entonces se asignan los tratamientos a las unidades dentro de cada bloque. Cada tratamiento aparece en todos los bloques. El objetivo es aislar y eliminar el término de error en la variación atribuible a los bloques, a la vez que se adquiere la seguridad de que las medias de los tratamientos son independientes de los efectos de bloque. La efectividad del diseño depende de la habilidad de lograr bloques homogéneos de unidades experimentales, hecho que se logra con un adecuado control del grupo, respecto a su peso corporal, raza , descendencia de la camada, la edad, así como su desarrollo y mantenimiento, similar para todos los individuos del grupo, con el objeto de

que el grupo control no responda de manera diferente al mismo tratamiento. (Shefler, 1981)

6.5.1. ANALISIS DE VARIANZA.

El análisis de varianza se inicia con el grupo de conejos tratados con las histovacunas a prueba, los datos se presentan la tabla 3; el conjunto de datos clasificados de acuerdo a la efectividad examinada. Se hace investigando la hipótesis, para ver en que casos existe alguna diferencia entre las observaciones de los diferentes grupos. Mediante este análisis se pretende determinar si existe una diferencia global entre las mediciones de las cantidades de anticuerpos producidos y una diferencia entre tratamientos. La variancia de los individuos se calcula, entonces como la diferencia entre estas medidas individuales y el error de la variancia queda determinado por la dispersión de los valores que arrojan las diferentes tomas muestrales, respecto de cada una de las medias respectivas.

5.5.2. TRATAMIENTOS.

Los tratamientos para la inmunización se indican la siguiente tabla (tabla 2), los caules están determinados por un grupo control y las dos histovacunas, Probiol - Histovac.

CONTROL	PROBIOL	HISTOVAC
CONEJOS BLANCOS NEWZELAND		
Inducción de un placebo PBS + adyuvante completo y/o incompleto de Freunds(según el caso)	HISTOVACUNA CONTRA LA PAPILOMATOSIS BOVINA Para la prevención y el tratamiento de los papilomas o Verrugas de los Bovinos	HISTOVACUNA elaborada con proteínas de muestras de papilomas desqueratinizados

Tabla 2. Tratamientos inducidos en la muestra poblacional previamente aleatorizada (conejos blancos Nuevazelandia)

5.5.3. ESTADISTICA DESCRIPTIVA, ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA .

Con una distribución previa y aleatoria de los grupos en sus respectivos bloques (3 bloques de 10 individuos c/u), los cuales representan 30 celdas y 30 observaciones, tabla 3 (donde no hay mas de una observación por cada celda) se toman en cuenta los datos arrojados en cada caso y posteriormente se siguen aplicando los cálculos para los siguientes análisis de acuerdo al ANOVA.

En la tabla 3 se muestran los resultados experimentales obtenidos a partir de la titulación de anticuerpos (IgG) por técnicas de extracción con sulfato de amonio y EDTA **para un ml de antisuero**, los datos en peso seco se presentan en mg/ml.

De forma comparativa, como se muestra en la página 70 se realizan análisis de cuantificación espectrofotométrica de las inmunoglobulinas purificadas por diálisis contra PBS 0.1 M por la técnica de Bradford. A continuación se muestran los datos estadísticos obtenidos mediante la extracción de IgG con SAS.

CONTROL (mg/ml)	PROBIOL (mg/ml)	HISTOVAC (mg/ml)
0,0811	0,1701	0,2972
0,0911	0,1311	0,2562
0,0905	0,1338	0,2980
0,0896	0,1508	0,2732
0,0902	0,1216	0,2630
0,0804	0,1405	0,2682
0,0908	0,1604	0,2899
0,0892	0,1632	0,2905
0,0813	0,1472	0,2987
0,0813	0,1625	0,3000

Tabla 3. Resultado de las inmunoglobulinas (mg/ml) de suero sanguíneo en los tratamientos

5.5.4. DATOS ESTADISTICOS OBTENIDOS MEDIANTE EL MUESTREO.

	TRATAMIENTOS (Intervalo de confianza del 95%)		
	CONTROL	PROBIOL	HISTOVAC
Error estándar	2.09 10⁻³	5.09 10⁻³	2.09 10⁻³
Media	8.73 10⁻²	0.148120	0.283490
Limite mas bajo	8.26 10⁻²	0.136605	0.271575
Limite mas alto	9.20 10⁻²	0.159636	0.295405
Mediana	8.97 10⁻²	0.14900	0.290200
Varianza	4.36 10⁻⁵	2.59 10⁻²	2.774 10⁻⁴
Desviación estándar	6.61 10⁻³	1.61 10⁻²	1.67 10⁻²
Valor mínimo	0.0789	0.1216	0.2562
Valor máximo	0.0996	0.1701	0.3000
Rango	0.0207	0.0485	0.0438
Rango entre cuadrados	9.95 10⁻³	2.96 10⁻²	3.15 10⁻²

Tabla 4 . Estadística descriptiva de datos de las inmunoglobulinas obtenidas en mg/ml

5.5.5. TABLA DE ANOVA.

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Frecuencia (F)	Significancia
IgG	Entre grupos	0.202	2	0.101	521.432	0.000
	Dentro de grupos	$5.22 \cdot 10^{-3}$	27	$1.934 \cdot 10^{-4}$		
	Total	0.207	29			

Tabla 5. Análisis de varianza de una vía, datos estadísticos para inmunoglobulinas

5.5.6. COMPARACIONES MÚLTIPLES A *PRIORI* (VARIABLE DEPENDIENTE, IgG)

Tratamientos (I)	Tratamientos (J)	Diferencia promedio (I-J)	Error estándar	Significancia	Intervalo de confianza (95%)	
					Limite mas bajo	Limite mas alto
CONTROL	Probiol Histovac	-6.08 10 ⁻²	0.006	0.000	-7.6 10 ⁻²	-4.6 10 ⁻²
		-0.196180	0.006	0.000	-0.211928	-0.180432
PROBIOL	Control Histovac	6.081 10 ⁻³	0.006	0.000	4.56 10 ⁻²	7.61 10 ⁻²
		-0.135370	0.006	0.000	-0.154645	-0.116095
HISTOVAC	Control Probiol	0.1961810	0.006	0.000	0.180432	0.211928
		0.1353700	0.006	0.000	0.116095	0.154645

