



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**USO DA *Thuya occidentalis* NO TRATAMENTO DA  
PAPILOMATOSE BOVINA: ASPECTOS CLÍNICOS,  
HISTOPATOLÓGICOS E MOLECULARES**

**VANDA LUCIA DA CUNHA MONTEIRO**

**Recife**  
**2007**

**VANDA LUCIA DA CUNHA MONTEIRO**

**USO DA *Thuya occidentalis* NO TRATAMENTO DA  
PAPILOMATOSE BOVINA: ASPECTOS CLÍNICOS,  
HISTOPATOLÓGICOS E MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Veterinária da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**DOCTORA** em Ciência Veterinária.

Orientadora: M<sup>a</sup> Cristina de O. Cardoso Coelho  
Co-orientadores: Pierre Castro Soares  
Miriam Teixeira Nogueira

**Recife  
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**USO DA *Thuya occidentalis* NO TRATAMENTO DA  
PAPILOMATOSE BOVINA: ASPECTOS CLÍNICOS,  
HISTOPATOLÓGICOS E MOLECULARES**

Tese de Doutorado elaborada por  
**VANDA LUCIA DA CUNHA MONTEIRO**

Aprovada pela Banca Examinadora

---

**Prof. Dra Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho(Orientadora)**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Profa. Dra Ivone Antônia de Souza**  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Dra Néria Vânia Marcos dos Santos**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Profa. Dra Eneida Willcox Rego**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr Rinaldo Aparecido Mota**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr. Pierre Castro Soares**  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

### DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho a todos os animais em especial, a Penélope, a grande lição de minha vida.**

### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (a luz e o caminho da minha vida), irmãos, sobrinhos e família;

Ao Pai Maior e a todos os “amiguinhos” que andam sempre comigo, dando força e coragem para sempre seguir em frente;

Agradeço às amigas Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho, Roseana Tereza Diniz de Moura, Cristine Fernandes de Lima Cavalcanti e Andréia Lais Teodoro da Cunha e ao amigo Giliate Cardoso Coelho Filho pela ajuda, pelo espírito nobre, pelo amor, pela paciência e orientação na realização de mais um objetivo de minha vida. Sem vocês, não chegaria lá;

Aos Professores Dr Antônio Carlos de Freitas, Pierre Castro Soares e às colegas Cybelle Cristina e Angélica Ramos, pela dedicação e também pelos ensinamentos;

Aos todos os professores do Programa, em especial aos professores Rinaldo Aparecido Mota e Roberto Soares de Castro, pelo incentivo, orientação e dedicação. À funcionária Edna Chérias e a todos os colegas do curso pela disponibilidade, ajuda e momentos de descontração;

Aos colegas e amigos Lílian Sabrina, Flávia Ferreira, Patrícia Gallindo, Karina Britto, Catharine Gurgel, Fernando Tenório, Lúcia Helena, Ana Paula Bandim, Paula Fernanda, Ana Paula Borges, Jaque Maia, Janaína Farias, Ericka Korinfsky, Gilvan Marques, Eryvelton de Souza, Sérgio Alves, Eneida Willcox, Laurimar Thomé, Taciana Galba, Tom Menezes e “Coca”;

Ao farmacêutico e grande amigo Daniel Vidal Monteiro, pelo auxílio imprescindível tanto no decorrer do curso como na confecção rigorosa do medicamento homeopático utilizado neste trabalho;

Ao Dr. Paulo Corrêia por me acolher em sua fazenda e por ter cedido os animais, e aos funcionários da fazenda, especialmente a Jô, Thiago, Paulo (parea), Lia, Paty, Nino, Josivânia. À professora Miriam e aos colegas Adriano da Silva e Rafaella Alves do DMV da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que tanto colaboraram na parte experimental deste trabalho;

À Farmácia Homeopática Sabino Pinho e ao Laboratório Simões, por ter me recebido com muita atenção e ter doado o medicamento utilizado neste experimento;

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo. Muito obrigada

E em especial a todos os animais, **muito obrigada!!!**

## RESUMO

A papilomatose viral bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa que apresenta alta prevalência em bovinos leiteiros, causando consideráveis perdas econômicas para este setor. Com o objetivo de contribuir com a pesquisa terapêutica para esta virose, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de *Thuya occidentalis*, no tratamento da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros, por meio dos aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares. Esta pesquisa foi dividida em 4 experimentos. Foram incluídas nos experimentos fêmeas mestiças de holandês nulíparas, primíparas e múltiparas, apresentando diferentes tipos de papilomas cutâneos (típicos, atípicos, atípicos engastados, filamentosos e mistos) e de graus assim definidos para este estudo: leve (25% do corpo acometido), moderado (50% do corpo acometido) e intenso (mais de 50% do corpo acometido). Os animais mantiveram-se em sistema semi-intensivo de criação e foram distribuídos aleatoriamente em grupos, com dez animais cada. Nos experimentos I e II, os animais foram divididos em 4 grupos, onde os grupos 1 e 2 receberam solução de cloreto de sódio a 0.9% e álcool de cereal, respectivamente, sendo estes considerados controles, e os grupos 3 e 4 receberam os medicamentos fitoterápicos *Thuya occidentalis* (Simões®) tintura mãe (T.M.) a 30% e *Thuya occidentalis* tintura mãe a 30% com própolis, respectivamente. Os animais receberam, diariamente por via oral, 10mL dos produtos durante 63 dias. Para avaliação histopatológica, 50% dos animais foram submetidos à biópsia cutânea das lesões no momento zero (M0) e no momento final (MF). Nos presentes experimentos, as regressões parcial e total não foram observadas em nenhum grupo, uma vez que durante as avaliações clínicas e histopatológicas, em todos os momentos e grupos, os papilomas não apresentaram alterações macroscópicas de remissão, coloração e consistência. Nas análises histopatológicas verificaram-se alterações hiperplásicas epiteliais e conjuntivas, com extenso crescimento vegetativo do epitélio com cristas epidérmicas extensas e profundas, estes resultados caracterizam fase de desenvolvimento com replicação e síntese viral, sendo um achado característico de papilomatose. Pode-se concluir que a papilomatose cutânea em bovinos leiteiros apresenta predileção por áreas específicas. Os papilomas estavam mais presentes no abdômen lateral, barbela e focinho, apresentando lesões mistas seguidas de basais e que o uso das tinturas a 30% de *Thuya occidentalis* (Simões®) e *Thuya occidentalis* com própolis, nas condições experimentais utilizadas nestes estudos, não provocam remissão de papilomas em bovinos leiteiros. No

experimento III utilizou-se o medicamento homeopático *Thuya occidentalis* CH6. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos. Os grupos 1 e 2 receberam solução de NaCl 0.9% e álcool de cereal, respectivamente, sendo estes considerados controles, e o grupo 3 recebeu a *Thuya occidentalis* CH6 na forma de tratamento. Para os três grupos a administração foi diária, sendo 10 mL por via oral, durante 63 dias. Para avaliação histopatológica, os animais foram submetidos à biópsia cutânea dos papilomas, no momento zero (M0) e no momento final (MF). De acordo com os dados obtidos, as regressões parcial e total ocorreram apenas no grupo 3 (*Thuya occidentalis* CH6), observando-se queda das verrugas em 20% dos animais deste grupo, além de regressão parcial em 80% nos animais restantes, com alterações macroscópicas de coloração e tamanho, achado este confirmado pelo exame histopatológico. Na análise histológica observou-se redução da camada espinhosa em todos os animais do grupo tratado (G3), evidenciando-se redução nas camadas epiteliais, com tecido conjuntivo da papila dérmica apresentando fibroblastos ativos e capilares e raras células inflamatórias linfocitárias. Concluindo-se que a *Thuya occidentalis* CH6 contribuiu no tratamento de papilomas pedunculados em bovinos, podendo ser indicada na presença desta infecção. Estudos com a *Thuya occidentalis* CH6 devem ter continuidade com bovinos portadores de papilomas basais, com período de tratamento superior a 63 dias. O experimento IV teve como objetivo identificar o BPV-2 em amostras de verrugas cutâneas de bovinos, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Utilizando-se os *primers* gerais (FAP59/64 e MY 11/09) e específico para BPV-2 obteve-se uma positividade de 33 (82,5%) das 40 amostras analisadas. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a presença da BPV no Estado de Pernambuco está em concordância com os achados mundiais, destacando-se a importância do diagnóstico no controle da infecção e, conseqüentemente, adoção de uma terapia específica. Estes resultados enfatizam as propriedades terapêuticas do medicamento homeopático *Thuya occidentalis* CH6, concluindo-se que o seu uso contribuiu no tratamento da papilomatose cutânea em bovinos, ressaltando a necessidade de estudos por períodos superiores a 63 dias com a *Thuya occidentalis* fitoterápica em bovinos portadores de papilomatose cutânea, e as dosagens séricas de AST, GGT, uréia e creatinina revelaram que a planta utilizada neste estudo, durante 63 dias, não foi capaz de causar alterações hepáticas e renais em bovinos com papilomatose cutânea.

**Palavras chave:** papilomatose bovina; *Thuya occidentalis*; histopatologia, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

## SUMMARY

The bovine viral papillomatosis is an infect-contagious disease with high prevalence in dairy bovines, causing considerable economical losses in this sector. Aiming to contribute with therapeutic research for this pathology, this work had as objective evaluating the efficacy of *Thuya occidentalis* in the treatment of cutaneous papillomatosis in dairy bovines by the clinical, histopathological and molecular aspects. This research was divided in 4 experiments. Were used in the experiments females of Holstein Friesian crossbred, nuliparous, primiparous and multiparous, exhibiting different types of cutaneous papilloma (typical, atypical, engastated atypical, filamentous and mixing) and of degrees defined for this study: light (25% of the body affected), moderate (with 50% of the body affected) and intensive (with more than 50% of affected body). The animals were kept in a semi-intensive system of raising and were randomly distributed in groups with tem animals each. In the experiments I and II the animals were divided into 4 groups, were the groups 1 and 2 received solution of sodium chloride at 0.9% and cereal alcohol, respectively, being these considered controls, and the groups 3 and 4 received the phytotherapeutic medicines *Thuya occidentalis* (Simões®) mothre tincture (T.M.) at 30% and *Thuya occidentalis* mother tincture at 30% with propolis, respectively. The animals received, daily by oral via, 10mL of the products during 63 days. For histopathological evaluation, 50% of the animals were submitted to cutaneous biopsy of the lesions on the zero moment (M0) and the final moment (FM). In the present experiments, the partial and total regression were not observed in any group, once during the clinical and histopathological evaluations, in all moments and groups, the papillomas did not presented macroscopic alterations of remission, color and consistence. In the histopathological analysis it was observed epithelial and conjunctive hyperplasic alterations, with extensive vegetative growth of the epithelium with wide and deep epidermal crest, results that characterize development phase with viral replication and synthesis, being a characteristic finding of papillomatosis. It may be concluded that cutaneous papillomatosis in dairy bovines shows predilection for specific areas. The papillomas were most present on lateral abdomen, dewlap and snout, showing mixing lesions followed by basal and that the use of tinctures at 30% of *Thuya occidentalis* (Simões®) and *Thuya occidentalis* with propolis, on the experimental conditions used in this studies, do not cause remission of papillomas in dairy bovines. In experiment III there was used the homeopathic medicine *Thuya occidentallis* CH6. The animals were distributed at random in 3 groups. The

groups 1 and 2 received NaCl 0.9% solution and alcohol cereal, respectively, being these considered controls, and the 3<sup>rd</sup> group received *Thuya occidentalis* CH6 in the treatment formula. For the three groups the administration was daily, being 10mL by oral via during 63 days. For histopathological evaluation, the animals were submitted to cutaneous biopsy of the papilloma lesions in the zero moment (0M) and final moment (FM). According to the achieved data, the partial or total remission occurred only in group 3 (*Thuya occidentalis* CH6), where were observed warts fall in 20% of the animals of this group, besides partial regression of the remaining animals, with macroscopic alterations of color and size, findings confirmed by the histopathological exam. In the histopathological analysis there was observed reduction of the thorny layer in all animals of the treated group (G3), showing reduction of epithelial layers with conjunctive tissue of dermal papilla showing active fibroblast and capillaries and rare lymphocytic inflammatory cells. Concluding that *Thuya occidentalis* CH6 contributes to the treatment of pedunculated papiloma in bovine, being indicated in the presence of this infection. Studies with *Thuya occidentalis* CH6 must have continuity with bovine carrying basal papillomas in a period of treatment superior to 63 days. The experiment IV had as objective to identify the BPV-2 in samples of cutaneous warts of bovine using the Polimerase Chain Reaction (PCR). Using the general (FAP59/64 e MY 11/09) and the specific primers for BPV-2 there was obtained an assertiveness of 33 (82.5%) of the 40 analyzed samples. According to the obtained results it is concluded that the presence of BPV in Pernambuco State-Brazil is in agreement with the world findings, enhancing the importance of the diagnose and control of the infection and, consequently, adoption of an specific therapy. These results emphasize the therapeutic properties of the homeopathic medicine *Thuya occidentalis* CH6, concluding that its use contributes to the treatment of cutaneous papillomatosis in bovine, emphasizing the necessity of studies for period superior to 63 days with the phytotherapeutic *Thuya occidentalis* in bovine carrying cutaneous papillomatosis, and the serum dosage of AST, GGT, urea and creatinine showed that the plant used in this study, during 63 days, was not able to cause hepatic and renal alterations in bovine with cutaneous papillomatosis.

**Key words:** bovine papillomatosis; *Thuya occidentalis*; histopathology, Polimerase Chain Reaction (PCR).



# SUMÁRIO

	Pág.
<b>RESUMO</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>iii</b>
<b>LISTAS DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>LISTAS DE QUADROS</b>	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 Papilomatose Bovina	19
<b>3 REFERÊNCIAS</b>	<b>29</b>
<b>EXPERIMENTO I</b>	<b>50</b>
<b>RESUMO</b>	<b>51</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>52</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>52</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
2.1 Material Botânico	54
2.2 Local do Experimento	54
2.3 Animais e instalações	
2.4 Avaliação dos animais e papilomas	54
2.5 Grupos Experimentais	54
2.6 Avaliações Clínicas	55
<b>3 RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>63</b>
<b>5 REFERÊNCIA</b>	<b>65</b>
<b>EXPERIMENTO 2</b>	<b>71</b>
<b>ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DOS PAPILOMAS CUTÂNEOS EM BOVINOS TRATADOS COM A TINTURA DA <i>Thuya occidentalis</i></b>	<b>72</b>
<b>RESUMO</b>	<b>72</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>73</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>73</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>74</b>
2.1 Avaliações histopatológicas	74
<b>3 RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>80</b>
<b>5 REFERÊNCIA</b>	<b>81</b>
<b>EXPERIMENTO III</b>	<b>84</b>
<i>Thuya occidentalis</i> CH6 NO TRATAMENTO DA PAPILOMATOSE BOVINA: ASPECTOS MACROSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS	<b>85</b>

<b>RESUMO</b>	<b>85</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>86</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>86</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>88</b>
2.1 <b>Material Botânico</b>	
2.2 <b>Local do Experimento</b>	<b>88</b>
2.3 <b>Animais e instalações</b>	<b>88</b>
2.4 <b>Avaliação dos animais e papilomas</b>	<b>88</b>
2.5 <b>Escolha do Medicamento</b>	<b>89</b>
<b>Homeopático</b>	
2.6 <b>Grupos Experimentais</b>	<b>89</b>
2.7 <b>Avaliações Clínicas</b>	<b>90</b>
<b>3 RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>90</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>96</b>
<b>5 REFERÊNCIA</b>	<b>97</b>
<b>EXPERIMENTO IV</b>	<b>100</b>
<b>OCORRÊNCIA DA BPV2 EM</b>	<b>101</b>
<b>BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO</b>	
<b>DE PERNAMBUCO-BRASIL</b>	
<b>RESUMO</b>	<b>101</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>101</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>102</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>103</b>
2.1 <b>Animais</b>	<b>103</b>
2.2 <b>Amostras e extração do DNA</b>	<b>103</b>
2.3 <b>Análise por PCR</b>	<b>104</b>
<b>3 RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>109</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>114</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	TÍTULOS	pág.
<b>EXPERIMENTO I</b>		
Figura 1	Tipos de papilomas observados no Mo em todos os grupos (seta). A - papiloma de pele típico mostrando o aspecto de “couve-flor”. B - papiloma de pele atípico, caracterizado por aspecto rugoso, infecção geral no dorso. C - papiloma atípico engastado, semelhante a uma reação alérgica, com presença de pêlos, mostrando a formação globosa e encapsulada. D - papiloma filamentosos localizados na glândula mamária, notar o aspecto fibroso.	56
Figura 2	Frequência absoluta dos tipos de papiloma encontrados nos diferentes grupos experimentais, no M0 e MF.....	57
Figura 3	Sangramento intenso observado após lesão dos papilomas pedunculados.....	58
Figura 4	A seta ilustra papilomas cutâneos múltiplos localizados na barbel em um animal do grupo 3 (tratado), no MF	59
Figura 5	Cor dos papilomas nos grupos (seta), no momento inicial e final, cinza (A) e rosa (B).	59
Figura 6	Ilustra a presença de enfermidades secundárias (seta). A- dermatite, B-ferida com miíase e C- ectoparasitoses (carrapatos), observados em vários animais com papilomatose, no M0 e no decorrer do tratamento.	61
<b>EXPERIMENTO II</b>		
Figura 1	<b>Fotomicrografias da pele de bovinos com papilomatose cutânea submetidos a tratamentos fitoterápico <i>Thuya occidentalis</i> TM</b> <b>1a.</b> Papiloma filiforme em corte transversal. Observar aumento na queratinização (Q), no número de células da epiderme (E) e da derme (D). Aumento 30x. <b>1b.</b> Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar maior queratinização da epiderme e células necróticas vacuolizadas (seta). Notar derme atípica com reação fibroblástica proliferativa (Q). Aumento de 150x. <b>1c.</b> Fragmento de papiloma em corte transversal. Observar um aumento na produção celular da epiderme (E) intradérmica; aumento e desordem (estrela) das células e das fibras colágenas na derme (D); e maior queratinização e descamação do epitélio (Q). Aumento 30x. <b>1d.</b> Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar um maior número de células na camada basal da epiderme (seta); aumento na queratinização (Q) da camada epitelial; Notar arranjo atípico da derme papilar (D). Aumento 150x. <b>1e.</b> Fragmento de um papiloma em dedo de luva típico (E) em corte longitudinal. Observar aumento na queratinização (Q) e da camada epitelial (E). Aumento de 30x. <b>1f.</b> Fragmento da epiderme em corte transversal. Observar aumento da camada granulosa da epiderme (E) e da camada acelular de descamação (Q). Aumento 150x. <b>1g.</b> Fragmento de papiloma com aspecto digitiforme em corte longitudinal. Observar irregularidade na epiderme (E), aumento da queratinização (Q). Aumento 30x. <b>1h.</b> Fragmento de papiloma filiforme de úbere em corte transversal. Epiderme hiperplásica (E) e espessa camada de queratina (Q). Aumento 30x. <b>1i.</b> Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar irregularidade e uma maior densidade celular na epiderme (E), crescimento epitelial intradérmica e formação de pérolas córneas (seta). Derme	80

(D). Aumento 150.