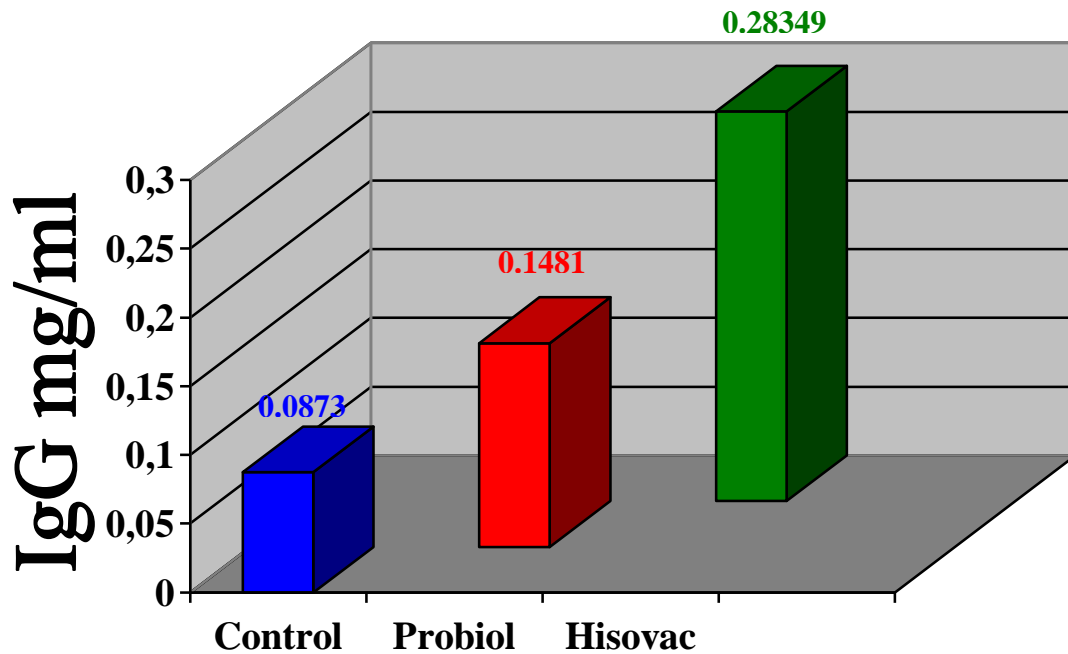
Tabla 6. Comparaciones múltiples de los tratamientos Control Probiol e Histovac. Estas comparaciones muestran un alto grado de significancia para todos los tratamientos (significancia con un intervalo de confianza del 95%= 0.000)

7.3.5. COMPARACIONES A POSTERIORI.

TRATAMIENTOS	N	Subset for alpha = 0.5		
		1	2	3
Duncan Control Probiol Histovac	10 10 10	<u>8.7 10⁻²</u>	<u>0.148120</u>	<u>0.283490</u>
Scheffe Control Probiol Histovac	10 10 10	<u>8.73 10⁻²</u>	<u>0.148120</u>	<u>0.283490</u>

Tabla 7. Comparaciones múltiples o *a posteriori* , los tratamientos muestran diferencia en las columnas 1, 2 y 3, para el análisis de Duncan y Scheffe; cada valor no está equivalente al siguiente para los dos casos

5.5.9. GRAFICA PROMEDIO DE INMUNOGLOBULINA G EN LOS TRATAMIENTOS.



Tratamientos

Figura 9. Promedio de concentración de IgG de los tratamientos en cuanto a cantidad de inmunoglobulinas por mililitro de suero datos en mg/ml

6.6. COMPARACION DE LA CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE PROTEINAS.

Este protocolo de extracción de proteínas se hace de forma paralela al análisis estadístico por medio del cual se comparan los datos descriptivos con análisis espectrofotométricos; al elaborar los procesos de cuantificación, tabla 11 y por comparación de resultados obtenidos en el análisis de varianza *versus* cuantificación de IgG se define una similitud de los tratamientos (ver graficas 1 y 3).

El procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas, está basado en el método diseñado por Bradford. Las proteínas tienen una capacidad de absorción máxima de 465 eso cambia a 595 nm cuando el colorante azul de coomasie esta unido a las proteínas, este es el principio básico para la determinación de proteínas. La modificación ocasiona un incremento en la concentración del colorante, desarrollando una mayor sensibilidad (Bradford, 1976).

6.6.1. CURVA DE REFERENCIA O CALIBRACION CON ALBUMINA BOVINA.

Variable Independiente	Variable dependiente	Determinante	Significancia	Intercepto en X	Pendiente
Concentración	ABS	96%	0.000	0.2237	0.0085

Tabla 8. Datos de la curva de referencia.

A, 595 nm	0.335	0.401	0.471	0.548	0.628	0.718	0.808	0.903	0.993	1.091
µg/µl	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Tabla 9. Datos de tabla para la grafica. los datos de la fila superior representan la ABS a 595 nm y los datos de la fila inferior representan la concentración de albúmina bovina

6.6.2. PASOS PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS, TECNICA DE BRADFORD.

1° BSA (1 mg/mL) µl	2° Agua desionizada + NaCl 0.15M µl	2° Reactivo de Bradford µl
10	90	150
20	80	150
30	70	150
40	60	150
50	50	150
60	40	150
70	30	150
80	20	150
90	10	150
100	00	150

Tabla 10. Relación de reactivo Bradford , solución de NaCl 0.15M. y la dilución Protéica de inmunoglobulina G

6.6.3. VALORES EFECTIVOS, TECNICA DE BRADFORD PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

CONTROL		PROBIOL		HISTOVAC	
Alícuota de muestra problema ABS 595. nm	<i>Resultado extrapolado IgG ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>	Alícuota de muestra problema ABS. 595 nm	<i>Resultado extrapolado IgG ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>	Alícuota de muestra problema ABS. 595 nm	<i>Resultado extrapolado IgG ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>
0.479	30.0352	0.674	52.9764	0.674	71.3294
0.510	33.6823	0.701	56.1529	0.701	74.8588
0.601	45.4470	0.650	50.1529	0.650	73.8000
0.630	47.8000	0.808	68.7411	0.808	80.9764
0.537	36.8588	0.752	62.1529	0.752	78.3882
0.583	42.2705	0.815	69.5647	0.815	87.9176
0.678	54.4470	0.682	53.9176	0.682	67.9176
0.621	46.7411	0.632	48.0352	0.632	74.8588
0.632	48.0352	0.754	62.3882	0.754	70.0941
0.595	43.6823	0.809	68.8588	0.809	86.8588