### EXPERIMENTO III

- Figura 1      Frequência absoluta dos tipos de papiloma encontrados nos diferentes grupos experimentais..... **91**
- Figura 2      Evolução clínica dos grupos tratados com *Thuya occidentalis* CH6: tumorações vegetativas fungiformes e pedunculadas nas orelhas, barbeta, olhos e pescoço (2-A); sangramento com facilidade após trauma (seta laranja) (2-B); 15 dias após o tratamento, áreas de regressão após queda de alguns papilomas (setas laranjas) (2-C); 45 dias após, apresentando 90% de regressão (2-D); animal      100%      curado      após      60      dias      de tratamento..... **93**
- Figura 3      **Fotomicrografias da pele de bovinos com papilomatose cutânea submetidos a tratamento com *Thuya occidentalis* CH6, no período de 63 dias. 3-a.** Papiloma típico em corte transversal (M0). Observar um aumento na produção celular da epiderme (E) com projeções intradérmicas; aumento e desordem das células e das fibras colágenas na derme (D); e maior queratinização e descamação do epitélio (Q). Aumento 30x. **3-b.** Crescimento epidérmico exuberante em direção à derme (M0). Limite entre a crista epidérmica e derme (seta). Observar área queratinização da epiderme (E). Aumento de 30x. **3-c.** Fragmento de papiloma de animal tratado com *Thuya occidentalis* CH6 em corte transversal (MF). Observar redução da camada celular da epiderme (E) e do tecido conjuntivo da derme (D); redução da queratinização do epitélio (Q). Aumento 30x. **3-d.** Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar em maior aumento camada epidérmica (E); redução da derme papilar (seta) e da camada queratinizada (Q). Aumento 150x. **3-e.** Fragmento de um papiloma em dedo de luva típico (E) em corte transversal de animal controle no momento final. Observar extensa queratinização (Q) arredor do eixo camada epitelial (E). Aumento de 30x. **3-f.** Fragmento de papiloma em corte longitudinal de animal controle no momento final. Observar arranjo filiforme de papiloma típico ativo (E) e da camada acelular de descamação (Q). Aumento 30x. **95**
- Figura 4      Frequência dos sintomas observados em todos animais no MO. .... **95**

### EXPERIMENTO IV

- Figura 1      A-Mapa do Brasil. B- Observar em maior aumento a Região Agreste do Estado de Pernambuco (seta) onde foi detectada a presença do vírus da papilomatose cutânea bovina. In.: [www.espacociencia.pe.gov.br](http://www.espacociencia.pe.gov.br) **106**
- Figura 2      PCRs com primer BPV-2 para tipificação de DNA viral extraído de verrugas cutâneas. Na imagem estão representadas diferentes amostras de DNA seguidas por controles negativos e positivos respectivamente. Como esperado para BPV 2 o fragmento amplificado contém 172 pb. .... **107**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>TÍTULOS</b>	<b>pág.</b>
<b>EXPERIMENTO IV</b>		
Tabela 1	Positividade para BPV em verrugas cutâneas de bovinos na Região Agreste do Estado de Pernambuco/Brasil., 2006...	<b>106</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADROS</b>	<b>TÍTULOS</b>	<b>pág.</b>
<b>EXPERIMENTO III</b>		
Quadro 1	Ilustra a repertorização dos sintomas relevantes dos animais com papilomatose cutânea. .....	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o rebanho bovino brasileiro seja composto por 20,75% de animais de aptidão leiteira e 79,3% de animais destinados à produção de carne. Atualmente, o Brasil é o sexto maior produtor de leite, com um volume que corresponde a aproximadamente 4,5% da produção mundial (MARTINS, 2004).

A cadeia produtiva de leite é uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro, atingindo 24,6 bilhões de litros no ano de 2005, o que representou um crescimento de 4,7% em relação a 2004 (ANUALPEC, 2005). Movimentando anualmente cerca de US\$ 10 bilhões, emprega 3 milhões de pessoas, das quais, 1 milhão são produtores e, produzem aproximadamente 20 milhões de litros de leite por ano (TEODORO, 2001; VILELA, 2001; ANUALPEC, 2005).

Em termos regionais, a pecuária brasileira registrava em 2004, a seguinte configuração: Centro-Oeste-34%; Sudeste-21,7%; Sul-19,9%; Norte-12% e Nordeste com 15,7% (VILELA, 2001; ANUALPEC, 2005).

Em Pernambuco, a pecuária leiteira é explorada em todo o Estado, com destaque para os municípios de Águas Belas, Bom Conselho, Canhotinho, Correntes, Garanhuns, Gravatá, Limoeiro, Pesqueira, Sanharó, São Bento do Una, São Caetano e Venturosa. Esta Mesorregião também apresentou o maior índice de produtividade animal no Estado (1237 litros/vaca/ano), conforme dados levantados pela Embrapa Gado de Leite (BARROSO, 2003).

Em vista do exposto, o Brasil apresenta um grande potencial na pecuária leiteira e tem atraído diversos investidores para o setor de insumos veterinários, que, gradativamente têm desenvolvido produtos específicos para as principais espécies animais de importância econômica. Muitas destas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de suprimentos alimentares e princípios ativos de medicamentos (IBGE, 2001-2003; GAZETA MERCANTIL, 2003).

Dentre os vários insumos pesquisados na veterinária, a terapia com plantas vem se impondo recentemente (SERAVALLE, 1996). Este interesse vem crescendo nos últimos anos, principalmente, no que se refere à sua atividade farmacêutica e composição química (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Sabe-se que o uso das espécies vegetais com fins de tratamento e cura das doenças e sintomas se perpetuou na história da civilização humana e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como eficaz fonte terapêutica, sendo pesquisada em diversos países (RATES, 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) diz que planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos, sendo responsável pelo efeito terapêutico que a planta possui (CARVALHO, 2006).

Em diferentes países, a medicina popular, com o uso de plantas, é praticada, geralmente, por raizeiros e pequenos ervanários, e apresenta-se em franca expansão (SUZUKI, 2002). Quase todo o continente Africano depende do uso destes medicamentos, a qual representa uma alternativa frente ao alto custo dos fármacos sintéticos e efeitos colaterais (ASCHWANDEN, 2004).

Diante da importância, a terapia natural aparece como uma alternativa para a produção e uso veterinário, principalmente, no Norte e Nordeste, onde há diferença econômica, social e cultural. Neste contexto, é importante o emprego de plantas medicinais nas doenças dos rebanhos, principalmente, nas regiões semi-áridas do Nordeste (ROEDER, 1998).

Dentre estas enfermidades, a papilomatose bovina a vírus (BPV) se destaca (MELO e LEITE, 2003). O BPV tem sido extensivamente estudado, devido a sua complexidade, sua relação com câncer e por induzir papilomas nos epitélios cutâneos ou mucosos em diversos animais, inclusive o homem (MUTIRAGUNRA, 2001; CAMPO, 2002). É causada por um DNA vírus de dupla cadeia, podendo causar verrugas cutâneas, na teta, úbere, pênis, na bexiga urinária e no trato gastroentérico (ALONSO-AMELOT e AVENDANO, 2001; ABROI, 2004; SOUTO, 2006).

As verrugas depreciam o couro, causando desvalorização dos animais afetados, podendo ocorrer debilitação, alterações funcionais orgânicas, além de, tornar os animais susceptíveis às infecções, quando a mesma está localizada na teta e úbere (WADHWA et al., 1995; CAMPO, 1997). Esta enfermidade é considerada um dos principais entraves econômicos à pecuária bovina brasileira, principalmente, em rebanhos leiteiros (MELO e LEITE, 2003).

Considerando a importância da terapia natural na cura de enfermidades, além dos aspectos econômicos referentes aos custos dos medicamentos, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que visem à busca de alternativas complementares aos métodos tradicionais, que seja de baixo custo e menos prejudiciais à saúde humana e animal e ao equilíbrio ambiental.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está enraizada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus. Por muito tempo, tal procedimento representou a principal forma de cura, especialmente, entre a população rural. Entretanto, com o processo de urbanização e o desenvolvimento da indústria química, os medicamentos alopáticos passaram a predominar na terapia moderna (ALVES e SILVA, 2003).

Dentre todas as terapias complementares ou alternativas disponíveis, a prática do uso de plantas ou de suas partes com finalidade terapêutica vem se impondo recentemente, e já não pode ser mais considerada como simples modismo (SERAVALLE, 1996; FETROW e AVILA, 2000).

Embora, muitas vezes desconhecida, é consumida tanto pela classe social menos favorecida como pela de maior poder econômico, sendo recomendada pela Organização das Nações Unidas (ONU), indicando inclusive que 2/3 da população da Terra utiliza plantas medicinais (ALMEIDA, 1997; ASCHWANDEN, 2004). Simbolizando, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As plantas medicinais têm seu uso descrito por praticamente todos os povos, desde os tempos mais remotos, sendo usada no tratamento e prevenção de doenças. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, onde, é possível, encontrá-las em feiras livres, mercados populares e em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

Atualmente, observa-se uma crescente redescoberta do valor das plantas medicinais em decorrência não só de certos efeitos colaterais de muitos medicamentos alopáticos, embora o uso incorreto daquelas também possa causá-los, como o alto custo dos medicamentos industrializados ou o próprio modismo (MEDEIROS e CABRAL, 2001). Apesar disto, o fato de uma planta estar sendo comercializada não garante maior segurança quanto à qualidade do produto e conhecimento da eficácia e dos riscos (MATOS, 1999).

A partir dos conhecimentos populares e tradicionais do uso das mesmas, na busca de solução de algum mal-estar ou da cura de alguma doença, surgiram interesses comerciais e científicos (CABRAL, 1997). Por isso, a cultura popular rural representa a base de informação para a pesquisa científica e a indústria farmacêutica (VILA VERDE et al., 2003; CARVALHO, 2006).



As observações populares atribuídas ao uso e eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (BRITO e BRITO 1999).

Estima-se que exista, sobre o planeta, cerca de 250.000 espécies botânicas. Destas, apenas um inexpressivo percentual foi investigado sob o prisma farmacológico e toxicológico (RATES, 2001). No Brasil, pelo menos trezentas plantas medicinais fazem parte do arsenal terapêutico da população e vem crescendo nos últimos anos (FETROW e AVILA, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2005).

Nos últimos anos tem-se verificado um avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos (RIZZO et al, 1999; CASTELLUCCI et al, 2000; COSTA NETO e OLIVEIRA, 2000; TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em prática o seu consumo, tornando válidas informações terapêuticas que foram transmitidas entre gerações (DORIGONI et al. 2001; SUZUKI, 2002). De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a medicina natural (MACIEL et al., 2002).

Em vista disto, recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou uma portaria regulamentando a produção dos medicamentos feitos de plantas. No Nordeste brasileiro a repercussão foi imediata; primeiro por uma assistência farmacêutica nacional carente e, segundo, por uma tradição de nossa cultura popular em usar, cada vez mais, produtos medicinais de origem vegetal. Somando-se ao quadro, o fator econômico, pois se estima que apenas 23% da população têm acesso aos medicamentos industrializados (MS, 2006).

O mercado mundial de medicamentos à base de plantas é de US\$ 43 bilhões por ano. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano (ASCHWANDEN, 2001; LAIRD e KATE, 2002), porém o Brasil ainda carece de levantamentos estatísticos mais acurados da produção e produtos derivados

(VENDRUSCOLO et al., 2005), porém, estimativas da Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica (ABIFITO) indicam que o setor movimenta anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva (ABIFITO, 2002).

Neste contexto, é fundamental a viabilização do desenvolvimento e a comercialização de plantas medicinais baseados em critérios científicos, oriundos do esforço de vários pesquisadores das áreas de química, farmacologia, toxicologia, tecnologia farmacêutica e clínica médica (VENDRUSCOLO et al., 2005). Essa meta é corroborada pelo fato de Pernambuco ser um dos pioneiros, no Brasil, em abordar o estudo sistematizado de plantas medicinais. Portanto, no que se refere ao segmento dos medicamentos veterinários é de crescente aquecimento na demanda (ABIFITO, 2002).

Nesta conjuntura, estes medicamentos aparecem como uma alternativa para a população e também para o uso veterinário, principalmente, quando se leva em consideração a diferença econômica, social e cultural entre as Regiões Brasileiras, com isto, surge à importância do emprego de plantas medicinais nas enfermidades dos rebanhos nas regiões semi-áridas, principalmente, no Nordeste e sugere a intensificação do uso de plantas (ROEDER, 1998).

Em vista disto, as pesquisas nas Universidades e Institutos de Pesquisa revelam substâncias ativas de grande importância no controle e combate de afecções que acometem a população e os animais, principalmente, em bovinos (TEODORO et al., 2001; MARTINS et al., 2004). Visto que, o mercado da bovinocultura, de corte e leite, aparece como o maior mercado consumidor de produtos veterinários do País, sendo o sexto maior produtor de leite do mundo, com crescimento anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares e o maior rebanho bovino comercial do mundo, responsabilizando-se por 64% do faturamento total do segmento, seguido por 19% na avicultura e 10% na suinocultura (IBGE, 2001; VILELA et al., 2001; BARROSO, 2003; GAZETA MERCANTIL, 2003; IBGE, 2003; ANUALPEC, 2005; USDA, 2005).

Com isto, a avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, óleos voláteis e ligninas tem sido objeto de incessante estudo, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (SIMÕES, 2004).

Entre os diversos exemplos de plantas e sua importância atualmente, pode-se mencionar a *Thuya occidentalis*, que apresenta promissores efeitos contra certos tumores (HAYFIELD, 1999).

Esta planta pertence à família das pináceas conhecida como cipreste. Essa espécie cresce no Canadá, de onde os indígenas utilizavam seus ramos e folhas para o reumatismo, gota e malária (LATHOUD, 2002). Nativa da Virgínia (USA), Canadá, Europa e Sibéria e vem da palavra grega que significa sacrifício. Nos sacrifícios pagãos, esta árvore de folhas perenes era queimada quando se executavam as vítimas (SHEALY, 1999). Esta árvore exsuda óleo volátil, contendo thuiona, cetona aromática bem como glicosídeos pinicrina e tujina. As ações da mesma parecem estar relacionadas ao óleo volátil que é estimulante e depurador do sangue. Possui também atividade mitogênica, inibe os antígenos do HIV-1 e a transcriptase reversa; além disso, é indutor do subgrupo de células T e de várias citocinas *in vitro* (OFFERGELD et al., 1992). A estimulação desta resposta tem sido considerada de relevância no combate aos microrganismos estranhos (TSE, MILTON e PIGANELLI, 2004), sendo de importância a manutenção da imunocompetência dos pacientes, uma vez que é fundamental a resposta imune frente às infecções (CAVERT, 1990).

A tintura-mãe da *Thuya occidentalis* é preparada a partir de macerados de suas folhas aromáticas e ramos até formar uma polpa que serve para confeccionar o remédio (SHEALY, 1999), sendo utilizada em verrugas, condilomas e papilomas das aves em geral (galinhas, perus, patos, pássaros de gaiola e viveiro) em todas as fases da criação (ARENALES, 2002) e em seres humanos, com índice referido de cura de 84,2%, porém, faltam estudos randomizados para comprovação científica da real eficácia (JORGE et al., 2000). Esta planta pode ser de potencial interesse no combate às diversas afecções que podem acometer o homem e o animal, principalmente, como alternativa ao controle químico convencional contra lesões de pele em rebanhos (ARENALES, 1999).

## 2.2 Papilomatose Bovina

Um dos problemas da bovinocultura é a incidência de tumores cutâneos, sendo discutido em diversas literaturas. Os mais comuns são os fibropapilomas, fibroma, carcinoma das células escamosas e melanomas (SCOTT e ANDERSON, 1992). Predileções de raça incluem Hereford e Ayrshire (carcinoma das células escamosas) Angus (melanoma) e Shorthorn e Holandesa (papilomatoses virais) conforme Shah (1992).

Em geral, não há significação econômica considerável, porém, o fibropapiloma ou papiloma ocupa lugar de destaque, sendo responsabilizada por elevada perda econômica, em decorrência do crescimento retardado, perda de peso, redução no consumo de alimento, queda na produção de leite. (MEYERS e READ, 1990; SCOTT e ANDERSON, 1992).

A papilomatose pode ser definida como projeções epiteliais que se estendem acima da mucosa de superfície com hiperplasia do epitélio de revestimento, com alongamento ou alargamento das cristas interpapilares (COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000).

É uma enfermidade infecto-contagiosa, de origem viral, crônica, de caráter tumoral benigno e de natureza fibro epitelial caracterizada por alterações na pele e nas mucosas que infecta as células basais do epitélio ou os fibroblastos, formando projeções digitiformes microscópicas ou macroscópicas (ROBBINS et al., 2001; SILVA, et al., 2004a).

O papilomavírus (PV) tem característica endêmica e distribuição mundial, já diagnosticada em vários países como Japão, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Índia, Nova Zelândia, Escócia e Turquia (OLSON, 1990), muito semelhante em todas as raças e espécies (MENDONÇA e JOAQUIM NETTO, 2005). Martius, historiador romano, foi o primeiro a descrever o condiloma clássico em seres humanos (BAFVERSTEDT, 1967). Embora, outros historiadores, na Idade Média, já descrevessem esse tipo de lesão, porém, as lesões eram imprecisas. Pela genética moderna, há evidências de que eles sejam tão ou mais antigos que o *Homo sapiens* (ONG, BERNARD e VILLA, 1994).

O estudo do papilomavírus animal tem uma longa história, M'Fadycan e Hobday em 1898 (apud NICHOLLS e STANLEY, 2000) utilizaram uma simples transmissão experimental usando o papilomavírus canino oral (COPV). Segundo Wellenberg et al (2002), esta infecção conceitua uma das doenças mais importante nos bovinos, principalmente em bezerros, causando grandes perdas econômicas em virtude da morbidade, mortalidade e custos com tratamento.

A papilomatose é descrita em várias espécies por induzirem hiperplasia do epitélio, definidas como verrugas, papilomas ou condilomas. Sendo classificado pela sua espécie de hospedeiro natural (humano, bovino, etc.) e subclassificados em tipos de acordo com a sequência de nucleotídeos (MENDONÇA e JOAQUIM NETTO, 2005), baseado no tamanho e densidade da partícula viral, propriedades físicas, DNA virótico e análise de proteínas do capsídeo, através de eletroforese (LANCELLOTTI, 2000).

Causam infecções assintomáticas e várias lesões benignas ou malignas em mamíferos (rato, chimpanzé, coelho, cachorro, ovelha, alce, porco, elefante indiano, cervo, cavalo, búfalo e bovino), acontecendo em ordem decrescente de frequência em bovinos, cães, cavalos, cabras e ovelhas (KIDD, 1938; COOK e OLSON, 1951; PARISH, 1961; KREIDER, 1963; ORTH et al., 1981; SUNDBERG et al., 1981; SUNDBERG et al., 1985; THEILEN et al., 1985; OKABAYASHI et al., 1991; HAYWARD et al., 1992; KNOWLES et al., 1996;

MILLER e BRODELL, 2001; CAMPO, 2002; CAMPO, 2003), sendo observado também em peixes teleósteos e pluronectídeos (YOKOTE, 1995; RAMOS e PELETEIRO, 2003).

O papiloma bovino a vírus (BPV) vem sendo intensamente pesquisado e estudado em virtude da sua ocorrência nos últimos tempos e da íntima relação com a carcinogênese e outras doenças (CAMPO, 2006) e tem sido avaliada extensivamente, não apenas pela repercussão econômica desta infecção, mas também por ser um modelo experimental interessante para o estudo do sinergismo ambiental na etiologia do câncer. Muitos dos conhecimentos sobre o papilomavírus vêm de estudos com o BPV e de outros hospedeiros animais portadores deste tipo de vírus (MUTIRAGUNRA, 2001; MELO e LEITE, 2003).

O BPV, da mesma forma que os papilomavírus que infectam os seres humanos, é causado por um pequeno vírus da família *Papillomavidae*, gênero *Papillomavirus*, espécie Bovine papillomavirus - BPV que contém DNA em configuração circular, de filamento duplo, não envelopado, epiteliotrópico, com 52-55 nm de diâmetro (VÍRUS TAXONOMY, 2001).

O vírus do PV, independentemente do local ou tipo de lesão, tem morfologia e estrutura constante (CAMPO, 2003). Os papilomavírus possuem DNA como material genético, poucas proteínas e não possuem lípidos e membrana, como acontece nos vírus envelopados. O capsídeo é formado por 72 subunidades (capsômeros), sendo 60 hexaméricos e 12 pentaméricos, com arranjo icosaédrico, sendo por este motivo, de aparência esférica à microscopia eletrônica (VAN REGENMORTEL et al., 2000), com cerca de 8 a 7,3kb pares básicos no genoma (MORGAN e CAMPO, 2000).

O genoma tem estrutura física e organização gênica bem conhecida, subdivididos em três regiões: região precoce (*early*: E), que codifica as proteínas não estruturais, região tardia (*late*: L), que codifica as proteínas do capsídeo e região reguladora (LCR), que contém os elementos reguladores necessários à replicação e transcrição do DNA viral (CAMPO, 1997; MORGAN e CAMPO 2000; TERAJ, 2001; SCULLY, 2002; MENDONÇA e JOAQUIM NETTO, 2005).

O vírus se replica nas células basais do epitélio, caracterizando alterações da pele e das mucosas que estão revestidas por tecido epitelial plano estratificado (SCHUCH, 1998), estimulando a divisão celular (GIOVANNELLI et al., 2002), hiperproliferação benigna do estroma e do epitélio com crescimento excessivo dessas células formando as verrugas ou papilomas que geralmente regridem sem causar problemas clínicos em seus hospedeiros (CAMPO, 1997; SCHUCH, 1998; CAMPO, 2002).

Os eventos precoces iniciais na infecção incluem transformação celular e replicação de DNA. Os produtos gêmeos iniciais (E1 a E7) são primariamente responsáveis pela

codificação de proteínas necessárias à replicação viral e transformação celular; E1 tem função na iniciação da replicação do DNA; E2 na regulação da transcrição do DNA; E4 e E5 começam a transcrição antes do início da replicação viral vegetativa e são expressas em quantidades aumentadas nas células em saturação. E6 e E7 são responsáveis pelas proteínas transformadoras necessárias à oncogênese - ligação às proteínas p53 e pRB, dois genes supressores de tumor importantes, levando à inativação dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2005).

Os produtos gêmeos tardios (L1 e L2) são proteínas que podem ser encontradas apenas nas camadas epiteliais superiores, onde as proteínas estruturais do capsídeo viral são reunidas. Ocorre a multiplicação do vírus no núcleo celular, onde produz novas partículas virais, fenômeno que resulta na morte da célula infectada. As alterações nos mecanismos de controle antitumoral têm início, quando o genoma viral se incorpora ao material nuclear (SHAH, 1992).

Esses eventos apresentam tradução citológica representada pelo aumento nuclear, hiperchromasia, coilocitose, disceratose, papilomatose, hiperkeratose, acantose e grânulos de cerato-hialina proeminentes. A coilocitose se destaca por ser descrita frequentemente como um sinal patognômico de infecção por esse vírus. As células da camada dérmica de uma lesão papilomatosa proliferam excessivamente e nessas células é possível encontrar inúmeras cópias do DNA viral (OLIVEIRA et al., 2003).

Há várias formas de identificação do PV nos tecidos humanos e animais, que variam segundo a sensibilidade e especificidade na identificação do vírus. Dentre estas, podemos citar o exame histopatológico, que consiste na identificação de neoplasias intra-epiteliais (RODRIGUES e CAMARGO, 1999; OLIVEIRA et al., 2005), sugerindo sua presença através de aspectos como coilocitose, disceratose, papilomatose, hiperkeratose, acantose e grânulos de cerato-hialina proeminentes, podendo tornar-se um método de grande utilidade em centros que não dispõem de métodos de diagnóstico sofisticados, ou mesmo como uma indicação para a aplicação desses métodos nos centros que os possuem (MILLER, 2001), porém, este exame não permite identificar qual o tipo de vírus, além de não visualização histológica em infecções latentes, visto que, as alterações provocadas pelo o vírus são mínimas (RODRIGUES e CAMARGO, 1999; COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000).

Há também os de baixa sensibilidade, que incluem a microscopia eletrônica, imunohistoquímica, imunofluorescência e hibridização *in situ*, análises de moderada sensibilidade, que incluem *Southern blot*, *dot blot* e hibridizações *blot* reversas e as de alta sensibilidade, que incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por Read e Kurtz, 1999.

Está técnica foi desenvolvida por Mullins em 1983, permitindo a amplificação de amostras muito pequenas de DNA ou RNA *in vitro*, podendo ser visualizados através da eletroforese (HIRATA e HIRATA, 1997; STEINER et al., 1999; NOVAES, ALVES e SILVA, 2004).

Como o vírus da família papilomaviridae apresenta dificuldade para ser cultivado em sistemas de culturas celulares e então a técnica da PCR apresenta-se adequada para a detecção do papilomavírus devido à alta sensibilidade e especificidade e por não requerer o cultivo do vírus (WOSIACKI, 2002), contribuindo fundamentalmente no avanço de pesquisas em torno das inúmeras doenças neoplásicas recentemente elucidadas, tais como câncer de próstata (RENNEBERG et al., 1999), de bexiga (STEINER et al., 1999), de mama (LUKE e KAUL, 1998), na leucemia promielocítica (O'CONNOR et al., 1999).

Até o momento foram identificados cerca de seis sorotipos relatados à papilomatose dos Bovídeos classificados de acordo com a distribuição dos ácidos nucléicos no genoma viral (CAMPO et al., 1994; MURPHY et al., 1999), porém, treze BPVs estão sendo estudados recentemente (CAMPO, 2006). É provável que investigações adicionais revelem a existência de mais BPVs, através de técnica da biologia molecular (OGAWA et al., 2004).

Estes tipos foram classificados originalmente em subgrupos: A (BPV 1, 2 e 5) que tem o genoma de DNA de aproximadamente 8kb e subgrupo B (BPV 3, 4 e 6) que tem o genoma menor medindo aproximadamente 7,3kb (CAMPO, 2006). O subgrupo A, causa fibropapilomas na pele, no qual o epitélio e a derme subjacente estão envolvidos (CAMPO, 2003). O BPV 1, 2 e 5 (fibropapilomas do subgrupo A) localiza-se na pele, com a hiperproliferação de queratinócitos e ou de fibroblastos (MURPHY et al., 1999). O subgrupo B causa verdadeiros papilomas no epitélio da pele (BPV3 e BPV6) ou na mucosa do trato digestivo superior (BPV4) (CAMPO et al., 1994; SOUTO et al., 2006). Atualmente, há uma nova classificação, onde o BPV 5 parece compartilhar homologia com ambos os grupos, causando fibropapilomas e papilomas epiteliais (BLOCH e BREEN, 1997; DeVILLIERS et al. 2004).

O BPV1 causa tipicamente papilomas fibrosos nas tetas, de cor branca ou rosa, especialmente, em animais com mais de 2 anos de idade (CAMPO, 2002). O BPV2 causa fibropapiloma típico na cabeça, pescoço, ombro, barbela, membros, tetas e, ocasionalmente, em qualquer lugar do corpo, especialmente, em animais jovens, com idade inferior a dois anos. Infecções reprodutivas e abortos podem acontecer com o BPV2, podendo também induzir fibropapilomas no esôfago e rumem e câncer de bexiga. (CAMPO, 1994).

As verrugas causadas por BPV-1 e 2 podem ser simples ou múltiplas, relativamente pequenas (2 a 5 mm em diâmetro), firmes, com superfície alopecica. As lesões aumentam de tamanho progressivamente podendo chegar até 25 cm de diâmetro, onde se apresentam de aspectos pedunculados, com desenvolvimento variável de hiperqueratose na superfície e projeções queratíneas (SCOTT e ANDERSON, 1992).

BPV-5 e 6 causam lesão do tipo “grão de arroz” nas tetas, acometendo várias idades. As lesões são lisas, brancas acinzentadas, com hiperqueratose e não regredem espontaneamente, podendo ter também papilomas interdigitais que é um problema crônico em gado leiteiro (BLOCH, SUTTON e SPRADBROW, 1994; BARBOSA et al., 1999; FIORAVANTI, 2002; GOLDSHMIDT et al, 2002).

Fibropapilomas típicos acontecem no dorso e ventral aos espaços interdigitais, especialmente, nos membros anteriores e está freqüentemente associado com lesões interdigitais, que levam aos problemas de claudicação, perda de peso e diminuição da produção de leite em alguns rebanhos além de dor, laminite e episódios de anestro (MURPHY et al., 1999). Não ocorre regressão espontaneamente. Histologicamente observam-se lesões de fibropapilomas com características exóticas com combinação epiteliais e conectivas com proliferações, degenerações e grânulos de queratinócitos no extrato granuloso da epiderme (CAMPO, 2002). BPVs 3, 4 e 6 foram isolados de papilomas epiteliais cutâneos, papilomas no epitélio alimentar e papiloma epitelial no teto, respectivamente (BLOCH, SUTTON e SPRADBROW, 1994; CAMPO, 1997).

Cada papilomavírus é específico para espécie infectada e altamente trópico para o endotélio específico e tem o seu próprio grau de oncogenicidade, não se observando infecção cruzada. Porém, em condições experimentais, observou-se um único caso conhecido de infecção cruzada do BPV (tipo 1 e 2) em cavalos e outros equídeos (NICHOLLS e STANLEY, 2000).

BPV-1 e 2 são os únicos tipos que podem infetar espécies diferentes. Cavalos, burros e mulas desenvolvem tumores sarcóides após se infeccionarem com BPV (COOK e OLSON, 1951). O DNA do vírus está presente nas células tumorais em múltiplas cópias epissomais e seus genes são transcritos, indicando um papel ativo do vírus na etiologia do sarcóide (OTTEN et al., 1993; REID e NASIR, 1999). O tumor é muito invasivo, não responsivo ao tratamento, conduzindo-o, na maioria das vezes, ao sacrifício. (CAMPO, 1994). Causando perdas econômicas tanto para indústria de corrida e passeio, como para os fazendeiros e camponeses, principalmente, no Nordeste brasileiro, onde freqüentemente, estes animais são o único sustento (WOSIACKI, 2002).



O BPV é adquirido diretamente por inoculação cutânea (STRINGFELLOW et al., 1988) ou através de soluções de continuidade da pele (WOSIACKI, 2002), por contato indireto (cercas, bebedouros, comedouros, cordas, moscas e carrapatos, máquina de marcar e ordenhadeira), por contato direto ou pela via transplacentária (CAMPO, 1997; MURPHY et al., 1999), em geral, a infecção requer um vetor ou porta de entrada. Populações confinadas são mais susceptíveis aos surtos e a maior incidência da doença e os animais da raça Holandesa da variedade preto e branco apresentam uma maior ocorrência (SILVA et al., 2001).

Como vários vírus, o PV pode estabelecer uma infecção latente (OGAWA et al., 2004), onde, o animal fica portador, sendo reservatório natural e principal fonte de transmissão (CAMPO, 1995; MURPHY et al., 1999; CAMPO, 2006), principalmente, transmissão de forma horizontal, tanto através do coito quanto da inseminação artificial, podendo ser reativado em animais imunocomprometidos (CARVALHO et al., 2003). Este dado alerta a necessidade de controle sanitário de doadoras de embrião observando condições sanitárias dos rebanhos quanto à fertilização *in vitro* (GUÉRIN e THIBIER, 2000).

Papilomas aparecem geralmente na superfície do corpo do gado em média aos 2 anos de idade e observam-se os sinais clínicos dentro de 1-6 meses após a inoculação do vírus (ABU-SAMRA et al., 1982; CAMPO, 2002). O período de incubação é bastante variável podendo estar intimamente relacionado com a competência imunológica individual (SILVA et al., 2004c). São muito resistentes aos agentes externos, somente sendo inativados à 70°C, oscilações de pH e éter não possuem efeito inativador (BEER, 1999).

As verrugas são observadas topograficamente em regiões específicas e apresentam características macroscópicas e histológicas particulares (CAMPO, 1995; LEUKUTOVÁ et al., 1998), observando-se lesões verrugosas, com massas protusas, firmes, de coloração branca acinzentada ou brônzea, com superfície seca e cornificada, com dimensões que variam desde 1mm até 500mm. Algumas lesões são acinzentadas e mais planas, possuindo fixação cutânea da base larga ou pedunculada (SMITH, 1994). Os tumores são constituídos por tecido epitelial e conjuntivo, com aspecto bulboso ou de “couve-flor”, frondoso, plumoso ou de “grão de arroz” (WILLIAM et al., 1992). Quanto à localização, aparecem mais comumente na cabeça, pescoço, barbela, tronco, membros, úbere, teta e pênis (REBHUN et al., 2000).

As lesões são proliferativas e normalmente manifesta-se principalmente em animais imunodeficientes (LIMA et al., 2004). Foi relatada a ocorrência severa de papilomas orais, assim como, extensos papilomas cutâneos em animais imunodeprimidos através de

corticoideterapia (NICHOLLS e STANLEY, 2000). Após a terapia junto com vacinação autógena, foi seguida pela regressão da lesão (LE et al. 1997).

Sabe-se que, nas infecções virais, o sistema imune é peça chave no controle destas. A papilomatose é determinada provavelmente por condições estressantes tais como manejo inadequado, desnutrição e ectoparasitoses, levando provavelmente a uma baixa da imunidade do animal, podendo desta forma, facilitar o aparecimento da doença (GRANDIN, 1997). De todos os fatores abordados de causas imunossupressivas, principalmente, em bovinos leiteiros, a nutrição é fundamental como ferramenta para modular o sistema imune, não apenas em estados patológicos imunossupressores, como também para a manutenção dos saudáveis (MENEZES e BERTOLA, 2001).

O animal acometido pelo BPV pode apresentar complicações como hemorragias, infecções secundárias e feridas mecânicas que ocorrem, devido ao atrito nos papilomas grandes ou aglomerados e podem levar a transtornos gerais tóxicos e até a septicemia (WILLIAN et al., 1992; ROSENBERGER, 1993; MELO e LEITE 2003; SILVA, 2004b). A presença de verrugas no úbere de vacas em lactação desvaloriza o animal e os fazem suscetíveis para invasores secundários (WADHWA et al., 1995).

Geralmente, os defeitos nos epitélios glandulares causados pelo vírus, não são assim importantes a menos que os mesmos se tornem grandes tornando a ordenha difícil (WELLENBERG et al., 2002). Em primíparas, as verrugas podem obstruir completamente os tetos, afetando a higiene e o fluxo do leite, podem ser facilmente lesadas e sangram, às vezes profusamente, causando dor enquanto ordenhadas (WADHWA et al., 1995; HILLERTON, 2001), podendo causar infecção secundária, obstruindo os capilares dos ductos, resultando em supressão do mecanismo de defesa natural e, conseqüentemente, ser um fator predisponente para a mastite (CAMPO, 1994; HEMMATZADEH et al., 2003). Animais que desenvolvem extensos papilomas no trato gastroentérico superior têm dificuldade para comer e respirar, além que, as localizadas no pênis, interferem com a função reprodutiva dos touros. Ocasionalmente, rebanhos inteiros têm que ser selecionados se os papilomas não regressarem (WELLENBERG et al., 2002).

O PV induz tumores benignos e eventualmente, quando fatores genéticos ou ambientais estão envolvidos, pode resultar em conversão maligna (SCULLY, 2002; CAMPO et al., 1999). Resultado de várias pesquisas confirmou a presença de PV em lesões malignas e pré-malignas de cérvix uterina, vulva, pênis, conjuntiva e trato aerodigestivo em humanos (PINTO e COLLAÇO, 2001; ROTELI-MARTINS et al., 2001; SOARES, 2002), câncer de pele em humanos e coelhos, carcinoma do trato digestório superior e de bexiga em bovinos e

humanos e orais em cães (NICHOLLS e STANLEY, 2000; STEP et al., 2000; ALONSO-AMELOT AVENDANO, 2001; ABROI et al., 2004; CAMPO, 2006; SOUTO, 2006). Recentemente, mais de 100 tipos de papiloma vírus humano (HPV) têm sido identificados em várias lesões. Na cavidade oral, 24 tipos são associados com lesões benignas e 12 tipos com lesões malignas, principalmente, HPV-16 e 18 que são chamados de malignos ou oncogênicos ou de alto risco (CRUM, 2000; TERAJ e TAKAGI, 2001; SCULLY, 2002).

Estudos epidemiológicos e moleculares têm permitido a discussão da seqüência de eventos que ocorrem durante a carcinogênese: O BPV-4 infecta a mucosa do trato alimentar superior, expressa suas proteínas transformadoras e induz a formação de papilomas, que regredem espontaneamente devido à resposta imune celular (CARVALHO et al., 2003; CAMPO, 2006), porém, as lesões de BPV-4, mesmo em pouca quantidade, apresentam alto risco de malignização como, por exemplo, tumores de esôfago que são raros em animais domésticos (MOULTON, 2002), mas que podem ser transformados em carcinomas malignos com a ingestão do broto da samambaia (*Pteridium aquilinum*). Pois, a mesma, possui substâncias carcinogênicas, mutagênicas e imunossupressoras que pode predispor os papilomas a se transformarem em carcinomas das células escamosas (NICHOLLS e STANLEY, 2000) ou progredirem ao carcinoma transicional da bexiga urinária (STEP et al. 2000). Demonstrou-se, experimentalmente, a confirmação maligna destes tumores quando associados a essas substâncias e a infecção pelo BPV-4, principalmente, nos casos de tumores no rúmen de bovinos (CAMPO, 2002).

A co-carcinogenicidade entre os compostos químicos da samambaia (*Pteridium aquilinum*) e a infecção com o papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) também tem sido implicada na etiologia da hematúria enzoótica bovina (HEB). Apesar de o DNA do BPV-2 ter sido detectado em tumores da bexiga em casos naturais e experimentais de HEB, a patogenia da possível interação samambaia – BPV-2 ainda não está completamente estabelecida (CAMPO et al., 1994; WOSIACKI et al., 2005; CAMPO, 2006).

Depois do crescimento progressivo inicial do tumor, em animais imunologicamente ativos, procede à regressão espontânea em até 12 meses (KNOWLES et al., 1996). Regressão espontânea de papilomas também foi observada em vaca (KNOWLES et al., 1996), cavalo (COOK e OLSON, 1951), ovelha (HAYWARD et al., 1992), cabra (THEILEN et al., 1985), cervo branco (SUNDBERG et al. 1985), elefante indiano (SUNDBERG et al., 1981) e coelho (OKABAYASHI et al., 1991).

A regressão ocorre devido à imunidade celular (JUBB et al., 1993), provavelmente efetuada através de células T, mais precisamente CD4 e também subconjuntos de CD8 e a

imunidade humoral, prevenindo contra novas infecções, porém a imunidade para a infecção é espécie específica, ou seja, animais podem sofrer infecções sucessivas através de tipos viróticos diferentes, apesar do desenvolvimento imunológico para infecções prévias (NICHOLLS e STANLEY, 2000).

A regressão espontânea das verrugas permitiu muitas dúvidas sobre o tratamento, visto que, dependerá da fase, tipo e localização dos papilomas, no entanto, na maioria das vezes, o tratamento é necessário, quando há uma grande quantidade de animais acometidos dentro da propriedade ou quando o número de papilomas é muito grande, sendo necessário realizar tratamentos sistêmicos e/ou tópico (VEIGA et al., 2000).

Existem vários protocolos de tratamento com base científica, incluindo a aplicação de diversos tipos de óleo, vacinas autógenas, ácidos orgânicos, compressão da verruga ou cirúrgico. Alguns destes parecem ser eficazes (KATZUNG, 1999; YOUNGKIN et al., 1999), como por exemplo, agentes cetó-ácidos ou drogas antivirais locais tais como o aciclovir, o ribavirina e o cidofovir (DUAN et al., 2000; WILSON et al., 2000; CHRISTENSEN et al., 2001) e *Thuya occidentalis* no tratamento das lesões provocadas pelo papilomavírus (RODRIGUEZ et al., 2005).

### 3 REFERÊNCIAS

ABIFITO – Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. mar/2002. Disponível em <http://www.abifito.com.br>. Acesso em 03/10/2006.

ABROI, A.; ILVES, I.; KIVI, S.; USTAV, M. Analysis of Chromatin Attachment and Partitioning Functions of Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Protein. **J.Virol.**, v.78, p.2100-2113, 2004.

ABU-SAMRA, M. T.; AZIZ, M. A.; HOMEIDA, A. M: Clinical observations on bovine papillomatosis (warts). **Br. Vet. J.**, v.138, p.138-144, 1982.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O. Effect of plants used in popular medicine, **Rev. Saúde Pública**, v.29, n.6, p.428-433, 1997.

ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDANO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. **Int J Cancer**, v.91, p.252-259, 2001.

ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Rev Esc Enferm da USP**, v.37, n.4, p.85-91, 2003.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 340p. 2005.

ARENALES, M. C. Homeopatia em Gado de Corte- **I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte**-02 de setembro a 15 de outubro de 2002.

ARENALES, M.C. Viabilidade da homeopatia na medicina veterinária- **Revista Nosso Clínico**, ano 2, n.10, p.26-28, 1999.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? Bull. W. H. O. Geneva, v.79, n.7, pp. 691 – 692, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin>. Acesso em 09 jan. 2004.

BÄFVERSTEDT, B. Codilomata acuminata – past and present. **Acta Derm Venereol**, v.47, p.476-80, 1967.

BAKER, B. A.; TYRING, S. K. Therapeutic approaches to papilloma virus infections **Dermatologic Clinic.**, v.15, n. 2, p.331-340, 1997.

BARBOSA, P. F. et al. Causas de variação da produção de leite em um rebanho da raça Holandesa em São Carlos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.5, p.974-981, 1999.