Tabla 11. Extrapolación de la dilución de las inmunoglobulinas (alícuotas de 100 μl de las muestras problemas) en correlación con la curva patrón; los datos se representan en la figura

7.4.4. RELACION DE ABSORBANCIA VERSUS CONCENTRACIÓN: ALBÚMINA BOVINA , MUESTRAS (CONTROL, PROBIOL Y HISTOVAC)

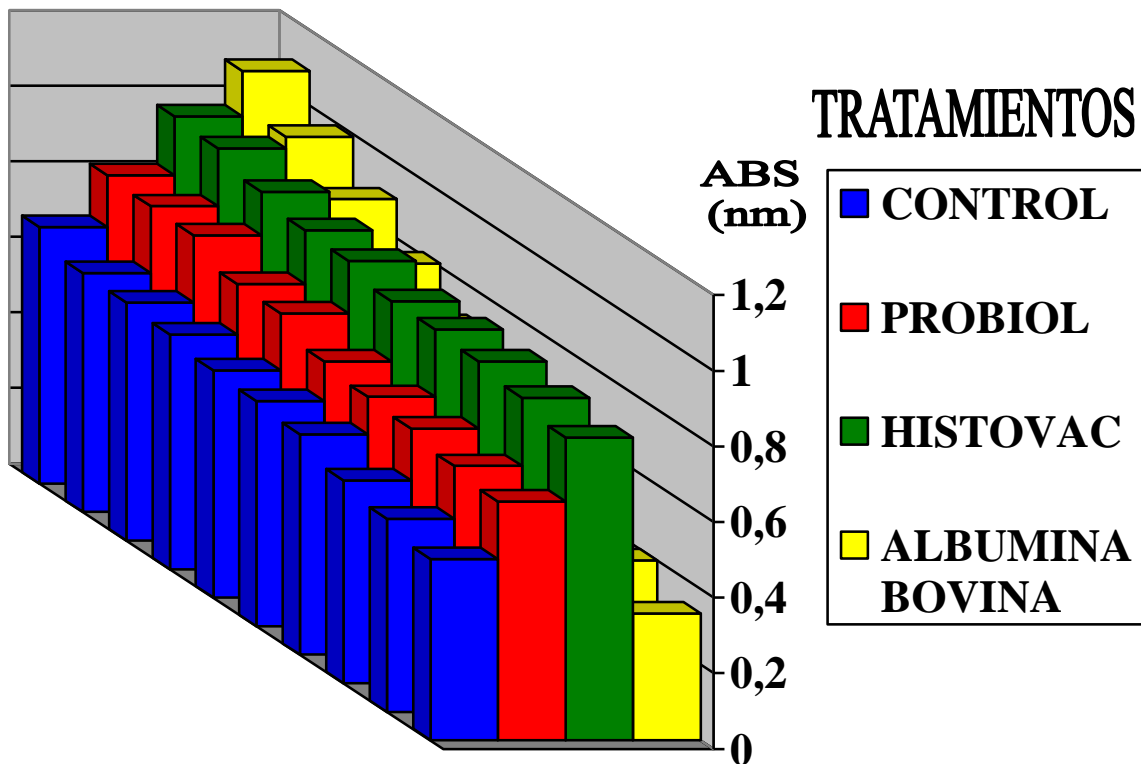
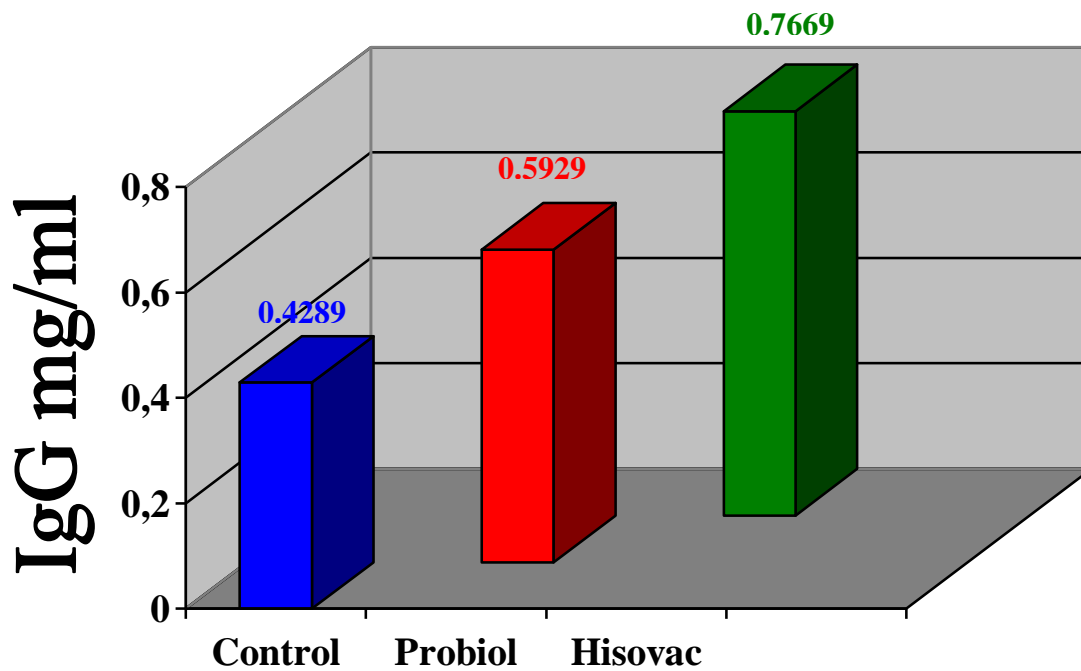


Figura 10. Relación de absorbancia versus concentración: albúmina bovina, muestras (control probiol y histovac). Curva de calibración ABS v/s concentración para la albúmina bovina (amarillo), muestras: control, probiol y histovac (azul, rojo y verde respectivamente), datos en µg/µl

6.6.5. PROMEDIO DE DATOS DE IgG POR EL METODO DE BRADFORD



Tratamientos ABS a 595 nm

Figura 11. Muestras de inmunoglobulinas por el método de Bradford, lectura a 595 nm de los tres tratamientos; Control (azul), Probiol(rojo), Histovac(verde);el promedio de IgG detectadas por espectrofotometría ultravioleta y visible es similar al resultado del análisis estadístico.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Las histovacunas contra la papilomatosis bovina son el tratamiento mas esperanzador a corto plazo para la erradicación y el control sanitario del ganado bovino en relación a la enfermedad. En principio las histovacunas se desarrollan para potenciar las respuestas inmunes contra tumores existentes, a diferencia de los diversos tratamientos, ya sea, de carácter médico o empíricos, como la escisiones, tratamientos con radiación, tradicionales, etc., las histovacunas presentan una mínima toxicidad y potencialmente son muy eficaces. Por este motivo se adoptan como terapias al ganado con la enfermedad local y con elevado riesgo de recurrencia.