BARROSO, M. **Perspectivas para o cooperativismo de leite no Brasil**. In: VILELA, D.; BRESSAN, M. FERNANDES, E. N. V. Gestão ambiental e políticas para o agronegócio do leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; CNPq: Serrana Nutrição Animal, 2003. p 59-80.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 1º reimpressão da 1º. ed. São Paulo: Roca, 1999. 380p.

BLOCH, N.; BREEN, M. Bovine papillomavirus type 5: partial sequence and comparison with other bovine papillomaviruses. **Virus Genes.**, v.14, p.171-174, 1997.

BLOCH, N.; SUTTON, R. H.; SPRADBROW, P. B. Bovine cutaneous papillomas associated with bovine papillomavirus type 5. **Arch. Virol.**, v.138, p.373-377, 1994.

BRITO, A. R. M., BRITO, A. A. S. 1999. Medicinal plant research in Brazil: data from regional and national meetings. In: BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; Laird, S.A. (eds.). **Medicinal Resources of the tropical forest - biodiversity and its importance to human health**. Columbia University Press, New York. pp. 386-401.

CABRAL, I. E **Aliança dos saberes no cuidado e estimulação da criança-bebê**: concepções de estudantes e mães no espaço acadêmico de enfermagem. Rio de Janeiro: Ed Escola Anna Nery, 1997. 298p.

CAMPO, M. S. et al., Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, v.15, n.8, p.1597 – 1601, 1994.

CAMPO, M. S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **Vet. J.**, v.154, p.175 – 188, 1997.

CAMPO, M. S. Papilomavirus and diseases in humans and animals. **Veterinary and comparative oncology**, v.1, n.1, p.3 – 14, 2000.

CAMPO, M. S. Animal model of papillomavirus pathogenesis. **Virus Res.**, v.89, p.249-261, 2002.

CAMPO M.S. Papilomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary and comparative oncology**. v.1, n1: 3-14, 2003.

CAMPO, M.S. **Bovine papillomavirus: old system, new lessons?** In Campo, M.S. (Eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond, Chap 23. First published in Wymondham, England: Caister Academic Press pP.1-34, 2006.

CAMPO, M. S. et al. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In: TAYLOR, J.A., SMITH, R.T. (Eds.), Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control, pp. 116 – 122, 1999.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W.F. Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. **Ciba Found Symp**, v.187, p.61-73, 1994.

CARVALHO, C. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, p.82-84, 2003.



CARVALHO, L.M. Potencial e Manejo de **Plantas Mediciniais** e Aromáticas na Agricultura.

O uso de **plantas mediciniais** tem sido prática consagrada na história da humanidade.

Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>> Acesso em: 13 fev. 2006.

CASTELLUCCI, S. et al. Plantas mediciniais relatadas pela comunidade residente na estação ecológica de Jataí, município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.1, p.51-60, 2000.

CAVERT, C.A. Canine viral papillomatosis. In: GREENE, E.C. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.288-290, 1990.

CHRISTENSEN, N. D. R. et al. Combination treatment with intralesional cidofovir and viral-DNA vaccination cures large cottontail rabbit papillomavirus-induced papillomas and reduces recurrences. **Antimic. Ags. Chem.** v.45, p.1201-1209, 2001.

COOK, H. R.; OLSON, C. Experimental transmission of cutaneous papiloma of the horse. **Am. J. Pathol.**, v.27, p. 1087-1097, 1951.

CRUM, C. P. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. **Mod Pathol.** v.13, p.243 – 251, 2000.

COSTA-NETO, E. M.; OLIVEIRA, M. V. M. The Use of Medicinal Plants in the Country of Tanquinho, State of Bahia, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2000.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: The Use of Medicinal Plants in the Country of Tanquinho, State of Bahia, Northeastern Brazil. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, Cap.8, p.233-295.

DeVILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v.324, p.17-27, 2004.

DORIGONI, P. A. et al. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.4, n.1, p.69-79, 2001.

DUAN, J. W. Et al. Topical effects of cidofovir on cutaneous rabbit warts: treatment regimen and inoculum dependence. **Antivir. Res.** v.46, p.135-144, 2000.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Guanabara-Koogan, 3ª edição, 2000. p.743.

FIORAVANTI, M. C. S. et al. Papilomatose cutânea bovina: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, v.22, n.127, p.27 – 31, 2002.

GAZETA MERCANTIL. Balanço anual, 30/jun/2003 – ano XXVI – n. 26 – Publicação anual.

GIOVANNELLI, L. *et al.* Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p.833-836, 2002.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.249-257, 1997.

GOLDSHMIDT, M.H. *et al.* **Tumors of the skin and soft tissues**. In: Meuten, D.J. editors, Tumors in Domestic Animals (4 th edit), Iowa station Press, Ames (2002), pp. 45-117.

GUÉRIN, B.; LE, G.; THIBIER, M. A secure health status associated with the production and trade of in vitro derived cattle embryos. **Livestock Production Science**, v.62, p.271-285, 2000.

HAYFIELD, R. **Vida nova: Homeopatia. Remédios simples para uma saúde natural**. Lisboa: editora estampa Ltda, 1999. p.307.

HAYWARD, M. *et al.* Filiform squamous papillomas in sheep (OSP) Clinical features, histology, immunochemistry, transmission experiments and analysis of papillomavirus DNA. 11th International Papillomavirus Workshop, Edinburgh, p. 77, 1992.

HEMMATZADEH, F.; FATEMI, A.; AMINI, F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. **J. Vet. Med. B.**, v.50, p.473-476, 2003.

HILLERTON, E. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 2. infectious factors and infections. Teat Club International. **Second International Symposium on Mastitis and Milk Quality, Vancouver**, Canada, pp352-356, 2001.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Curso de Atualização – Aplicação da PCR em Laboratório Clínico e Medicina Forense**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário, 2001 – 2003.

JORGE, J. P. N. et al. Tratamento-Abordagem no Homem e na Mulher. In: CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. (ED). **I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus Humano**. São Paulo: BG Cultural, p. 111-128, 2000.

JUBB. K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of domestic animals. v.1, 4<sup>th</sup> end. Academic Press, San Diego, pp.708–710, 1993.

KATZUNG, B. G. Basic and clinical pharmacology, 7<sup>th</sup> edn. **Appleton and Lang publication**, USA, 1999. p.269.

KIDD, J. G. The course of virus-induced rabbit papillomas as determined by virus, cells, and host. **J. Exp. Med.**, v.67, p.551-574, 1938.

KNOWLES, G.; et al. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. **Journal of Virology**, v.70, p.8451-8458, 1996.

KREIDER, J. W. Studies on the mechanism responsible for the spontaneous regression of the Shope rabbit papilloma. **Cancer Res.**, v.23, p.1593-1599, 1963.

LAIRD, S. A.; KATE, K. T. Biodiversity prospecting: the commercial use of genetic resources and best practice in benefit-sharing. In: LAIRD, S. (Org.). Biodiversity and traditional knowledge: equitable partnerships in practice. London: Earthscan Publications Ltd., 2002. p.241-286.

LANCELLOTTI, C. L. P.; et al. Diagnóstico Laboratorial. In: CARVALHO, J.J.M.; OYKAWA, N. **I Consenso Brasileiro de HPV**. 1. ed. São Paulo, BG Cultural, 2000. p.45–60. 142 p.

LATHOUD, J. A. **Matéria médica homeopática revisada e atualizada**. Buenos Aires: Editorial Robe, p.577-582, 2002.

LE, N.J. et al. Multiple pigmented cutaneous papules associated with a novel canine papillomavirus in an immunosuppressed dog. **Vet. Pathol.** v.34, p.8-14, 1997.

LEVKUTOVÁ, M. et al. Subpopulation of lymphocytes in cattle naturally infected with papillomavirus. **Acta Vet Hung**, v.46, n.1, p.13-18, 1998.

LIMA, L. A. et al. Uso de produtos a base de algas marinhas no controle da papilomatose bovina. **Primeira Semana de Iniciação Científica da Embrapa e XII Semana de Iniciação Científica da UFG**. 2004.

LUKE, S; KAUL, K. Detection of breast cancer in blood using immunomagnetic bead selection and reverse transcription – polymerase chain reaction. **Molecula Diagnosis**, v.3, n.3, p. 149-155, 1998.

MACIEL, M. A. M. et al. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**. São Paulo, v.25, p.3, 2002.

MARTINS, C. E. et al. Competitividade da cadeia produtiva de leite no Brasil. **Revista da Política Agrícola**. Ano XIII – N.º 3 – jul/Ago/Set. 2004.

MATOS, F. J. Os riscos das plantas medicinais. **Jornal Diário de Fortaleza**, Fortaleza, 14 março, p.12, 1999.

MEDEIROS, L. C. M.; CABRAL, I. E. O cuidar com plantas medicinais: uma modalidade de atenção à criança pelas mães e enfermeira-educadora. **Revista Latino Americano Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 18-26, jan., 2001.

MELO, C.B.; LEITE, R. C. Papilomatose bovina. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.6, n.1, p.1-12, jan/abril, 2003.

MENDONÇA, M. L; JOAQUIM NETTO, C.A. Importância da infecção pelo papilomavírus Humano em pacientes do sexo masculino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissível**, v.17, n.4, p.306-310, 2005.

MENEZES, H.; BERTOLA, E. A. Interrelação entre nutrição e imunidade. Nutrição em pauta -o site do profissional de nutrição. 2001. Disponível em: <http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/49//nutrihospitalar.html>. Acesso em: 20/07/2006.

MEYERS S. A, READ W. K: Squamous cell carcinoma of the vulva in a cow. **J.A.V.M.A.**, v.196, p.1644-1646, 1990.

MILLER, D. M. BRODELL, R. T. Human papillomavirus infection: treatment options for warts. **Am Fam Physician.**, v.53, p.135 – 143, 1996.

MORGAN, I. M.; CAMPO, M. S. Recent Developments in Bovine Papillomaviruses. **Papillomavirus Report**, v.11, p.127-132, 2000.

MOULTON J. E. (2002). Tumors in domestic animals, University of California Press, London. 252p.

MS (Ministério da Saúde), 2006. **Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006**. Brasília: Informativo SBF, mai/jun, 2006. Secretaria de Vigilância Sanitária.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P.; HORZINEK, M. C.; M. J. STUDDERT, 1999: **Veterinary Virology**, 3rd edn. Academic press, London. n.3, p.137-140, 1999.

MUTIRANGURA, A. Serum/plasma viral DNA. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.945, p.59-67, 2001.

NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses.

**Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, p. 101 – 127, 2000.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia**

**Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p 10-13, 2004.

O'CONNOR, S. J.; EVANS, P. A.; MORGAN, G. J. Diagnostic approaches to acute

promyelocytic leukemia. **Leukemia and Lymphoma**. v.33, n.1-2, p.53 – 63, 1999.

OFFERGELD, R. et al. Mitogenic Activity of high molecular polysaccharide fractions

isolated from the Cupressaceae *Thuya occidentalis* L. enhanced cytokine- Production by

Thyapolsaccharide, G. Fraction (TPSg),. **Leukemia**, v.6, suppl.3, p.189-191, 1992.

OGAWA, T. et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas

and healthy teat skin. **J. Gen. Virol.**, v.85, p.2191-2197, 2004.

OKABAYASHI, M. et al. Morphometric analysis and identification of infiltrating leucocytes

in regressing and progressing Shope rabbit papillomas. **Int. J. Câncer**, v.49, p.919-923, 1991.

OLIVEIRA, M. C. et al. Aspectos morfológicos que sugerem a presença do papilomavírus

humano (HPV) em lesões do epitélio de revestimento da mucosa oral. **Revista Brasileira de**

**Patologia Oral**, v.2, n.2, p.34-43, 2003.



OLIVEIRA, M. C. et al. Tongue squamous cell carcinoma: relationship between argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORS) and histopathologic grading. **Applied Cancer Research**, v.25, n.1, p.20-24, 2005.

OLSON, C. **Papillomaviruses**. In: Virus infections of ruminants. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. B. V., 1990, 572p.

ONG C. K, BERNARD H. U, VILLA L. L. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of Amazonian Indians. **J Inf Dis.**, v.170, p.1186-8, 1994.

ORTH, G. D. V. M et al. Identification of papillomaviruses in butcher's warts. **The journal of investigate dermatology**, v.76, p.97-102, 1981.

OTTEN, N. et al. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. **Arch Virol**, v.132, p. 121-131, 1993.

PARISH, W. E. A transmissible genital papilloma of the pig resembling condylomata acuminatum of man, **J. Pathol. Bacteriol.** v.81, p.331-345, 1961.

PINTO, A. P.; COLLAÇO, L. M. **Revisão das alterações citomorfológicas da infecção pelo vírus do papiloma humano em citologia cervicovaginal**. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v.37, n.1, p.57-61, 2001.

RAMOS, P.; PELETEIRO, M. C. Três casos de neoplasia espontânea em peixes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 98, p. 77 – 80, 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v.39, p.603 – 613, 2001.

REBHUN, W. C.; GUARO, C.; RICHARDS, C. M. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: ROCA, 2000. 642p.

READ, S.J.; KURTZ, J.B. Laboratory diagnosis of common viral infections of the Central Nervous System by using multiplex PCR screening assay. **Journal of clinical microbiology**, v.37, n.5, p.1352-1355, 1999.

REID, S. W. J.; NASIR, L. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. **Virus Res.**, v.61, n.2, p.171-175, 1999.

RENNEBERG, H. FRIEDETZKY, A. KONRAD, L. Prostate specific membrane antigen (PSM) is expressed in various human tissue. **Urological Research**, v.27, n.1, p.23-27, 1999.

RIZZO, J. A. et al. Utilização de Plantas Mediciniais nas Cidades de Goiás e Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 431-437, 1999.

ROBBINS, S. L. et al. **Fundamentos de patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 766p.

RODRIGUES, M. A. M.; CAMARGO, J. L. V. Carcinogênese. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4 ed. Belo Horizonte: Atheneu, 1999. p. 223 – 240. p. 320.

RODRIGUÉZ, P. et al. *Thuja* (200 CH, 1000 CH) en el tratamiento de la papilomatosis - **Revista Electrónica de Veterinária- REDVET**-<http://WWW.veterinaria.org/revistas/redvet>- acessado em 05/01/2006, vol. VI, nº 6, Junio 2005.

ROEDER, R. Promoção da agricultura em regiões semi-áridas do Nordeste (Piauí) Brasileiro: pesquisa sobre a pecuária nos planaltos da chapada. Teresina: DNOCS - 1ªDR, Eschborn: GTZ, 1998. 125 p. (DNOCS/GTZ. Projeto: 78.2198.6).

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**.3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.

ROTELI-MARTINS C.M. et al. Morphological diagnosis of HPV lesions and cervical intraepithelial neoplasms (CIN) is highly reproducible. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol.**, v.28, n.2, p.78-80, 2001.

SCOTT, D. W.; ANDERSON, W. I. Bovine Cutaneous Neoplasms: literature review and retrospective analysis of 62 cases (1978 to 1990). **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.** v.14, n. 10, 1992.

SCHUCH, L. F. D. **Papilomatose Bovina**. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, p. 115 – 118. p.651, 1998.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncology**, v.38, p.227-234, 2002.

SERAVALLE L. Introdução à discussão sobre o ensino de práticas alternativas em saúde. **Saúde Debate** v.51, p.82-8, 1996.

SHAH K. V. Biology of genital tract. Human papillomaviruses. **Urol clin N Amer**, 1992; 19(1): 63-69.

SHEALY, NORMAN. **Enciclopédia ilustrada de remédios naturais**. Barcelona: editora Konemann, 1999, 193p.

SILVA, E. D. C et al. Papiloma vírus humano: uma revisão. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, v. 36, n.3, p.137-142, 2004a.

SILVA, L. A. F. et al. Avaliação da eficiência de diferentes tratamentos da papilomatose cutânea bovina. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 10, n. 2, p. 35-41, 2004b.

SILVA, L. A. F. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguaiana**, v.11, n.1, p. 61-76, 2004c.

SILVA, L. A. F. et al. Papilomatose bovina: comparação e avaliação de diferentes tratamentos. **A Hora Veterinária**, n. 121, p. 55-60, 2001.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre-Florianópolis Editora UFRGS, 5ª edição, 1097p, 2004.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: MANOLE, 1994. 738p. v.2.

SOARES PC, et al. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.35, n.5, p.439-44, 2002.

SOUTO, M. A. M. et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consume espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesq. Vet. Bras**. v.26, n.2, p. 112–122, jan/mar, 2006.

STEINER, G.; REINSCHMIDT, G; MULLER, S. C. Molecular genetic diagnostic of and recurrent bladder cancer. **Electrophoresis**. v.20, n.2, p.280-282, 1999.

STEP, D. L. et al. Urinary bladder transitional cell papilloma in a shorthorn heifer. **Can Vet. J.**, v.41, p.794-797, 2000.

STRINGFELLOW, D. A. et al. **Virology**. Michigan: Upjohn, 1988. p. 139.

SUNDBERG, J. P.; CHIODINI, R. J.; NIELSEN, S. W. Transmission of the white-tailed derrick cutaneous fibroma. **Am. J. Vet. Res.** 46, 1150-1154, 1985.

SUNDBERG, J. P.; RUSSEL, W. C.; LANCASTER, W. Papillomatosis in Indian elephants. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 179, 1247-1248, 1981.

SUZUKI, O. **O Mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil**. In: SCHULZ, V; HANSEL, R.; TYLER, V. E. Fitoterapia racional. 4. ed. (1.ed. brasileira), São Paulo, editora Manole, pp. 205-220, 2002.

THEILEN, G. et al. Goat papillomatosis. **Am. J. Vet. Res.** v.46, p.2519-2526, 1985.

TEODORO, R. L. et al. Cruzamentos. In: VALENTE, J. et al. Melhoramento genético de bovinos de leite. Juiz de Fora, **Embrapa Gado de Leite**, pp. 89-104, 2001.

TERAI, M.; TAKAGI, M. Human papillomavirus in the oral cavity. **Oral Med Pathol**, v. 6, p. 1-12, 2001.

TSE, H. M.; MILTON, M. J.; PIGANELLI, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 36, p. 233-247, 2004.

TUROLLA, M. S.S ; NASCIMENTO, E. S.. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 2, 2006.

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. [HTTP://www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov) - Acesso em 03/11/04, 08/02/05.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). San Diego: Academic Press, 2000. 1167p.

VEIGA, V. M. O. et al. Avaliação de tratamento químico da papilomatose cutânea bovina. **Rev. Bras. Med.Vet.**, v.22, n.2, p.74-77, 2000.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.361-372, 2005.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R., CARNEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v.13, supl.2, p.64-66, 2003.

VILELA, D. et al. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e esperança alimentar. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, p. 184, 2001.

VIRUS TAXONOMY: Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>>. Acesso em 02/12/2006.

WADHWA, D. R. et al. Efficacy of auto-immunization in bovine cutaneous papillomatosis.

**Indian Vet J**, v.71, p.971-972, 1995.

WELLENBERG, G. J. et al. Viral infection and bovine mastitis: a review. **Vet. Mic.**, v.88,

p.27-45, 2002.

WILLIAM, B. J. et al. Survey on incidence and complications of bovine cutaneous

papillomatosis. **Indian Vet. J.**, v.69, p.843-844, 1992.

WILSON, W. R. et al. Intralesional cidofovir for recurrent laryngeal papillomas: preliminary

report. **Ear Nose Throat J.**, v.79, p.236-238, 2000.

WOSIACKI, S. R. **Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia polimerase e estudo histopatológico**

102p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Londrina, 2002.

WOSIACKI, S. R. et al. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine *Papillomavirus*

type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of**

**Virological Methods**, v.126, p.215-219, 2005.

YOKOTE, M. Skin. In: **An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features.**

Editores: Fumio Takashima e Takashi Hibiya. 2ª edição. Kodansha, Ltd. Tokyo, Japan, 8-17,

1995.



YOUNGKIN, E. Q. K. J et al. Pharmacotherapeutics, a Primary Care Clinical Guide.  
**Appleton and Lange Company**, USA, 1999.

## *Artigo I*

### **DESCRIÇÃO CLÍNICA DA PAPILOMATOSE CUTÂNEA BOVINA (BPV) E AVALIAÇÃO DA *Thuya occidentalis* TINTURA MÃE (T.M.) NA BPV**

## **DESCRIÇÃO CLÍNICA DA PAPILOMATOSE CUTÂNEA BOVINA (BPV) E AVALIAÇÃO DA *Thuya occidentalis* TINTURA MÃE (T.M.) NA BPV**

## **CLINICAL DESCRIPTION OF BOVINE CUTANEOUS PAPILLOMATOSIS (BPV) AND EVALUATION OF *Thuya occidentalis* MOTHER-TINCTURE (T.M.) IN BPV**

Vanda Lúcia da Cunha MONTEIRO<sup>1</sup>; Adriano da Silva CARNEIRO<sup>2</sup>; Rafaella Alves de Araújo SILVA<sup>3</sup>; Miriam Nogueira TEIXEIRA<sup>4</sup>; Maria Cristina de Oliveira Cardoso COELHO<sup>5</sup>; Almir Gonçalves Wanderley<sup>6</sup>

### **RESUMO**

A papilomatose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa cosmopolita freqüente, principalmente em bovinos leiteiros. Com o objetivo de descrever clinicamente a papilomatose cutânea bovina (BPV) e avaliar o efeito terapêutico da *Thuya occidentalis* tintura mãe (T.M.) sobre a BPV, foram utilizados 40 bovinos leiteiros, mestiços de holandês, com papilomas cutâneos. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos. Os grupos 1 e 2 receberam solução de cloreto de sódio a 0.9% e álcool de cereal, respectivamente, sendo estes considerados controles e os grupos 3 e 4 receberam os medicamentos fitoterápicos *Thuya occidentalis* (Simões®) tintura mãe (T.M.) a 30% e *Thuya occidentalis* tintura mãe a 30% com própolis, respectivamente. Os animais receberam, diariamente por via oral, 10mL dos produtos durante 63 dias. Durante o experimento verificaram-se papilomas presentes no abdômen lateral, barbela e focinho, apresentando lesões mistas seguidas de basais. Em relação ao tratamento, a regressão parcial e ou total não foi observada em nenhum grupo, não ocorrendo alterações macroscópicas de remissão, coloração e consistência. Pode-se concluir que o uso das tinturas a 30% de *Thuya occidentalis* (Simões®) e *Thuya occidentalis* com própolis, nas condições experimentais utilizadas neste estudo, não provoca remissão de papilomas em bovinos leiteiros e que as dosagens séricas de

---

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária (PPGCV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Departamento de Medicina Veterinária (DMV). E-mail: vandamonteiro@yahoo.com

<sup>2</sup> Médico Veterinário autônomo

<sup>3</sup> Discente do Curso de Medicina Veterinária UFRPE, Bolsista CNPq.

<sup>4</sup> Médica Veterinária, Professora Adjunto DMV/ UFRPE.

<sup>5</sup> Médica Veterinária, Professora Adjunta Orientadora DMV/UFRPE.

<sup>6</sup> Farmacêutico, Professor Adjunto Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

AST, GGT, uréia e creatinina revelaram que a planta utilizada não foi capaz de causar alterações hepáticas e renais em bovinos com papilomatose cutânea, durante o período estudado.

**Palavras chave:** papilomatose bovina, *Thuya occidentalis*, fitoterapia.

## SUMMARY

The bovine cutaneous papillomatosis is a cosmopolitan, frequent infect-contagious disease, mainly in dairy cows. Owing to clinically describe the bovine cutaneous papillomatosis (BPV) and evaluate the therapeutic effect of *Thuya occidentalis* mother tincture (T.M.) on BPV, were used 40 dairy bovines, Holstein Friesian crossbred, with cutaneous papilloma. The animals were divided at random in four groups. The groups 1 and 2 received sodium chloride solution at 0.9% and cereal alcohol, respectively, being these groups considered control and the groups 3 and 4 received the phytotherapeutic medicines *Thuya occidentalis* (Simões®) mother tincture (M.T.) at 30% and *Thuya occidentalis* mother tincture at 30% with propolis, respectively. The animals received, daily by oral via, 10mL of the products for 63 days. During the experiment there were observed papillomas on the lateral abdomen, dewlap and snout, exhibiting mixing lesions followed by basal. Regarding to the treatment, the partial or total regression was not observed in any group, occurring no macroscopic alterations of remission, color and consistence. It may be concluded that the use of the tinctures at 30% of *Thuya occidentalis* (Simões®) and *Thuya occidentalis* with propolis, on the experimental conditions used in this study, does not cause remission of papillomas in bovine dairy herd and that the serum dosage of AST, GGT, urea and creatinine showed that the used plant was not able to cause hepatic and renal alterations in bovine with cutaneous papillomatosis, during the studied period.

**Key Words:** bovine papillomatosis, *Thuya occidentalis*, phytotherapy

## 1 INTRODUÇÃO

A papilomatose bovina (PB) é uma enfermidade tumoral benigna, causada por um vírus de natureza fibroepitelial, caracterizada por alterações na pele e nas mucosas. Infecta as células basais do epitélio, formando projeções digitiformes microscópicas ou macroscópicas, estando presente em muitos animais e seres humanos (SILVA, 2004). A PB, da mesma forma que os papilomavírus que infectam os seres humanos, é causada por um vírus da família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus*, espécie *Bovine papillomavirus*-BPV, (CAMPO, 2006).

Dentre várias enfermidades que acometem os animais, principalmente os bovinos, a papilomatose apresenta-se importante, visto que os danos causados pelas lesões proliferativas na pele e mucosa conduzem a queda na produção leiteira, desvalorização dos animais a serem comercializados e depreciação do couro. Os animais podem, também, desenvolver extensos papilomas no trato gastroentérico superior e, conseqüentemente, apresentarem dificuldade para se alimentar e respirar, podendo ficar debilitados e virem a óbito (CAMPO, 1997; WELLENBERG et al., 2002; MELO e LEITE, 2003).

Os papilomas são observados, topograficamente, em regiões específicas e apresentam características com particularidades morfológicas macro e microscópicas, sendo causadas por cepas distintas de *Papilomavirus* (BPV1, 2, 3, 4, 5, 6) e não havendo, até o momento, imunidade cruzada entre as mesmas (LEUKUTOVÁ et al., 1998).

Depois do crescimento progressivo inicial do tumor, em animais imunologicamente ativos procede-se a regressão espontânea em até 12 meses (CAMPO, 2002). A regressão espontânea das verrugas permitiu muitas dúvidas sobre o tratamento, visto que a doença é autolimitante, dependendo da fase, tipo e localização dos papilomas; no entanto, na maioria das vezes o tratamento é necessário, para evitar perdas econômicas ou quando há uma grande quantidade de animais acometidos ou mesmo quando o número de papilomas é muito grande, sendo necessário realizar tratamentos sistêmicos e/ou tópicos (VEIGA, 2000).

Entre os diversos tipos de plantas medicinais pode-se mencionar a *Thuya occidentalis*. Esta árvore exsuda óleo volátil, contendo thuiona, cetona aromática bem como os glicosídeos, pinicrina e tujina. Suas ações parecem estar relacionadas ao óleo volátil, que é estimulante e purificador do sangue. Possui também atividade mitogênica, inibe os antígenos do HIV-1 e a transcriptase reversa, induzindo subgrupo de células T e de várias citocinas *in vitro* (OFFERGELD et al., 1992); além disso, é utilizada para verrugas, condilomas e papilomas das aves em geral (galinhas, perus, patos, pássaros de gaiola e viveiro) em todas as fases da criação (ARENALES, 2002).

Diante da importância da papilomatose na saúde animal e a procura por alternativas terapêuticas eficazes e simples, este trabalho teve por objetivo descrever clinicamente a papilomatose cutânea bovina (BPV) e avaliar o efeito terapêutico da *Thuya occidentalis* tintura mãe (T.M.) sobre a BPV.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento o projeto foi encaminhado à Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de

Pernambuco (UFRPE), sendo iniciado após análise e parecer favorável para seu desenvolvimento.

### 2.1 Material Botânico:

Tanto a coleta como a fabricação e distribuição da medicação fitoterápica para experimentação foi feita pelo PROVETS Simões Laboratório (São Paulo/SP).

### 2.2 Local do Experimento

O experimento foi desenvolvido na fazenda de beneficiamento de leite, localizada a 182 km de Recife-PE e no DMV da UFRPE, no período de outubro de 2004 a junho de 2006.

### 2.3 Animais e instalações

Foram incluídas no estudo 40 fêmeas mestiças de holandês, nulíparas, primíparas e múltíparas, com idade variando de 8 meses a 3 anos, oriundas da mesma propriedade e que apresentavam diferentes tipos de papilomas cutâneos: típicos, atípicos, atípicos engastados, filamentosos localizados na glândula mamária e misto (MOLINEROS e ROJAS, 1999; CAMPO, 2002; SANTIN e BRITO, 2004). Os animais mantiveram-se em sistema semi-intensivo de criação, onde receberam brincos de identificação.

A alimentação constou de volumoso à base de capim elefante (*Penisetum purpureum*) adicionado de melaço e concentrado de farelo de milho e soja<sup>2</sup>, a qual foi oferecida duas vezes ao dia (400g/d), além de água e sal mineral comercial<sup>1</sup> para bovinos oferecidos *ad libitum*.

### 2.4 Avaliação dos Animais e Papilomas

Os animais foram avaliados no início do experimento, momento zero (M0), considerando-se parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos séricos, parasitológicos de fezes, reprodutivos e manejo, além dos aspectos macroscópicos dos papilomas quanto ao tipo, cor, localização, tamanho, aspecto e quantidade assim definidos para este estudo: leve (25% do corpo afetado), moderado (com 50% do corpo afetado) e intenso (com mais de 50% do corpo afetado).

Preconizou-se um período de uma semana sem a administração de nenhum tipo de medicação, tópica ou sistêmica, antes do recebimento dos produtos a serem testados.

### 2.5 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em quatro grupos, com dez animais em cada grupo:

---

<sup>2</sup> Supranor- Recife, PE

**Grupo 1 (G1)**- Controle- Administração oral diária de 10mL de solução de cloreto de sódio a 0.9% (v/v);

**Grupo 2 (G2)**- Controle 1- Administração oral diária de 10mL de álcool de cereal (v/v). O álcool de cereal foi o veículo utilizado na fabricação dos medicamentos fitoterápicos;

**Grupo 3 (G3)**- Tratado- Administração oral diária de 10mL do produto *Thuya occidentalis* (Simões®) tintura mãe (T.M.) a 30%;

**Grupo 4 (G4)**- Tratado 1- Administração oral diária de 10mL do produto testado *Thuya occidentalis* T.M. a 30% com própolis.

O tratamento foi suspenso (tratado e controle) com no máximo 63 dias, considerado momento final (MF), ou antes, caso houvesse a regressão total dos papilomas.

## 2.6 Avaliações Clínicas

Os animais foram avaliados a intervalos de sete dias, totalizando oito observações (63 dias), considerando o estado geral do animal e do aspecto macroscópico dos papilomas (tipo, cor, localização, tamanho, quantidade e aspecto).

Em todos os animais após o exame clínico sistemático amostras de sangue, urina e fezes foram coletadas de 15 em 15 dias e encaminhadas aos laboratórios de Patologia Clínica Veterinária e Doenças Parasitárias do DMV/UFRPE para processamento dos exames: hemograma, prova de função hepática (Gama-Glutamiltransferase e Aspartato Aminotransferase) e renal (Uréia e Creatinina) e parasitológico de fezes.

Os animais foram contidos em brete, onde amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, mediante uso do sistema Vacutainer (Becton Dickison Ind. Cirúrgicas Ltda, Brasil), utilizando-se tubos com solução anticoagulante (etileno-diamino-tetracetato de sódio - EDTA a 10%) e sem anticoagulante.

Para a obtenção do soro, o sangue foi mantido à temperatura ambiente por 5 minutos para retração do coágulo e, em seguida, centrifugado a 3000rpm durante 20 minutos. O soro foi transferido para frascos de polietileno onde foram armazenados em alíquotas de 1,5 mL e conservados imediatamente a -4°C, até o momento do processamento.

Para a determinação da carga parasitária e identificação dos parasitos, 5g de fezes foram coletados, em seguida, foram acondicionados em caixas isotérmicas e conduzidos ao laboratório para análise de OPG, pelo método McMaster (OPG), seguindo metodologia descrita por Urquhart (1998).

Os dados foram tabelados e agrupados em médias para apresentação gráfica. Contrastes de médias foram feitas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade (SAMPAIO, 1998).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais dos grupos (controles e tratados) apresentaram, na fase inicial (M0) e final (MF) do estudo, papilomas de formas e aspectos distintos. Este resultado foi verificado através do aspecto macroscópico, onde se observou saliência sólida da epiderme nas formas típico (pedunculado), atípico (basal), atípico engastado e filamentosos (papilomas cutâneos localizados na glândula mamária), conforme ilustrado na figura 1.



FIGURA 1. Tipos de papilomas observados no M0 em todos os grupos (seta). A - papiloma de pele típico mostrando o aspecto de “couve-flor”. B - papiloma de pele atípico, caracterizado por aspecto rugoso, infecção geral no dorso. C - papiloma atípico engastado, semelhante a uma reação alérgica, com presença de pêlos, mostrando a formação globosa e encapsulada. D - papiloma filamentosos localizados na glândula mamária, notar o aspecto fibroso.



Assemelhando-se aos relatos de Molineros e Rojas (1999); Campo (2002) e Santin e Brito (2004), que descreveram que os papilomas podem se apresentar sob formas variadas: como típicos-com aspecto semelhante ao de uma couve-flor, tendo base de inserção ampla ou estreita, o que atribui aspecto pedunculado, bastante firme, às vezes duro como unhas e chifres; atípicos - com aspecto achatado, plano, com lesões circulares, base ampla, não formam pedículos; atípicos engastados- com formação globosa encapsulada, bem delimitada e profunda; e papilomas filamentosos de úbere com implantação basal fina, superfície extremamente queratinizada, plumoso ou de “grão de arroz”, conferindo aspecto fibroso.

De acordo com os dados apresentados na figura 2, o tipo mais comumente verificado nos grupos foi o misto, seguidos de basais. Estes resultados contrariam os achados da maioria dos autores (VEIGA, 2000; SANTIN e BRITO, 2004; SILVA, 2004), que descrevem que o papiloma mais comumente verificado nos bovinos é pedunculado, principalmente em animais jovens, seguidos de basais e mistos.

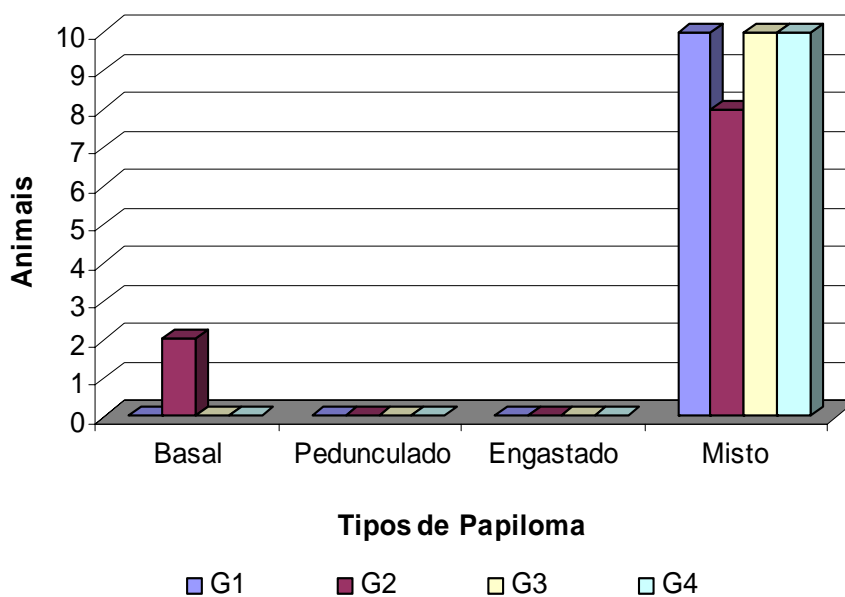


FIGURA 2. Frequência absoluta dos tipos de papiloma encontrados nos diferentes grupos experimentais, no M0 e MF.

Tais observações se justificam porque os papilomas pedunculados são de fácil disseminação, pois os mesmos sangram facilmente (Fig. 3) e, conseqüentemente, infectam os animais sadios, através de contato direto, contaminando instalações, cercas, troncos, baias e mourões.



FIGURA 3. Sangramento intenso observado após lesão dos papilomas pedunculados.

Porém, Wadhwa et al. (1995) relataram que a incidência de papilomas mistos esteja mais presente nos animais do que descrevem as citações bibliográficas. Observações semelhantes foram reatadas neste estudo, onde se verificou que no período em que os animais foram tratados no cocho, onde o gado ficava muito aglomerado, a contaminação foi maior, já que ficavam confinados num espaço relativamente pequeno, conferindo maior contato e, conseqüentemente, favorecendo a ocorrência de novos casos em animais hígidos, determinando, com isto, a disseminação do vírus.

Verificou-se, em todos os grupos (controle e tratado), que 30/40 animais apresentaram lesões isoladas, o que leva a entender, provavelmente, referir-se aos fibropapilomas (BPV-1, 2 e 5), já que, de acordo com vários autores (SCHUCHU, 1998; VAN REGENMORTEL et al., 2000; CAMPO, 2006), estes tipos são os principais agentes de papilomas cutâneos, podendo também ser encontrados nos tetos e no pênis e em excrescências em forma de “grão de arroz” no úbere.

Apenas 10/40 dos casos apresentaram-se na forma múltipla, que se caracterizava pela presença de vários papilomas no mesmo local. Scott e Anderson (1992) e Campo (2006) relataram que tal fato pode ser explicado devido a transformações sub-epiteliais, causando acantose e hiperqueratose, levando a um aspecto irregular e múltiplo dos papilomas (Fig.4).



FIGURA 4. A seta ilustra papilomas cutâneos múltiplos localizados na barbeta em um animal do grupo 3 (tratado), no MF.

Em todos os grupos e momentos estudados, os papilomas apresentavam colorações bem definidas, variando do cinza ao preto nos típicos e atípicos, e rosa nos papilomas filamentosos localizados na glândula mamária. As verrugas basais estavam bastante aderidas, caracterizando-se por base ampla e aspecto arredondado, áspero e rugoso.

Observou-se que 90% dos papilomas eram cinza (Fig. 5), estando de acordo com William et al. (1992), que descrevem que os papilomas podem se apresentar de coloração rosada, amarronzada, cinza claro ou escuro, justificando os resultados encontrados neste experimento.

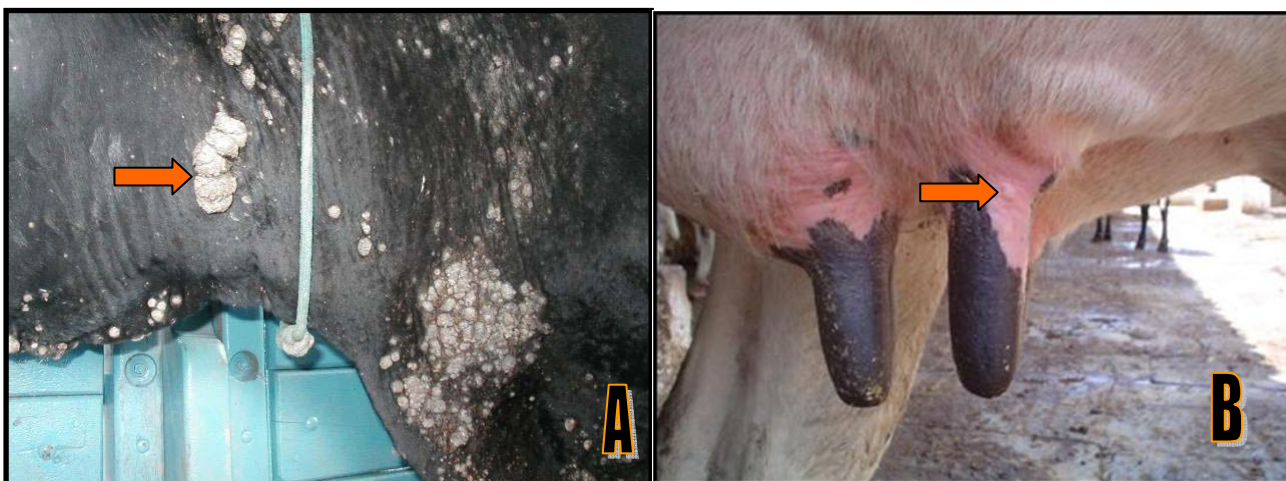


FIGURA 5. Cor dos papilomas nos grupos (seta), no momento inicial e final, cinza (A) e rosa (B).