La inmunoterapia incluye técnicas que potencian la respuesta inmune natural frente a tumores por medio de modificadores de la respuesta biológica, las observaciones de una rápida desaparición de metástasis diseminadas, bien sea de forma espontánea o mas frecuentemente después de tratamientos paliativos, los cuales se han atribuido a una respuesta inmunológica intensa. También se interpretan como una prueba de la eficacia de la respuesta inmune del huésped. Estos ejemplos ilustran la capacidad del sistema inmune para detener o incluso inactivar los diversos antígenos correspondientes a células tumorales inducidas en condiciones adecuadas. La clave para obtener respuestas inmunes predecibles y significativas en los individuos con lesiones, está en una mayor comprensión

de los fenómenos de inmunidad frente a antígenos tumorales representados por células en afección con el papilomavirus.

Las vacunas probiol e histovac se prepararon a partir de procesado de varias escisiones de las zonas verrugosas y de un macerado de este tejido infectado (papilomas). Con la mezcla de diferentes tejidos afectados por papilomas se intenta que alguno de los antígenos expresado sea compartido por las células tumorales del ganado afectado.

Una de las ventajas de estas vacunas es que no son necesarias la obtención de células tumorales de un solo individuo con la enfermedad. Al emplearse varios tejidos, se tiene antígenos relevantes para el tratamiento del tumor del sujeto afectado y para acentuar la respuesta inmune en relación a la escogencia de los diferentes tumores en la preparación de las histovacunas; el principio básico de histovac consiste en evitar que la respuesta inmune se dirija contra antígenos irrelevantes, no presentes en el tumor del organismo para dicho propósito se ha empleado en la producción de la histovacuna células en mayor afección al eccema con el objetivo de evitar diferencias cualitativas entre lotes así como la eficacia de estos en cuanto a la inmunoterapia en el grupo de experimentación. Otra ventaja de esta vacuna es la recurrencia de una menor manipulación *in vitro* que la que se necesita en otro tipo de vacunas. Tras obtener células del ganado afectado, estas se procesan y se reinyectan con adyuvante, ya sea de hidróxido de aluminio o los adyuvantes de Freund's, las partículas celulares están inactivadas por daño letal de los ácidos nucleicos y por inactivación de sus proteínas, de esta forma se reduce la patogenicidad (atenuación) impidiendo su propagación.

Las partículas celulares de la histovacuna se asemejan con las células tumorales del papiloma en extracción; las respuestas inmunológicas letales contra las células de la vacuna tienen mayor probabilidad de ser letales para las células del tumor. Respecto a la histovacuna comercial no se tienen referencias el procedimiento para su obtención. La histovacuna (Histovac) desarrollada en el laboratorio de Biología Celular y Molecular durante este trabajo se preparó teniendo en cuenta los procedimientos adecuados para la presentación de productos biológicos. Si se considera el producto comercial, este tiene algunas dificultades de manejo puesto que es una solución de tejido infectado macerado, el cual se debe mantener bajo refrigeración (4-10°C). Debido al proceso de liofilización la vacuna histovac se puede mantener en un intervalo mas amplio de temperaturas, sin importar las variantes de humedad, temperatura. etc.

Los electroferogramas comparativos de las dos histovacunas muestran la diferencia en la obtención de proteínas para con histovac. En probiol se observan 8 bandas con pesos moleculares aparentes que varían entre 25 y 68Kd (Figuras 3 y 11). No se conocen los adyuvantes y coadyuvantes de la histovacunas ni tampoco el pH. A su vez el proceso de maceramiento de proteínas para la obtención de la vacuna (probiol) de las muestras de papilomas no es selectivo y por lo tanto la respuesta inmune a esta preparación es multivalente. Energéticamente y a nivel de respuesta es contraproducente ya que el bovino requiere de un amplio proceso de síntesis de inmunoglobulinas y un gasto energético considerable.

A diferencia de la histovacuna comercial, histovac únicamente muestra 2 bandas en el gel discontinuo de poliacrilamida SDS-PAGE (11%). Esta diferencia se explica debido al

proceso selectivo de aislamiento de proteínas en una solución de citrato salino (SSC) 0.1M. Los pesos moleculares aparentes de las proteínas de este gel corresponden a 47 y 51Kd. Aunque los resultados de este trabajo no permiten afirmar a qué tipo de proteínas corresponden, los valores reportados por (Larsen, 1987) para proteínas presentes en partículas de BPV son de 54 y 69 kd. Según este autor estas proteínas pertenecen a las proteínas L1 de la cápside viral, correspondientes a proteínas mayores de la cápside, proteínas estructurales que forman partículas virales.