Considerando a localização, observou-se que os locais mais frequentes foram: abdômen lateral (32/40), barbeta (27/40), focinho (26/40), orelha (25/40), escápula (24/40), pescoço, dorso anterior e glúteo (23/40), cabeça, abdômen ventral e teta (22/40), membros (19/40), úbere (17/40), ao redor do ânus (14/40), cauda (9/40), dorso anterior (7/40), ao redor

da vulva (5/40), interdigital (2/40) e generalizada (1/40). Vale salientar que os papilomas foram observados em vários locais em um mesmo animal.

Estes resultados se justificam devido à maior quantidade de irrigação sanguínea nestas áreas, visto que, estes sítios são traumatizados quando os animais atritam em cochos e mourões, favorecendo a proliferação do vírus, que servem de infecção para animais hígidos subseqüentemente introduzidos no piquete. Os resultados deste estudo corroboram com os achados relatados por Campo (1998); Silva (1998); Silva (2002) e Melo e Leite (2003) que verificaram uma maior quantidade de verrugas em determinados locais anatômicos mais irrigados.

Entretanto, Lobato e Birgel Jr. (2000) e Rebhun et al. (2000) relataram que os locais mais comumente encontrados são: cabeça, ao redor dos olhos, pescoço, barbela, tronco, membros, úbere, teta e pênis, e que papilomas no úbere e teta são raros em bovinos jovens, contradizendo os achados deste experimento, onde se verificou que 19/40 animais, com idade menor que dois anos apresentavam verrugas no úbere e/ou teta.

Estes resultados podem ser explicados, pois apesar do vírus ter predileção por áreas específicas, quando associados a determinados tipos, como, por exemplo, 5 e 6, podem se apresentar espalhados por todo o corpo, independentemente da idade, corroborando com os achados relatados por Fioravanti et al. (2002), Goldshmidt e Hendrick (2002) e Bloch, Sutton e Spradbrow (1994).

Verificou-se uma quantidade representativa no úbere (17/40) e nos tetos (22/40). Esta localização é importante, pois as verrugas podem obstruir completamente os tetos, principalmente, em vacas primíparas, afetando a higiene e o fluxo do leite, podendo ser facilmente lesadas e sangrarem, às vezes, profusamente, causando dor enquanto ordenhadas (WADHWA et al., 1995; HILLERTON, 2001). Esse achado também foi verificado em todos os animais dos grupos que apresentavam papilomas nesta área. Observou-se dificuldade de encaixar a ordenhadeira mecânica, assim como dor à manipulação, constatada por coice e cabeçadas.

Este fator pode ter contribuído para surgimento de mastite clínica em dois animais do grupo 4, pois pode ter criado, desta forma, obstrução do ducto, resultando em supressão do mecanismo de defesa natural e, conseqüentemente, predispondo à mastite (CAMPO, 1997; HEMMATZADEH et al., 2003).

Constatou-se que as lesões variavam de tamanho e quantidade, apresentando oscilações com média de 0,5 +/- 2 cm e ocorriam entre cinco até 300 papilomas por animal, sendo observado que quanto maior o número, menor era seu tamanho, concordando com as

observações feitas por Veiga et al. (2000). Quanto à intensidade, observou-se que 1/10 animal do grupo 2 foi classificada como intensa, 17/40 como moderada e 22/40 leve. É presumível que fatores específicos, tais como manejo, faixa etária e infestação por carrapatos, possam ter contribuído para tal frequência.

Constatou-se que 24/40 bovinos acometidos eram jovens, abaixo de dois anos de idade e 16/40 adultos, contrariando os achados de Willian et al. (1992), quando verificaram que de 58,1% de vacas acometidas por papilomas cutâneos, 27,9% eram adultos e 11,63% jovens.

Verificou-se um percentual elevado em todos os grupos de animais jovens e adultos, isto ocorreu, provavelmente, devido ao estresse ao qual foram submetidos, uma vez que as vacas compartilhavam o mesmo ambiente e rotina, dividiam o mesmo cocho e tinham pouco acesso à vegetação nativa. Estes fatores podem ter desencadeado a queda no sistema imunológico; favorecendo à perpetuação das verrugas, como sugerem Melo e Leite (2003) e Silva (2004).

Outro fator importante observado na propriedade foi à presença de infecção secundária, como dermatite pruriginosa e ferida com miíases, além de ectoparasitos (Fig. 6).



FIGURA 6. Ilustra a presença de enfermidades secundárias (seta). A- dermatite, B-ferida com miíase e C-ectoparasitoses (carrapatos), observados em vários animais com papilomatose, no M0 e no decorrer do tratamento.

Estes fatores estressam os animais e as tumorações tornam-se de aspecto desagradável, desvalorizando-os, causando complicações por feridas mecânicas com hemorragias, que ocorrem nos papilomas grandes ou nos aglomerados, podendo levar a transtornos tóxicos e septicemia. Estes relatos estão de acordo com Willian et al. (1992) e Fioravanti et al. (2002), que descrevem que tais alterações podem cronificar a enfermidade, fazendo com que a mesma perdure por meses ou anos.

No momento final (MF), dois animais (controle-G1 e tratado-G3), dos 40, apresentaram papilomas interdigitais, o que levou, provavelmente, a problemas de

claudicação, perda de peso e diminuição da produção de leite. Como o tecido verrugoso observado na região assemelhava-se à forma clínica da papilomatose cutânea, é provável que este resultado esteja relacionado à pododermatite por papilomatose interdigital e não a pododermatite por outras origens. Situações semelhantes foram relatadas por Demirkan et al. (2000) e Marega (2001), durante experimentos em bovinos confinados.

Não foi observada regressão espontânea das lesões em nenhum grupo (controles e tratados) até a última avaliação (MF). Como os animais utilizados neste experimento eram cronicamente afetados pelo BPV, já que estavam com a virose há mais de 1 ano, é possível, ter ocorrido diminuição dos linfócitos T (CD4 e CD8) nos tecidos e, conseqüentemente, comprometendo a regressão espontânea dos papilomas. Os achados do presente trabalho corroboram com as afirmações de Leukutová et al. (1998), que relatam que na maioria dos animais com papilomatose a infecção persiste durante um ano, procedendo à regressão espontânea, caso contrário, indica imunodepressão.

Com relação às avaliações laboratoriais realizadas durante todo o período experimental, quando comparados os grupos controles (G1 e G2) com os tratados (G3 e G4), não foram identificados contrastes de médias ( $p > 0,05$ ) para o conjunto de variáveis da hematologia e bioquímica sérica dos animais com papiloma, em todos os momentos. Tais resultados se justificam, já que a resposta imunológica ocorre apenas em células epiteliais queratinizadas pela papilomatose, portanto, não causam alterações sistêmicas.

Quando se compara os 4 grupos ao intervalo hematológico e bioquímico sérico fisiológico para a espécie estudada (JAIN, 1993; KANEKO et al., 1997), verificou-se que a única alteração foi um leve aumento sérico das proteínas totais, porém, sem variação no volume globular. Possivelmente, este achado foi considerado fisiológico, pois os animais não apresentaram anemia e/ou desidratação, o que, provavelmente, deveu-se ao excesso de proteínas na dieta e a particularidade referente à raça; visto que, alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos podem ser influenciadas por fatores como idade, sexo, raça, clima e nutrição. Estes resultados corroboram com os achados de Souza (1997) e Fagliari et al. (1998), que relataram o aumento dos teores de proteína em bovinos sadios das raças holandesas puras e mestiças de girolando.

O uso da *Thuya occidentalis* (Simões®) tintura mãe (T.M.) a 30% e *Thuya occidentalis* tintura mãe (T.M.) a 30% com própolis não causaram efeitos tóxicos em nenhum animal no período estudado. Atribui-se esta observação aos valores séricos obtidos da Aspartato Aminotransferase (AST), Gama Glutamiltransferase (GGT), uréia e creatinina, pois, não houve alterações nestes parâmetros, sendo os mesmos indicados no controle das

funções hepática e renal, obtendo-se resultados semelhantes aos valores descritos por Roussel et al. (1997a;b) e Moraes et al.(2000) para bovinos sadios.

O exame coproparasitológico revelou, em dois animais do grupo tratado (G4), no Mo, um tipo de *Moniezia* e um tipo de *Strongyloidea* por grama de fezes. Este resultado não indicou alteração relevante em relação ao estado geral apresentado.

No presente estudo, a regressão parcial e total não foi observada nos grupos (controles e tratados), uma vez que durante as avaliações todos os animais não apresentaram alterações macroscópicas de remissão, tamanho, cor, quantidade e consistência. Este resultado indica que a medicação empregada não induziu uma resposta imunológica capaz de resultar na cura das lesões, apesar da planta possuir atividade mitogênica, sendo capaz de estimular subgrupo de células T e de várias citocinas *in vitro*, sendo estas células fundamentais na regressão dos papilomas (OFFERGELD et al., 1992).

Acredita-se que outros fatores podem ter influenciado o resultado do tratamento, inclusive a própria resposta imunológica do rebanho, a cronicidade do processo, a presença de papilomas mistos e condições estressantes, como manejo inadequado e ectoparasitoses e outras doenças infecciosas que possam comprometer a resposta imune dos animais. Vários autores relatam que a maioria dos insucessos deve-se à presença de papilomas típicos e atípicos, desnutrição, animais confinados e aglomerados, infestação por carrapatos, faixa etária e a própria resposta imunológica, causando uma menor resistência orgânica (WILLIAM et al., 1992; GRANDIN, 1997; MORGAN e CAMPO 2000; ARENALES, 2002; WELLENBERG et al., 2002).

Portanto, é possível que, a remissão desta virose não esteja relacionada somente aos protocolos de tratamentos utilizados, mas também a uma série de fatores extrínsecos e intrínsecos que interferem na capacidade do bovino em responder ao tratamento utilizado.

#### 4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a papilomatose cutânea em bovinos leiteiros apresenta predileção por áreas específicas. Os papilomas estavam mais presentes no abdômen lateral, barbela e focinho, apresentando lesões mistas, seguidos de basais.

O uso das tinturas a 30% de *Thuya occidentalis* (Simões®) e *Thuya occidentalis* com própolis, nas condições experimentais utilizadas neste estudo, não provocam remissão de papilomas em bovinos leiteiros;

As dosagens séricas de AST, GGT, uréia e creatinina revelaram que a planta utilizada neste estudo durante 63 dias não foi capaz de causar alterações hepáticas e renais em bovinos com papilomatose cutânea.



## 5 REFERÊNCIAS

ARENALES, M. C. Homeopatia em Gado de Corte- **I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte-02** de setembro a 15 de outubro de 2002.

BLOCH, N.; SUTTON, R. H.; SPRADBROW, P. B. Bovine cutaneous papillomas associated with bovine papillomavirus type 5. **Arch. Virol.**, v.138, p.373-377, 1994.

CAMPO, M. S. Review: bovine papillomavirus and cancer. **Vet. J.** 154, 175 – 188, 1997.

CAMPO, M.S. (1998). **Persistent infection by bovine papillomavirus**. In "Persistent Viral Infections" ed Rafi Ahmed, (John Wiley and Sons, end), pp503-516.

CAMPO, M. S. Animal model of papillomavirus pathogenesis. **Virus Res.**, p.89, p.249-261, 2002.

CAMPO, M.S. **Bovine papillomavirus: old system, new lessons?** In Campo, M.S. (Eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond, Chap 23. First published in Wymondham, England: Caister Academic Press (2006), pP.1-34.

DEMIRKAN, I. et al. Skin diseases of the bovine digit associated whit lameness. **Veterinary Bulletin**, Fanhan Royal, v. 70, n. 2, p. 149-171. 2000.

FAGLIARI, J.J.; SANTANA. A.E.; LUCAS, F.A. Constituintes sangüíneos de bovinos lactentes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de

bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.50, p.263-271, 1998.

FIORAVANTI, M. C.S. et al. Papilomatose cutânea bovina: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, v.22, n. 127, p. 27-31, 2002.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 249-257, 1997.

GOLDSHMIDT, M.H. et al. **Tumors of the skin and soft tissues**. In: Meuten, D.J. editors, **Tumors in Domestic Animals** (4 th edit), Iowa station Press, Ames (2002), pp. 45-117.

HEMMATZADEH, F.; FATEMI, A.; AMINI, F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. **J. Vet. Med. B.**, v.50, p.473-476, 2003.

HILLERTON, E. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 2. infectious factors and infections. Teat Club International. **Second International Symposium on Mastitis and Milk Quality, Vancouver**, Canada, 2001, pp352-356.

JAIN, N.C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993. 417p.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic, 1997. 932p.

LEVKUTOVÁ, M. et al. Subpopulation of lymphocytes in cattle naturally infected with papillomavirus. **Acta Vet Hung**, v.46, n.1, p.13-18, 1998.

LOBATO, Z.; BIRGEL, J. R. E. Verrugas atrapalham a produção. **Produtor Parmalat**, n.37, p.36-39, mar. 2000.

MAREGA, L. M. **Ocorrência e tratamento de lesões podais semelhantes à dermatite digital em bovinos**. 2001, 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MELO, C. B.; LEITE, R. C. Papilomatose bovina. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.6, n.1, p.1-12, jan/abril, 2003.

MORAIS, M.G.; RANGEL, J.M.; MADUREIRA, J.S. et al. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas anelradas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, p.98-104, 2000.

MOLINEROS, L.F.; ROJAS, N. Diagnóstico sanitário de la papilomatosis bovina em el Municipio de Popayán e alguns de sus alrededores. Popayán (Cauca): Universidad del Cauca, p.1-4, 1999.

MORGAN, I. M.; CAMPO, M. S. Recent Developments in Bovine Papillomaviruses. **Papillomavirus Report**, v.11, p.127-132, 2000.

OFFERGELD, R. et al. Mitogenic Activity of high molecular polysaccharide fractions isolated from the Cupressaceae *Thuya occidentalis* L. enhanced cytokine- Production by Thyapolsaccharide, G. Fraction (TPSg). **Leukemia**, v.6, suppl. 3, p.189-191, 1992.

REBHUN, W. C. et al. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: ROCA, 2000. 642p.

ROUSSEL, A.J.; WHITNEY, M.S.; COLE, D.J. Interpreting a bovine serum chemistry profile: part1. **Vet. Med.**, v.92, p.553-558, 1997a..

ROUSSEL, A.J.; WHITNEY, M.S.; COLE, D.J. Interpreting a bovine serum chemistry profile: part 2. **Vet. Med.**, v.92, p.559-566, 1997b.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SANTIN, A. P. I.; BRITO, L. A. B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros. **A Hora Veterinária**, ano 23, nº. 136, novembro/dezembro, 2004.

SCOTT, D. W.; ANDERSON, W. I. Bovine Cutaneous Neoplasms: literature review and retrospective analysis of 62 cases (1978 to 1990). **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.** V.14, n. 10, 1992.

SCHUCH, L. F. D. **Papilomatose Bovina**. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. Doenças de Ruminantes e Equinos. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, 1998. p. 115 – 118. p.651.

SILVA, L.A.F. Haja casco para tanta doença. **Revista Produtiva**, Goiânia, v. 3, n. 22, p. 17-21, 1998.

SILVA, L. A. F. et al. Papilomatose cutânea bovina: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 127, p. 27-31, 2002.

SILVA, L.A.F. et al. Avaliação da eficiência de diferentes tratamentos da papilomatose cutânea bovina. **Veterinária Notícia**, Uberlândia, v. 10, n. 2, p. 35-41, 2004.

SOUZA, P. M. **Perfil bioquímico sérico de bovinos das raças Gir, Holandesa e Girolanda, criados no Estado de São Paulo** - influência de fatores de variabilidade etários e sexuais. 1997. 247 f. Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

URQUHART, G.M. **Parasitologia Veterinária**, 2º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998 2º ed, p, 4, 36-40, (1998).

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). San Diego: Academic Press, 2000. 1167p.

VEIGA, V. M. O. et al. Avaliação de tratamento químico da papilomatose cutânea bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.22, n.2, p.74-77, 2000.

WADHWA, D. R. et al. Efficacy of auto-immunization in bovine cutaneous papillomatosis. **Indian Vet J**, v.71, p.971-972, 1995.

WELLENBERG, G. J. et al. Viral infection and bovine mastitis: a review. **Vet. Mic.**, v.88, p.27-45, 2002.

WILLIAM, B. J. et al. Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis. **Indian Vet. J.**, v.69, p.843-844, 1992.

## *Artigo II*

### **ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DOS PAPILOMAS CUTÂNEOS EM BOVINOS TRATADOS COM A TINTURA DA *Thuya occidentalis***

## ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DOS PAPILOMAS CUTÂNEOS EM BOVINOS TRATADOS COM A TINTURA DA *Thuya occidentalis*

### HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF CUTANEOUS PAPILOMAS IN BOVINES TREATED WITH THE TINCTURE OF *Thuya occidentalis*

Vanda Lucia da Cunha MONTEIRO<sup>3</sup>, Valdemiro Amaro da SILVA JUNIOR<sup>2</sup>, Sandra Maria de TORRES<sup>4</sup>, Roseana Tereza Diniz de MOURA<sup>5</sup>, Maria Cristina de O. Cardoso COELHO<sup>6</sup>

#### RESUMO

A papilomatose é uma doença infecto-contagiosa viral que acomete, entre outras espécies, os bovinos, causando perdas econômicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos histopatológicos dos papilomas cutâneos em bovinos tratados com a tintura da *Thuya occidentalis*. Foram utilizadas 40 fêmeas, mestiças de holandês. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais cada. O primeiro e o segundo grupos receberam 10mL de cloreto de sódio 0,9% e álcool de cereal, respectivamente. Os grupos 3 e 4 receberam os medicamentos fitoterápicos *Thuya occidentalis* (Simões®) tintura mãe (T.M.) a 30% e *Thuya occidentalis* tintura mãe a 30% com própolis, respectivamente. Todos os tratamentos foram realizados por via oral durante 63 dias ou até desaparecimento das lesões. Para avaliação histopatológica, 50% dos animais foram submetidos à biópsia cutânea das lesões no momento zero (M0) e no momento final (MF). Observou-se que não houve regressão das lesões em nenhum grupo (tratados e controles), uma vez que durante as avaliações foram observadas alterações hiperplásicas epiteliais e conjuntivas, com extenso crescimento vegetativo do epitélio com cristas epidérmicas extensas e profundas, resultados que caracterizam fase de desenvolvimento com replicação e síntese viral, sendo um achado característico de papilomatose. Pode-se concluir que na análise histológica as tinturas a 30% da *Thuya occidentalis* não causam regressão nos papilomas cutâneos de bovinos.

**Palavras Chave:** *Thuya occidentalis*, fitoterapia, histopatologia.

---

<sup>3</sup>Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária (PPGCV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Departamento de Medicina Veterinária (DMV). E-mail: vandamonteiro@yahoo.com

<sup>2</sup>Médico Veterinário Professor Adjunto Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal(DMFA) /UFRPE.

<sup>4</sup>Discente do Curso de Medicina Veterinária UFRPE, Bolsista CNPq.

<sup>5</sup>Médica Veterinária, Professora Assistente DMV/ UFRPE.

<sup>6</sup>Médica Veterinária, Professora Adjunta Orientadora DMV/UFRPE.



## SUMMARY

Papillomatosis is a infect-contagious viral disease that attack, among other specie, the bovines, leading to economical losses. The present study aimed to evaluate the histopathological aspects of the bovine cutaneous papillomatosis treated with *Thuya occidentalis*. Were used 40 females Holstein Friesian crossbred. The animals were randomly divided into 4 groups of 10 animals each. The first and second groups received 10mL of NaCl 0.9% and cereal alcohol, respectively. The groups 3 and 4 received the phytotherapeutic medicines *Thuya occidentalis* (Simões<sup>®</sup>) mother tincture T.M. 30% and *Thuya occidentalis* mother tincture 30% with propolis, respectively. All treatments were made by oral via during 63 days or until the remission of the lesions. For the histopathological evaluation, 50% of the animals were submitted to cutaneous biopsy of the lesions in the zero moment (0M) and final moment (FM). There was observed no remission of the lesions in any group (treated and control), once during the evaluations were observed epithelial and conjunctive hyperplastic alterations, with extensive vegetative growth of the epithelium with wide and deep epidermal crest, findings that characterize development phase with replication and viral synthesis, being a characteristic finding of papillomatosis. It can be concluded that in the histological analysis the tinctures at 30% of *Thuya occidentalis* do not cause regression in bovine cutaneous papillomas.