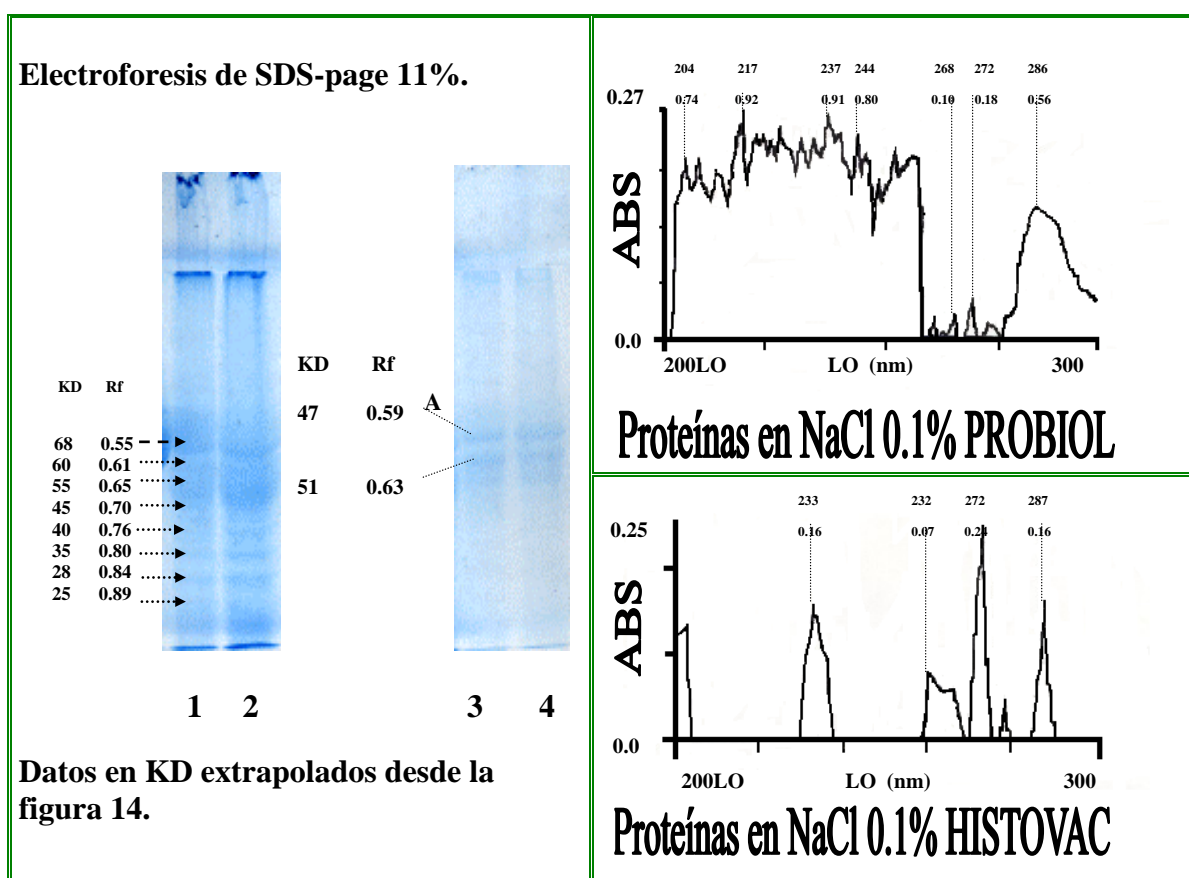


Figura 12. Electroforesis de SDS-page 11% de Histovacunas Probiol carriles 1 y 2 con un indeterminado numero de bandas y Histovac, carriles 3 y 4 el cual presenta dos bandas. Figura a, espectro UV-vis. de muestras protéicas en NaCl con numeroso picos de absorción correspondientes a 1 y 2 ; figura b, UV vis. de 3 y 4, se observan definidos cuatro picos de absorbancia.

Es importante anotar que en las muestras de Histovac; diferente a las de Probiol, se observan picos correspondientes a DNA (260 nm), lo cual indica la posible presencia de presencia de ácidos nucleicos, los cuales pueden provenir del DNA genómico, mitocondrial y viral. Para resolver esta pregunta se hace necesario preparar geles de agarosa para discriminar las bandas de DNA y RNA. En la preparación de Histovac realizada en el laboratorio y analizada espectrofotométricamente se observan máximos de absorción de 260 y 280 nm correspondientes a la presencia de DNA y RNA, como se muestra en los espectros de la figura anterior

La presencia de ácidos nucleicos evidenciada por el espectrofotómetro perfectamente podría indicar la presencia de un DNA de origen viral además del genómico y mitocondrial. La evidencia de este DNA podría influir en la respuesta inmune de manera significativa e inmediata, considerando que la extracción de proteínas realizada en la elaboración de histovac se realiza directamente desde la capa basal, donde se encuentra la verruga. La respuesta inmune puede dirigirse particularmente a la presencia de un DNA extraño en el huésped utilizado para producir las inmunoglobulinas. Esta deducción se sustenta por las referencias bibliográficas sobre la elaboración de vacunas utilizando DNA atenuado para generar una respuesta inmune específica.

El diseño estadístico se dirigió a la evaluación de la producción de anticuerpos, comparando la histovacuna comercial (probiol) e (histovac) encontrándose que la segunda histovacuna presenta una respuesta inmune mayor que la vacuna comercial. Estas evidencias se confirman mediante la utilización de un protocolo igual de extracción y caracterización de inmunoglobulinas G para los tres bloques experimentales. (Figura 9)

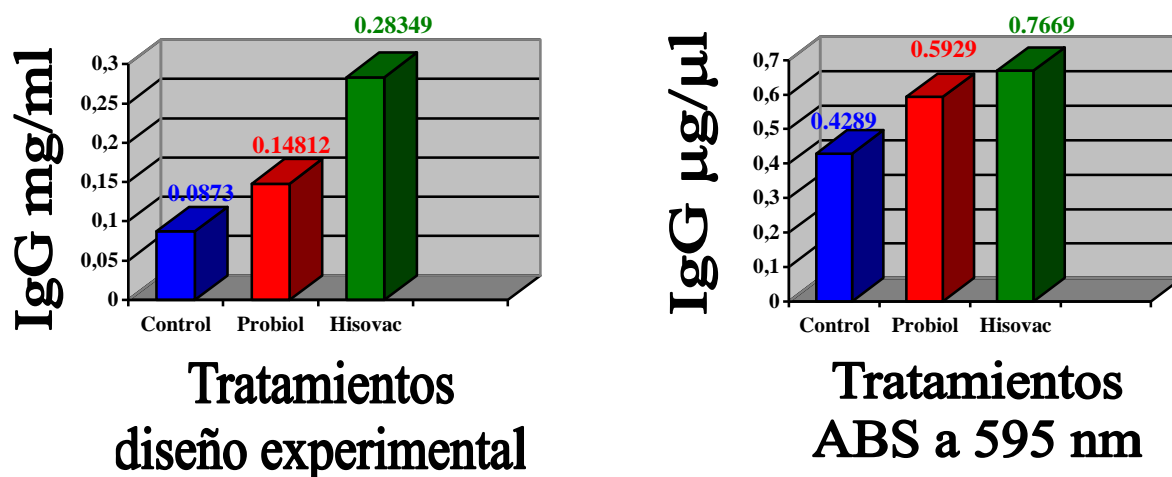


Figura 13. Promedio de concentración de IgG de los tratamientos en cuanto a la cantidad de inmunoglobulinas obtenidas por mililitro de suero datos en mg/ml. La figura (a) representa los tratamientos sometidos al diseño experimental y la figura (b) indica los tratamientos sometidos al método de Bradford.

En los dos casos se demuestra un aumento progresivo del promedio de inmunoglobulina G , específicamente para PROBIO e HISTOVAC.

La cuantificación realizada por el método de (Bradford, 1974) corrobora estos resultados, los cuales se verifican mediante la técnica electroforética; la figura 12 enseña datos progresivos y similares para el análisis estadístico y el análisis espectrofotométrico con la técnica de Bradford, en los dos casos se demuestra un aumento progresivo del promedio de inmunoglobulina G, específicamente para PROBIOL e HISTOVAC. Los geles presentan una banda bien definida correspondiente a la cadena pesada de la inmunoglobulina de peso molecular 50Kd, calculada mediante una curva de calibración con estándares cuyos pesos moleculares oscilan entre 20 y 200Kd. (Figuras 11 y 12).

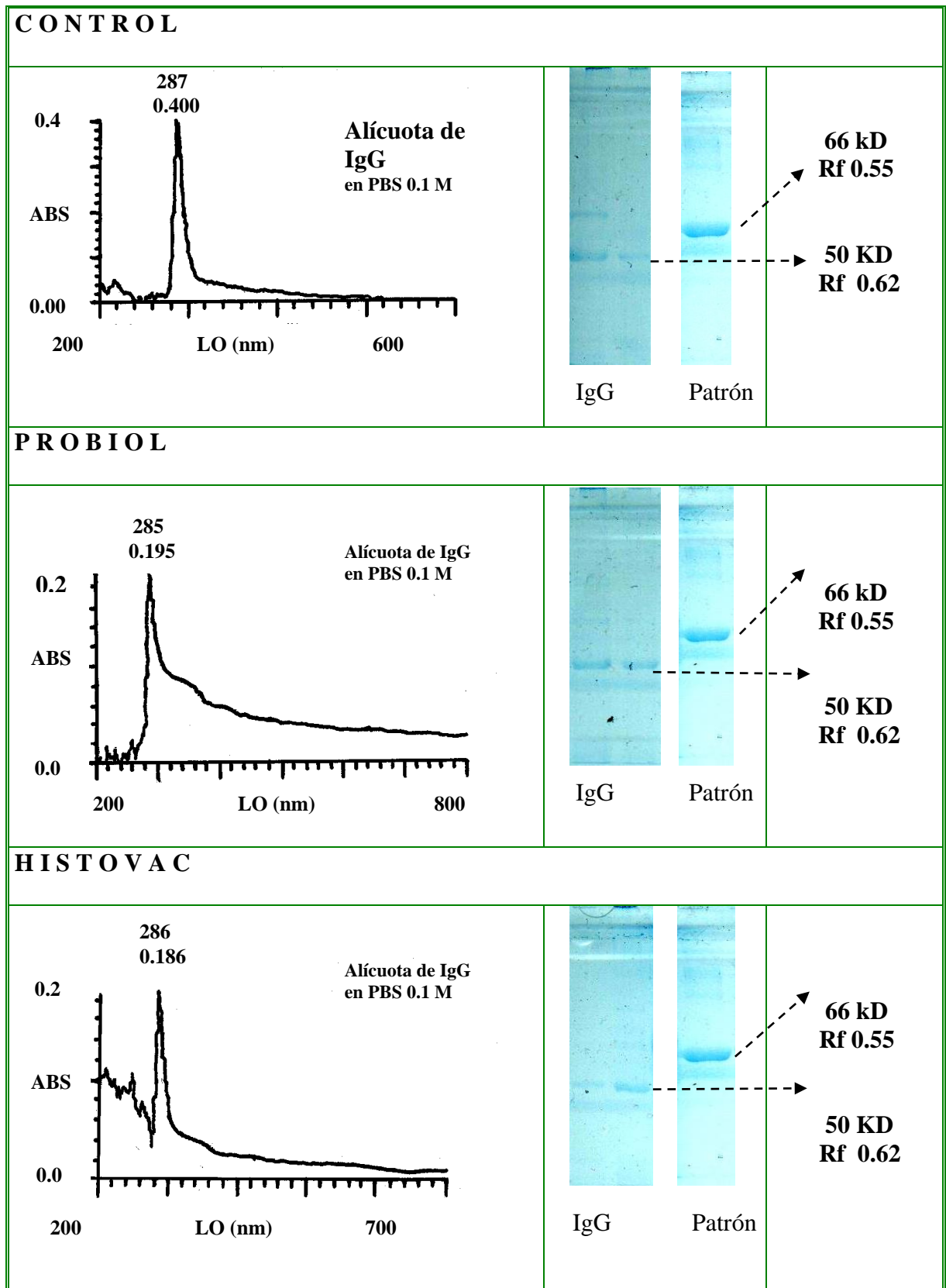


Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-page 11% y espectrofotometría UV- vis de inmunoglobulina G en antisueros de conejo