**Key-word:** *Thuya occidentalis*, phitotherapy, histopathology.

## 1 INTRODUÇÃO

A papilomatose bovina (PB) tem sido intensamente pesquisada em virtude da sua ocorrência e da íntima relação na etiologia de certos tipos de câncer e outras doenças (CAMPO, 2002).

Esta enfermidade é uma das mais importantes nos bovinos, principalmente, em bezerros, causando grandes perdas econômicas em virtude da morbidade, mortalidade e custos com tratamento, além de causar queda na produção leiteira e até comprometimento da glândula mamária com perda da função (WELLENBERG et al., 2002).

A papilomatose pode ser definida como hiperplasia do epitélio de revestimento, com alongamento ou alargamento das cristas interpapilares que se estendem acima da mucosa de superfície (COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000). É um achado histológico comum em lesões do epitélio de revestimento e na pele, como no condiloma acuminado, no papiloma verrugoso e em verruga vulgar (PRAETORIUS, 1997).

O diagnóstico é feito através da identificação do vírus ou por meio de análise morfológica através de aspectos como coilocitose, disceratose, papilomatose, hiperkeratose,

acantose e grânulos de cerato-hialina. A avaliação histológica da lesão é um método importante, pois, pode identificar tumores intra-epiteliais associados a viroses com certo potencial oncogênico, sendo de grande utilidade em centros que não dispõem de métodos de diagnóstico sofisticados (TERAI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003).

Em vista do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso oral da *Thuya occidentalis* tintura mãe (T.M.) a 30%, no tratamento da papilomatose bovina: através dos achados histopatológicos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Como primeira etapa do estudo, o projeto foi encaminhado à Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) recebendo parecer favorável a sua realização.

O experimento foi desenvolvido na fazenda de beneficiamento de leite tipo B, localizada a 182 Km de Recife/Pernambuco (PE) e no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE.

A propriedade escolhida continha em seu plantel bovinos de aptidão leiteira, com idade de 8 meses a 3 anos, onde foram selecionados 40 fêmeas, mestiços de holandês.

Após confirmação macroscópica de papilomatose cutânea, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, onde receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 (G1)- Controle- Administração oral diária de 10mL de solução de cloreto de sódio a 0.9% (v/v);

Grupo 2 (G2)- Controle 1- Administração oral diária de 10mL de álcool de cereal (v/v). O álcool de cereal foi o veículo utilizado na fabricação dos medicamentos fitoterápicos;

Grupo 3 (G3)- Tratado- Administração oral diária de 10mL do produto *Thuya occidentalis* (Simões®) tintura mãe (T.M.) a 30%;

Grupo 4 (G4)- Tratado 1- Administração oral diária de 10mL do produto testado *Thuya occidentalis* tintura mãe a 30% com própolis. O tratamento foi suspenso (tratado e controle) com no máximo 63 dias, ou antes, caso houvesse a regressão total dos papilomas.

### 2.1 Avaliações histológicas

Para análise histopatológica, foram retirados fragmentos de papilomas através de incisão elíptica, com lâmina de bisturi. Foram coletados tipos diferentes de papiloma, em cinco animais de cada grupo, no momento zero (M0) e momento final (MF). Os fragmentos

obtidos foram fixados em solução formalina tamponada a 10%<sup>1</sup>(v/v), após 48 horas foram colocados em etanol a 70°GL em seguida foram desidratados em soluções crescentes de etanol<sup>1</sup>, diafanizados em xilol<sup>1</sup> onde sofreram cortes de 5 µm e em seguida foram imersos em parafina<sup>1</sup>, montados em lâminas de vidro e submetidos à coloração pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) e examinados por microscopia óptica (MICHALANY, 1991).

O estudo estatístico, para comparação dos tratamentos, foi analisado por meio de estatística descritiva (SAMPAIO, 1998).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por considerar a necessidade de um diagnóstico diferencial com várias patologias que podem acometer a pele, assim como da necessidade de caracterizar os achados microscópicos para confirmação do diagnóstico de papilomatose, optou-se pela realização de exame histopatológico das lesões. O exame foi realizado em 50% dos animais de cada grupo, pois a retirada cirúrgica ou até mesmo a escarificação de um papiloma pode funcionar como imunização ativa, levando à queda total dos papilomas restantes e, conseqüentemente, a cura. Esta observação foi relatada por Leukutová et al. (1998) onde, descrevem que o vírus se encontra na parte mais queratinizada do tumor, portanto, quase sem irrigação, e ao se retirar as verrugas, o mesmo pode chegar à circulação, estimulando a imunização, e, conseqüentemente, ocorrendo a queda dos papilomas. Os achados clínicos encontrados neste estudo contradizem aos autores supracitados, haja vista que a realização da biópsia não causou regressão espontânea das lesões em nenhum animal dos grupos (tratados e controles).

Em todas as lesões avaliadas, microscopicamente, no momento inicial (M0), observou-se crescimento vegetativo do epitélio com cristas epidérmicas extensas e profundas e papilas dérmicas, que se projetavam no sentido contrário às cristas, com eixo conjuntivo bastante vascularizado, queratina tubular com conjuntivo, infiltrado mononuclear linfocitário com fibroblastos ativos e figuras de mitose com infiltrado nas papilas dérmicas linfoplasmocitários (Fig. 1a e 1b), estes resultados caracterizam fase de desenvolvimento com replicação e síntese viral como descrito por Campo (2002) e Souto (2006).

Em todos os grupos, os achados supracitados foram compatíveis com o diagnóstico de papilomatose, visto que, as características das massas tumorais encontram-se de acordo com a sintomatologia descrita por Terai et al. (1999); Cotran, Kumar e Collins (2000) e Scully (2002). A histopatologia das verrugas excisadas, permitiu o estudo do tecido através das

---

<sup>1</sup> Johnson, Rio de Janeiro, RJ.

células de superfície, já que, essas células são derivadas das camadas de células basais ou germinativas, as quais sofrem alterações morfológicas no seu processo de maturação, e conseqüentemente estão presente superficialmente. Estes resultados demonstraram que o método tem alta especificidade para o diagnóstico de tumores de pele como os papilomas (PRAETORIUS, 1997; OLIVEIRA et al., 2003).

Quando comparados os grupos entre si (controles e tratados), no momento final (MF), não foi observada regressão parcial e/ou total em nenhum grupo, uma vez que durante as avaliações, todos os animais não apresentaram alterações histológicas de remissão, sendo os achados semelhantes ao M0, como: alterações hiperplásicas epiteliais e conjuntivas, com extenso crescimento vegetativo do epitélio com cristas epidérmicas extensas e profundas. Papilas dérmicas que se projetavam no sentido contrário às cristas, com eixo conjuntivo bastante vascularizado e discreto infiltrado perivascular linfoplasmocitário com figuras de mitoses na camada basal. Vale ressaltar que estes resultados foram mais acentuados nos grupos controles. (Fig. 1c e 1d). Calvert (1990); Campo (2003) e Campo (2006) caracterizaram esta fase como sendo do estágio 3, onde ocorre a presença de queratinócitos formando massas que têm um núcleo central de tecido conectivo, caracterizando o período evolutivo da doença.

Em todos os grupos no MF, foi possível observar na avaliação histopatológica, que os papilomas apresentavam-se de formas e aspectos distintos: típicos, atípicos, atípicos engastados e filamentosos localizados na glândula mamária. Os típicos assemelhavam-se a “dedos de luva”, constituído de tecido epitelial e de tecido conjuntivo, sendo este mais pronunciado, com hiperplasia de ambos, com espessamento da camada córnea, granulosa e espinhosa, infiltrado inflamatório difuso, presença de fibras colágenas maduras com ausência ou pequena quantidade de figuras de mitose (Fig. 1e).

No atípico verifica-se também o aspecto de dedos de luva, mas não tão pronunciado com os típicos, com pequena quantidade de tecido conjuntivo. A derme reticular apresentava uma estruturação normal com a presença de folículos pilosos e glândulas, havendo predominância de tecido epitelial, principalmente, da camada espinhosa. Fibroblastos ativos e discreto infiltrado inflamatório mononucleares linfocitário também foram registrados. Segundo Radostits et al. (1994) e Paulik (2001) , este tipo, promove engrossamento da epiderme com queratinização forte nas camadas superficiais, estando de acordo com o encontrado neste estudo (Fig. 1f).

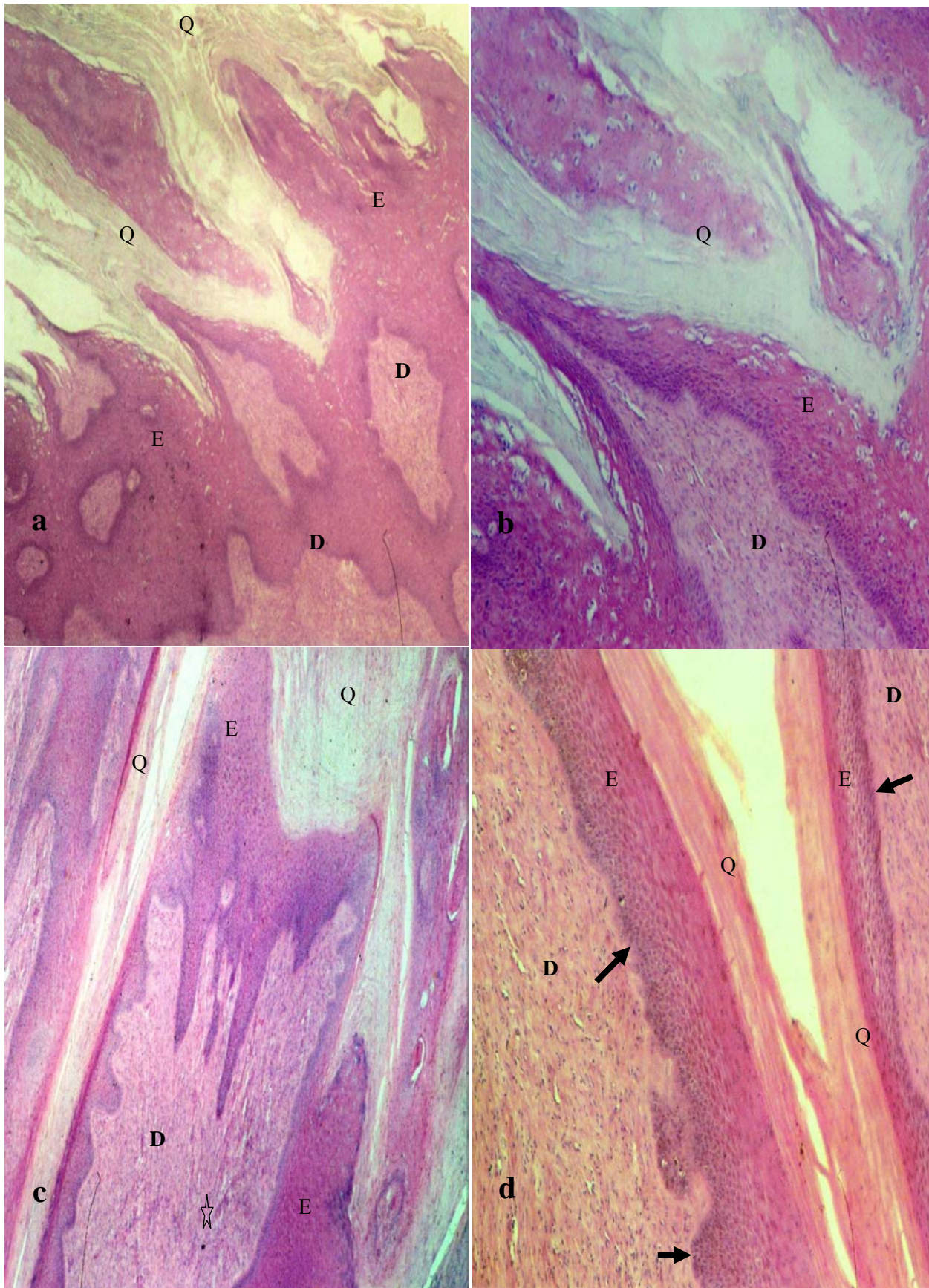
Nos engastados, ocorreu crescimento vegetativo do epitélio com extensa queratinização, com tecido conjuntivo extremamente vascularizado. A epiderme encontrava-

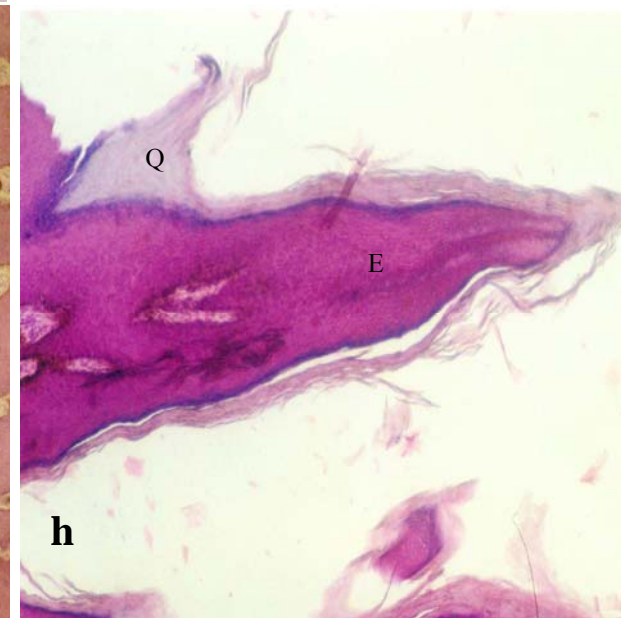
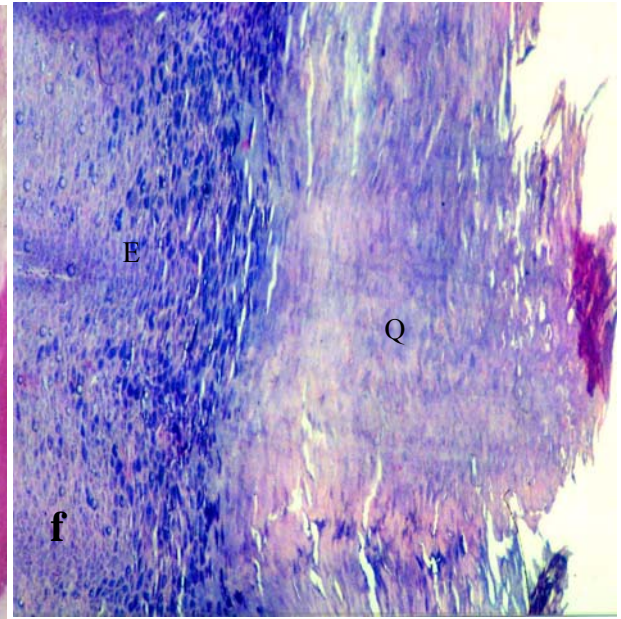
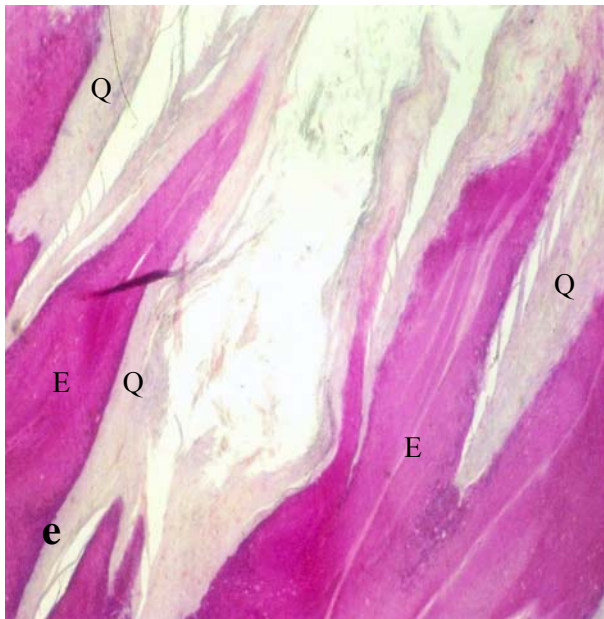
se muito espessada e a camada espinhosa muito grande (acantose) com figuras de mitose na camada basal (Fig. 1g). De acordo com Neville et al. (1998), estes achados sugerem lesões papilomatosas, visto que, a acantose é um achado histopatológico freqüente no condiloma acuminado, no papiloma escamoso oral e, principalmente na verruga vulgar.

Os papilomas filamentosos localizados na glândula mamária são semelhantes ao típico, porém, caracterizado praticamente só de tecido epitelial, sendo quase ausente o tecido conjuntivo, verificando-se maior número de células na camada espinhosa, com grande quantidade de vesículas nucleares. (Fig. 1-h e 1-i).

Os papilomas cutâneos mostraram-se em todos os momentos com alterações hiperplásicas epiteliais e conjuntivais, enquanto que, no papiloma filamentoso observou-se somente hiperplasia do tecido epitelial, o que leva a crer que estes tipos de papilomas são causados por tipos distintos de vírus, como descrito por Campo (2002) e Wellenberg et al. (2002).

Pode-se observar que independente do tipo de papiloma encontrado, tanto típicos, atípicos e filamentosos, que todos corresponderam, em maior ou menor grau, às descrições histológicas de outros pesquisadores (CAMPO, 1997; JELINEK E TACHEZY, 2005; CAMPO, 2006), ocorrendo sempre uma marcada proliferação de tecido epitelial, principalmente, nos papilomas atípicos, com áreas de acantose e de hiperqueratose em volta da pele sã.





**Figura 1. Fotomicrografias da pele de bovinos com papilomatose cutânea submetidos a tratamentos fitoterápico *Thuya occidentalis* TM**

**Figura 1a.** Papiloma filiforme em corte transversal. Observar aumento na queratinização (Q), no número de células da epiderme (E) e da derme (D). Aumento 30x.

**Figura 1b.** Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar maior queratinização da epiderme e células necróticas vacuolizadas (seta). Notar derme atípica com reação fibroblástica proliferativa (Q). Aumento de 150x.

**Figura 1c.** Fragmento de papiloma em corte transversal. Observar um aumento na produção celular da epiderme (E) intradérmica; aumento e desordem (estrela) das células e das fibras colágenas na derme (D); e maior queratinização e descamação do epitélio (Q). Aumento 30x.

**Figura 1d.** Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar um maior número de células na camada basal da epiderme (seta); aumento na queratinização (Q) da camada epitelial; Notar arranjo atípico da derme papilar (D). Aumento 150x.

**Figura 1e.** Fragmento de um papiloma em dedo de luva típico (E) em corte longitudinal. Observar aumento na queratinização (Q) e da camada epitelial (E). Aumento de 30x.

**Figura 1f.** Fragmento da epiderme em corte transversal. Observar aumento da camada granulosa da epiderme (E) e da camada acelular de descamação (Q). Aumento 150x.

**Figura 1g.** Fragmento de papiloma com aspecto digitiforme em corte longitudinal. Observar irregularidade na epiderme (E), aumento da queratinização (Q). Aumento 30x.

**Figura 1h.** Fragmento de papiloma filiforme de úbere em corte transversal. Epiderme hiperplásica (E) e espessa camada de queratina (Q). Aumento 30x.

**Figura 1i.** Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar irregularidade e uma maior densidade celular na epiderme (E), crescimento epitelial intradérmica e formação de pérolas córneas (seta). Derme (D). Aumento 150.

#### 4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o uso das tinturas *Thuya occidentalis* a 30% em papilomas cutâneos de bovinos não causa alterações histológicas combatíveis com regressão.



## 5 REFERÊNCIAS

CAMPO M.S. Bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, v.154, p.175-188, 1997.

CAMPO, M. S. Animal model of papillomavirus pathogenesis. **Virus Res.**, v.89, p.249-261, 2002.

CAMPO M.S. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary and comparative oncology**. v.1, n.1, p.3-14, 2003.

CAMPO, M.S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In Campo, M.S. (Eds) **Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond**, Chap 23. First published in Wymondham, England: Caister Academic Press (2006), pP.1-34.

CAVERT, C.A. Canine viral papillomatosis. In: GREENE, E.C. (Ed). **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.288-290, 1990.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: **The use of medicinal plants in the country of Tanquinho, State of Bahia, Northeastern Brazil**. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap.8, p.233-295.