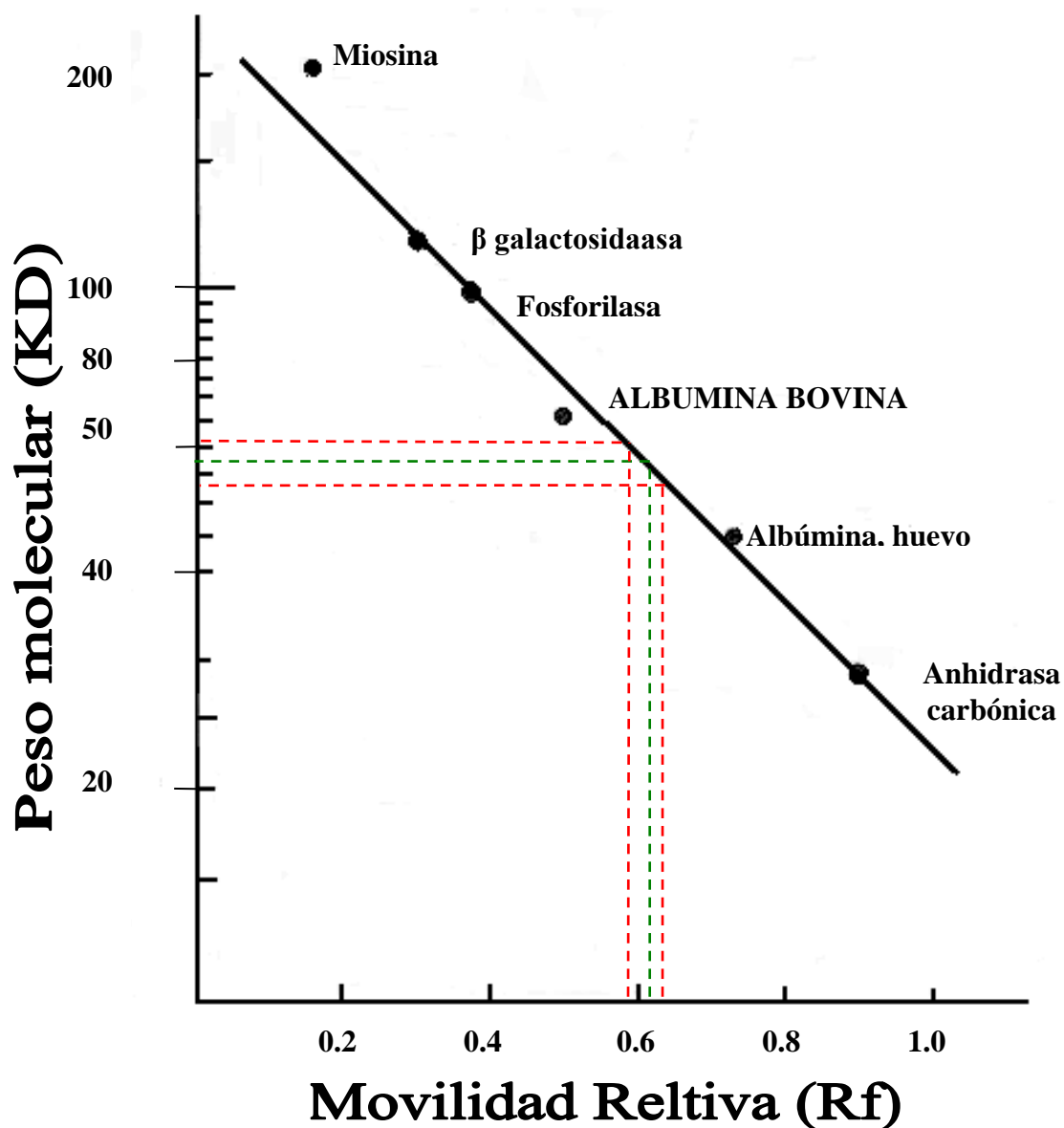


Figura 15. Curva típica de calibración obtenida con estándar de proteínas separadas por SDS-page gel discontinuo de electroforesis (11%), basado en el método de Laemmli (1970) (tomado de Current Protocols In Immunology, suplemento 11; 8.4.18). Las línea punteada verde indica el peso molecular aproximado de 50 KD para la IgG; las líneas puntadas rojas indican la histovacuna histovac con sus dos bandas 47 y 51 KD

El análisis estadístico aplicado a los tratamientos se llevó a cabo bajo el **programa estadístico SPSS** (Programa Estadístico de Ciencias Sociales), consistente en el análisis de varianza de una vía, donde se determinó una diferencia global marcada entre los tratamientos **probiol, control e histovac** basada en la cantidad de anticuerpos producidos para cada bloque **0.0873; 0.1481 y 0.2824 respectivamente**. De acuerdo a los tratamientos (histovacuna comercial, histovacuna histovac y el blanco) inducidos en cada grupo experimental de 10 conejos cada uno, se infiere conforme los datos estadísticos descriptivos obtenidos mediante el muestreo en la población (conejos blanco Nuevazelandia) y mediante la realización de la respectiva tabla de anova (análisis de varianza), que los resultados son altamente significativos (**significancia igual a 0.000**), como lo demuestra la tabla 5 del ANOVA. Las comparaciones **múltiples a priori**, asimismo enseñan un alto nivel de significancia en comparación entre todos los tratamientos; resultando efectiva la comparación entre **histovac-control e histovac-probiol con un intervalo de confianza es del 95%**.

Tomando en cuenta el ANOVA como significativo, las mediciones de las **comparaciones a posteriori** arrojaron diferencias notables en todos los tratamientos, resultando también relevantes las comparaciones entre **histovac-control e histovac-probiol**.

La estadística confirma los resultados que se obtuvieron cuantitativamente y esta respuesta se explica debido a que se usaron protocolos específicos para extraer algunas proteínas y DNA del agente infeccioso. Esto no ocurre en probiol, evidencia que se manifiesta por el amplio número de bandas o máximos de absorción correspondientes a las proteínas presentes en la histovacuna.

Finalmente el trabajo arrojó buenos resultados a nivel de evaluación de anticuerpos, favoreciendo a histovac respecto a probiol. Sin embargo, este estudio requiere profundizar en aspectos tales como, análisis de los componentes proteicos o de ácidos nucleicos en las dos histovacunas. También se hace necesario todo un protocolo de evaluación biológica de la histovacuna preparada en este trabajo para en un futuro trabajar en el escalamiento pre-industrial de este producto biológico que podría ser de importancia regional para el tratamiento de las infecciones producidas por el papilomavirus bovino, aspecto que requiere del esfuerzo conjunto de la Universidad y la industria privada que está directamente implicada en esta problemática en el departamento del Cauca.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis espectrofotométricos, electroforéticos y cuantitativos de inmunoglobulina G, (los cuales demuestran una clara extracción, datos presentados), comprobados por comparación estadística de las histovacunas por análisis de varianza, se puede establecer una producción determinante de IgG para la histovacuna Histovac en relación con la de Probiol establecida en gran parte por la utilización de proteínas de células mayormente afectadas por la papilomatosis, células de la capa basal (estrato germinativo), donde se mantiene y desarrolla el virus.

Definir los agentes involucrados en la protección o en la reacción inmunopatológica o ambos es de gran importancia en el desarrollo de vacunas. En el trabajo se ha demostrado que las proteínas extraídas de papilomas, purificadas por técnicas de extracción salina, diálisis y filtración para su posterior inducción, son capaces de generar respuestas inmunológicas, con la mayor producción de inmunoglobulinas, 0.2824 mg/ml, contra 0.1481 mg/ml de IgG, para el caso de las histovacunas Histovac y Probiol respectivamente; esta producción está establecida para una adecuada protección, así como para reconocer y proliferar ante el eccema o descamación de una manera mas efectiva en el caso de Histovac. Se asume una mayor incidencia de la zona en afección como la causante de una respuesta favorable.

Es de gran importancia analizar las proteínas como posibles candidatos a ser utilizadas puesto que en primer lugar, la eficiencia de una vacuna depende de su capacidad para generar una respuesta inmune contra un agente extraño. En segundo lugar uno de los parámetros que confieren efectividad a un posible inmunógeno es su potencialidad de inducir una respuesta celular significativa y directa contra las proteínas directamente involucradas en la afección verrugosa.

En la actualidad, a nivel regional no se evalúa la capacidad de la proteínas para generar respuesta inmunes, para el caso de Probiol, la vacuna se define como un extracto directo de papilomas, esta histovacuna no produce una completa protección a los individuos afectados por la papilomatosis bovina, asumido por su carácter inespecífico, al inducir la verruga en su totalidad la cual lleva en mayor proporción células del estrato corneo caracterizadas por capas de células anucleadas y grandes con apariencia hialina, cornificada y con queratohialina (Zarzoza, 2000) .

Es necesario lograr un candidato vacunal que produzca protección ordenada y que incida directamente en contra de las proteínas específicas en relación a la enfermedad. Aunque en este primer acercamiento al estudio de la respuesta inmune al virus de la papilomatosis bovina por parte del laboratorio donde se realiza el trabajo no se ha llegado hasta la caracterización molecular y funcional de las Proteínas extraídas, se puede suponer que la producción de inmunoglobulina G, involucradas en la respuesta inmune son también responsables de respuesta citotóxica contra las células infectadas por el virus.

BIBLIOGRAFIA

BALSELOW B.A. and SPRANDBROW P.B;. Equine and Bovine Papilomavirus Infections Series. Editor Marian Horzinek. Vol 6, Elsevier 1996.

BECERRA, M. A.; MARTELO M.M.; RODRIGUES F.L. Tratamiento de La Papilomatosis Bovina Con Ganaseg. Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1969

SARZOSA B. Paulo César. Estudio Histopatológico e Histoquímico de papilomavirus En el Municipio De Popayán . Universidad Del Cauca, Popayán , 2000

Bradford, M.M. (1976)A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem* 72: 248-254.

COLIGAN, E. J. Current Protocols In Immunology, vol. II. Editorial Wiley Interscience Greene, 1994. USA.

COOPER G. Terrance. Instrumentos y Técnicas de bioquímica, primera edición. Editorial Reverté, S.. Barcelona, 1984.

Directrices Sobre Los Procedimientos Inmunologicos Aceptables : En <http://www.conicit.go.cr/feria/GuiaExpeAnimal.html>

Estructura De Los Anticuerpos : En <http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/estruc%5Fanticu/default.htm>.

Guía Para El Manejo De Animales De Laboratorio : En <http://www.conicit.go.cr/feria/GuiaExpeAnimal.html>.

HERNÁNDEZ, Y y Trujillo G. E. Obtención y aplicación de antisueros a dos patovares de *Xanthomonas Campestris*. : En Revista de Agronomía . Vol. 6, 1992.

Histovacuna contra la papilomatosis bovina : En <http://www.geocities.com/labprobiol/biovet2.htm>.

KLEYSLLER Willon Silva. Papilomatosis Bovina En : <http://www.indanet.com.br/htdocs/rural/papilomatose>. 2000.

PETER M. Howley ;. Fields Virology. Third Edition. Lippincott- Raven publishers, Philadelphia, 1996.

IAÑEZ P. Enrique. Curso de inmunología general : En http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_12.htm. 1999.

KEERTI, V. ; SHAH and PETER M. Howley;. Fields Virology. Third Edition. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, 1996.

LEŠNÍK, F *et al* Autovaccination and metabolic profiles at bovine papilomatosis. En : <http://www.google.com/search/bovine+papilomatosis>.

LUELMO Jesús. Tratamiento De Las Verrugas. En : <http://www.cspt.es/webcsptcastella/CMRAI/medicir/InfProf/DocPautesProtocolos/berruguec.htm>

MALDIGAN M. T.; MARTINKO J. M.; PARKER J. Biología De Los Microorganismos. Octava Edición, editorial Prentice Hall. Madrid 1998.

MARLIES Leenaars, et al. Producción de anticuerpos policlonales en animales de laboratorio : soporte y recomendaciones por talleres ECVAM. En : <http://www.altweb.jhsph.edu/science/pubs/ECVAM/ecvam>. ATLA 27, 79-102.

MARGNI A., Ricardo. La respuesta inmune. En: Revista de Divulgación y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. Vol. 6, No 36 1997.

MARSHALL S. Horwitz ;. Fields Virology. Third Edition. Lippincott- Raven publishers, Philadelphia, 1996.

MOLINEROS. Luis Fernando. Plegable : Diagnostico Sanitario De La Papilomatosis Bovina En El Municipio De Popayán y sus Alrededores. Universidad Del Cauca, 1999

MORTER. R. L. LARRY D.V.M. Catle Warts Bovine Papillomatosis. En: Animal Health, School of Veterinary Medicine, Indiana U. S. 2000

NAILOR M.,Mark. Vacunas de melnoma : En Dermatology Online Journal, www.google.com/search/vacunas+melanomas.

OCHOA, F y TRUJILLO, G. Metodología sencilla para la obtención de antisuero al virus de la tristeza de los cítricos : En Fitopatol Venez. Vol. 7, 1993

PERROTTA, D. Producción de antisueros fúngicos específicos en conejo : En Fitopatol Venez. Vol. 7, 1994.

PETER M. Howley ;. Fields Virology. Third Edition. Lippincott- Raven publishers, Philadelphia, 1996.

RAMOS D.Gladys et al. Resultados preliminares de los ensayos realizados en un grupo de conejos con coccidias tratados homeopáticamente. Departamento de Animales de Experimentación. Instituto "Pedro Kourí" (IPK) Cuba. 1995.

ROBAYO y Cols. Tratamiento de la Papilomatosis Bovina, forma cutánea, con Diaceturato de 4,4-Diazominibenzamidina. Manizales: Universidad de Caldas, 1974. 31p.

SÁNCHEZ V., Juan. Vacunas Atenuadas e Inactivadas : En <http://www.google.com.search/vacunas+inactivadas>

SHEFLER W. C.; Bioestadística. Primera Edición, editorial Fondo Educativo Interamericano. México 1981.

STUDDERT M.J.; Virus Infections of Vertebrates;. Series Editor Marian Horzinek. Vol 6, Elsevier 1996.

Vacunas Atenuadas E Inactivadas. En : [http://www.google.com/search/vacunas inactivadas](http://www.google.com/search/vacunas+inactivadas)