JELINEK, F., TACHEZY, R. Cutaneous papillomatosis in cattle. **J. Comp. Path.**, v.132, p.70-81, 2005.

LEVKUTOVÁ, M. et al. Subpopulation of lymphocytes in cattle naturally infected with papillomavirus. **Acta Vet Hung**, v.46, n.1, p.13-18, 1998.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo In: Michalany, 1991. 277 p.

NEVILLE, B. W. *et al.* Patologia epitelial. In:\_\_\_\_\_. **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, cap.10, p.252-313.

OLIVEIRA, M. C. et al. Aspectos morfológicos que sugerem a presença do papilomavírus humano (HPV) em lesões do epitélio de revestimento da mucosa oral. **Revista Brasileira de Patologia Oral**. v.2, n.2, p.34-43, 2003.

PAULIK, S. Cellular immunity in perstent cutaneous papillomatosis of cattle. **Folia Veterinária**, n.45, p. 64-67, 2001.

PRAETORIUS, F. HPV-associated diseases of oral mucosa. **Clinics in Dermatology**, v.15, p.399-413, 1997.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary Medicine; a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs goats and horses**. 8.ed. London: Bailliere Tindall, cap.21: Diseases caused by viruses and chlamydia – I, p.1028 – 1033, 1994.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SCOTT, D. W.; ANDERSON, W. I. Bovine Cutaneous Neoplasms: literature review and retrospective analysis of 62 cases (1978 to 1990). **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.** v.14, n. 10, 1992.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncology**, v.38, p.227-234, 2002.

SOUTO, M. A. M. et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesq. Vet. Bras.** v.26, n.2, p. 112 – 122, 2006.

TERAI, M. *et al.* Oral wart associated with human papillomavirus type 2. **J Oral Pathol Med**, v.28, n.3, p.137-140, 1999.

WELLENBERG, G. J. et al. Viral infection and bovine mastitis: a review. **Vet. Mic.**, v.88, p.27-45, 2002.

## *Artigo III*

### *Thuya occidentalis* CH6 NO TRATAMENTO DA PAPILOMATOSE BOVINA: ASPECTOS MACROSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS

## ***Thuya occidentalis* CH6 NO TRATAMENTO DA PAPILOMATOSE BOVINA: ASPECTOS MACROSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS**

## ***Thuya occidentalis* CH6 IN THE TREATMENT OF BOVINE PAPILOMATOSIS: MACROSCOPIC AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS**

Vanda Lucia da Cunha MONTEIRO<sup>4</sup>, Pierre Castro SOARES<sup>2</sup>, Erika Korinsky WANDERLEY<sup>3</sup>, Eryvelton de Souza FRANCO<sup>5</sup>, Lílian Sabrina Silvestre de Andrade<sup>4</sup>,  
Maria Cristina de O. Cardoso Coelho<sup>6</sup>;

### **RESUMO**

Utilizou-se o medicamento homeopático *Thuya occidentalis* CH6 em bovinos leiteiros com alterações macroscópicas sugestivas de papilomatose, com o objetivo de avaliar a sua ação frente aos papilomas cutâneos. O experimento foi desenvolvido em uma fazenda de beneficiamento de leite, localizada no Estado de Pernambuco, em conjunto com o Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, contendo 10 animais cada. Os grupos 1 e 2 receberam solução de NaCl 0.9% e álcool de cereal, respectivamente, sendo estes considerados controles, e o grupo 3 recebeu a *Thuya occidentalis* CH6 na forma de tratamento. Para os três grupos a administração foi diária, sendo 1 mL por via oral. De acordo com os dados obtidos, as regressões parcial e total ocorreram apenas no grupo 3 (*Thuya occidentalis* CH6), observando-se queda das verrugas em 20% nos animais deste grupo, além de regressão parcial dos papilomas em 80% dos animais restantes, com alterações macroscópicas de coloração e tamanho, estes achados confirmados pelo exame histopatológico. Na análise histológica observou-se redução da camada espinhosa em todos os animais do grupo tratado (G3), evidenciando-se redução nas camadas epiteliais, com tecido

---

<sup>4</sup> Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária (PPGCV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Departamento de Medicina Veterinária (DMV). E-mail: vandamonteiro@yahoo.com

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Professor Adjunto DMV/ UFRPE

<sup>3</sup> Médica Veterinária, Residente do PPGCV/UFRPE

<sup>5</sup> Discente do Curso de Medicina Veterinária UFRPE, Bolsista CNPq.

<sup>6</sup> Médica Veterinária, Professora Adjunta Orientadora DMV/UFRPE.

conjuntivo da papila dérmica apresentado fibroblastos ativos e capilares e raras células inflamatórias linfocitárias. Pode-se concluir que a *Thuya occidentalis* CH6 contribuiu no tratamento da papilomatose cutânea em bovinos, e estudos com a *Thuya occidentalis* CH6 devem ter continuidade em bovinos portadores de papilomatose por período de tratamento superior a 63 dias.

Palavras-chave: *Thuya occidentalis* CH6, homeopatia, papilomatose bovina.

## SUMMARY

There was used the homoeopathic medicine *Thuya occidentalis* CH6 in dairy bovines with suggestive macroscopic alterations of papillomatosis, aiming to evaluate its effect on cutaneous papillomas. The experiment was carried out in a benefiting dairy farm, located in Pernambuco State, together with the Department of Animal Morphology and Physiology (AMFD) and the Department of Veterinary Medicine (VMD) at the Federal Rural University of Pernambuco (FRUPE). The animals were randomly distributed into 3 groups, made up of 10 animals each. The groups 1 and 2 received NaCl 0.9% solution and cereal alcohol, respectively, being these considered the controls, and the 3rd group received *Thuya occidentalis* CH6 as treatment. For the three groups the administration was daily, being 1 mL by oral via. According to the obtained data the partial and total regressions occurred only in group 3 (*Thuya occidentalis* CH6), being observed the warts fall in 20% of the animals of this group, besides the partial regression of the papillomas in 80% of the remaining animals, with macroscopic alterations of color and size, findings confirmed by histopathological exam. In the histological analysis it was observed reduction of the thorny layer in all animals of the treated group (G3), showing reduction on epithelial layers, with conjunctive tissue of the dermal papilla exhibiting active fibroblast and capillaries and rare inflammatory lymphocyte cells. It may be concluded that *Thuya occidentalis* CH6 contributes to the treatment of bovine cutaneous papillomatosis, and studies with *Thuya occidentalis* CH6 might have continuity in bovines carrying papillomatosis for a period of treatment superior to 63 days.

**Word-key:** *Thuya occidentalis* CH6, homeopathy, bovine papillomatosis

## 1 INTRODUÇÃO

A papilomatose bovina, popularmente conhecida como verruga, figueira epitelioma contagioso, entre outros, é uma enfermidade viral que se caracteriza pela presença de lesões tumorais na pele, mucosas e em alguns órgãos, como a bexiga e o sistema gastroentérico, causando prejuízos consideráveis, principalmente, naqueles animais de importância econômica. (MELO e LEITE, 2003).

O principal sinal clínico desta enfermidade é a formação de estruturas verrugosas pedunculadas, semelhantes a uma couve-flor, ou planas, com aspecto rugoso. Histologicamente caracteriza-se por uma hiperplasia benigna do estroma e do epitélio, que é produzido durante períodos de imunodeficiência, presença de agentes patogênicos adicionais e alguns co-fatores que podem induzir a uma transformação maligna da neoplasia (CAMPO, 1995; LEUKUTOVÁ et al., 1998)

Atualmente, existem diversos métodos de tratamentos utilizados a campo, porém, a grande maioria revelou-se insatisfatório e, freqüentemente, com ocorrência de recidiva, levando o produtor a descartar precocemente animais de alto valor zootécnico, tais fatos têm justificado a busca de novo protocolo de tratamento (RÜDINGER, 1998).

Neste contexto, a homeopatia, ciência terapêutica baseada na lei natural de cura *Similia similibus curenter* (semelhantes curados pelos semelhantes), tem sido utilizada com sucesso (TEIXEIRA, 2003). Por suas características de eficácia, seguridade ausência de resíduos inócuos à saúde humana, animal e vegetal, permitindo, com isto, a manutenção da energia vital (ARENALES, 2002).

Na prática médica homeopática é comum e difundindo o uso de alguns medicamentos que possuem a capacidade específica de promover o desaparecimento de verrugas. Entre estes, pode-se citar a *Thuya occidentallis*. Esta planta exsuda óleo volátil contendo thuiona, cetona aromática, bem como glicosídeos pinicrina e tujina. As ações da mesma parecem estar relacionadas a este óleo, que é estimulador e purificador do sangue, sendo utilizada no desaparecimento de verrugas, condilomas e papilomas das aves em geral (OFFERGELD et al, 1992; ARENALES, 2002).

A *Thuya occidentalis*, pelos seus componentes, pode ser utilizada no combate às diversas afecções que acometem o homem e o animal, como alternativa ao controle químico convencional contra lesões de pele em rebanhos, principalmente, na papilomatose cutânea bovina, que é uma doença endêmica no mundo, causando prejuízo econômico e cujo controle tem sido difícil (OLSON, 1990; TEIXEIRA, 2003).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da *Thuya occidentallis* CH6 em papilomatose cutânea bovina, acompanhado por estudo macroscópico e histopatológico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento o projeto foi encaminhado à comissão de ética do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo iniciado após análise e parecer favorável para seu desenvolvimento.

## 2.1 Material botânico:

O material botânico utilizado foi coletado segundo protocolo internacional de coleta, obedecendo rigorosamente a Convenção da Biodiversidade seguindo a obtenção dos extratos. A coleta, fabricação do medicamento e distribuição para uso experimental foi feita pela Farmácia Homeopática de Recife/PE. O medicamento homeopático foi preparado na escala Centesimal Hahnemaniana (CH), de acordo com a farmacopéia brasileira.

## 2.2 Local do Experimento

O experimento foi desenvolvido em uma fazenda de beneficiamento de leite localizada no Estado de Pernambuco, em conjunto com o Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e Departamento de Medicina de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) período de outubro de 2004 a junho de 2006.

## 2.3 Animais e instalações

Para o estudo foram utilizadas 30 fêmeas bovinas, com idades variadas, mestiços de holandeses, apresentando diferentes tipos de papilomas cutâneos (típicos, atípicos, atípicos engastados, filamentosos e misto). Os animais mantiveram-se em sistema semi-intensivo de criação, onde receberam brincos de identificação.

A alimentação constou de volumoso à base de capim elefante (*Penisetum purpureum*) adicionado de melaço e concentrado de farelo de milho e soja<sup>5</sup>, a qual era oferecida duas vezes ao dia (400g/d), além de água e sal mineral comercial<sup>1</sup>, específico para bovinos oferecidos *ad libitum*.

## 2.4 Avaliação dos animais e papilomas:

Os animais foram examinados por um dos autores (V.L.C.M.), antes do início do experimento, sendo acompanhados pela mesma veterinária, até o final da pesquisa, onde foi realizada uma avaliação inicial, momento zero (M0), para identificação sanitária, reprodutiva e manejo, além de avaliar aspectos macroscópicos dos papilomas quanto ao tipo, tamanho, sensibilidade ao toque e quantidade assim definidos para este estudo: leve (25% do corpo afetado), moderado (com 50% do corpo afetado) e intenso (com mais de 50% do corpo afetado).

Todos os animais foram submetidos, no primeiro dia (M0), ao exame clínico e laboratorial, sendo estes: parasitológico de fezes, avaliação através de hemograma, provas de

---

<sup>5</sup> Supranor- Recife,PE



função hepática (Gama-Glutamiltransferase e Aspartato Aminotransferase) e renal (Uréia e Creatinina).

Os animais passaram por um período de adaptação de sete dias sem que nesse período fosse utilizada nenhuma medicação, seja de uso interno ou externo, para que se desse início ao tratamento homeopático.

## 2.5 Escolha do medicamento homeopático

Realizou-se a hierarquização dos sintomas homeopáticos:

1. Leucorréia;
2. Fezes aquosas amareladas;
3. Unhas secas e quebradiças;
4. Verrugas cheirando a queijo;
5. Sensibilidade ao toque;
6. Verrugas Grandes, pedunculadas, isoladas, sangram com facilidade e pruriginosas.

Obtendo um total de 10 sintomas.

7. Em seguida foi feito a repertorização dos 10 sintomas utilizando-se o repertório de Ariovaldo Filho (2002), com ilustrado no quadro 1.

Remédios/Sintomas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Alumina</i>	3	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Amm.c.</i>	3	-	-	-	1	1	2	-	-	1	-	-	-
<i>Arsenicum</i>	3	-	-	-	3	3	2	-	-	-	1	-	-
<i>Arsenicum iodatum</i>	3	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Calcarea carbônica</i>	3	2	-	-	3	3	2	1	-	1	-	-	1
<i>Carbo animalis</i>	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cina</i>	3	2	-	-	2	2	1	1	1	-	-	-	-
<i>Gelsemium</i>	3	-	-	-	1	2	-	-	-	3	1	-	-
<i>Sulphur</i>	3	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thuya Occidentalis</i>	2	3	2	2	2	3	1	2	3	2	2	3	1

Quadro 1- Ilustra a repertorização dos sintomas relevantes dos animais com papilomatose cutânea.

## 2.6 Grupos experimentais

Após análise macroscópica das lesões, os bovinos selecionados foram divididos, aleatoriamente em três grupos de dez animais cada para o seguinte tratamento:

Grupo 1 (G1)- Controle- Administração oral diária de 1mL de solução de cloreto de sódio a 0.9% (v/v);

Grupo 2 (G2)- Controle 1- Administração oral diária de 1mL de álcool de cereal (v/v). O álcool de cereal foi o veículo utilizado na fabricação do medicamento homeopático;

Grupo 3 (G3)- Tratado- Administração oral diária de 1mL do produto *Thuya occidentalis* CH6 (v/v). O tratamento foi suspenso (tratado e controles) com no máximo 63 dias, ou antes, caso houvesse a regressão total dos papilomas.

## 2.7 Avaliações clínicas

Todos os animais do experimento foram avaliados a cada sete dias, até o momento final (MF), totalizando oito observações (63 dias). Considerou-se o estado geral dos animais e aspecto macroscópico dos papilomas quanto ao tipo, tamanho, quantidade e sensibilidade ao toque.

Em todos os animais, após o exame clínico sistemático, amostras de sangue, urina e fezes foram coletadas de 15 em 15 dias onde foram encaminhadas aos Laboratórios de Patologia Clínica e Doenças Parasitárias do DMV/UFRPE para processamento dos exames: hemograma, prova de função renal e hepática e parasitológico de fezes.

Para análise histopatológica, foram retirados fragmentos de papilomas através de incisão elíptica, com lâmina de bisturi. Foram coletados tipos diferentes de papiloma, em cinco animais de cada grupo, no momento zero (M0) e momento final (MF), após o tratamento. Os fragmentos obtidos foram fixados em solução formalina tamponada a 10%(v/v), após 48 horas foram colocados em etanol a 70°GL em seguida foram desidratados em soluções crescentes de etanol<sup>1</sup>, diafanizados em xilol<sup>1</sup> onde sofreram cortes de 5 µm e em seguida foram imersos em parafina<sup>1</sup>, montados em lâminas de vidro e submetidos à coloração pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) e examinados por microscopia óptica (MICHALANY, 1991).

Os dados foram tabelados e agrupados em médias para apresentação gráfica. Contrastes de médias foram feitas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade (Sampaio, 1998).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de papilomatose cutânea bovina (BPV) foi confirmada baseada na anamnese, exame macroscópico e análise histológica das lesões. Tais achados revelaram alterações na pele condizentes com as características de papilomatose, não sugerindo outro tipo de enfermidade.

Verificaram-se na figura 1, que os tipos de papiloma mais prevalentes foram os do tipo basal e misto, não sendo identificados animais com apenas papilomas pedunculados e

engastados, porém, estes tipos foram encontrados associados com o basal. Contrariando os achados da maioria dos autores (VEIGA, 2000; SANTIN e BRITO, 2004; SILVA, 2004), que descrevem que o papiloma mais comumente verificado nos bovinos é pedunculado, principalmente, em animais jovens, seguidos de basais e mistos.

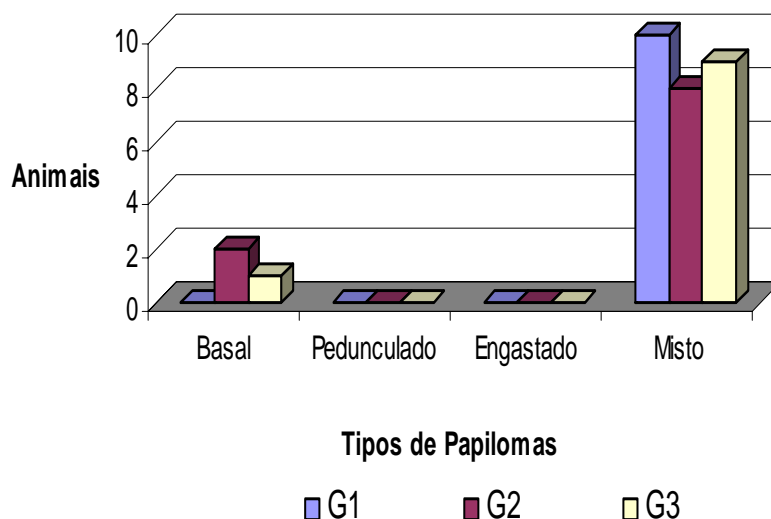


Figura 1 – Frequência absoluta dos tipos de papiloma encontrados nos diferentes grupos experimentais.

Constatou-se que as lesões variavam de tamanho e quantidade, apresentando oscilações com média de 0,5 +/- 2 cm e ocorriam entre cinco até 300 papilomas por animal, sendo observado que quanto maior o número, menor era seu tamanho. Condizendo com os achados descritos por Veiga et al. (2000).

Quanto à intensidade, observou-se que em 19/30, foi classificada moderada e 11/30 leve. É presumível que fatores específicos, tais como manejo, faixa etária e infestação por carrapatos, possam ter contribuído para tal frequência.

No M0, evidenciou-se ao exame macroscópico, em todos os grupos (G1, G2 e G3), características da tumoração de aspecto nodular, estruturas verrugosas pedunculadas, semelhante a uma couve-flor, ou plana, com aspecto rugoso (Fig. 2-a). Ao exame histopatológico, observou-se alterações compatíveis com papilomatose, com crescimento vegetativo do epitélio com extrema queratinização, tecido conjuntivo extremamente vascularizado, com alterações hiperplasia benigna do estroma e do epitélio (Fig. 3-a; 3-b), estabelecendo o diagnóstico deste tipo de doença (CAMPO, 1995; LEUKUTOVÁ et al., 1998).

Em relação ao tratamento, quando comparados os grupos entre si (G1, G2 e G3), observou-se que à regressão parcial e total ocorreu apenas no grupo tratado com a *Thuya*

*occidentalis* CH6, uma vez que durante as avaliações, todas as lesões deste grupo apresentaram alterações macroscópicas de tamanho, cor, quantidade e sensibilidade ao toque. Os papilomas basais mudaram de cor e consistência. Apresentaram-se brancos com aspecto endurecido, com pouca ou ausência sensibilidade ao toque, lisos e com o passar do tempo ficavam rente com a pele. A princípio parecia fibrose e com o tempo foram regredindo. As tumorações pedunculadas ficavam ressequidas e quebradiças, evoluindo para seu desprendimento.

Houve remissão completa das lesões em 20% dos animais do grupo 3, não havendo recidivas mesmo após 6 meses (Fig.2-b, 2-c, 2-d, 2-e). Vale ressaltar que a maioria dos papilomas era pedunculado, facilitando a queda. Estes resultados encontram suporte nas citações de Santin e Brito (2003), que relatam uma tendência de melhor resposta a tratamentos do que aqueles acometidos por papilomas planos

Nos 80% das verrugas dos animais restantes, as lesões demonstraram-se reduzidas em comparação aos momentos iniciais, sem, entretanto, haver regressão total. Possivelmente, o período de tratamento com a medicação utilizada, pode não ter sido suficiente para induzir uma resposta imunológica capaz de resultar na cura total das lesões. Estes resultados vêm corroborar com a idéia proposta por Silva et al. (2001); Santin (2001) e Arenales, (2002) que descrevem ser necessário um tempo maior e, em alguns casos, repetição do tratamento para que ocorra a regressão dos papilomas.

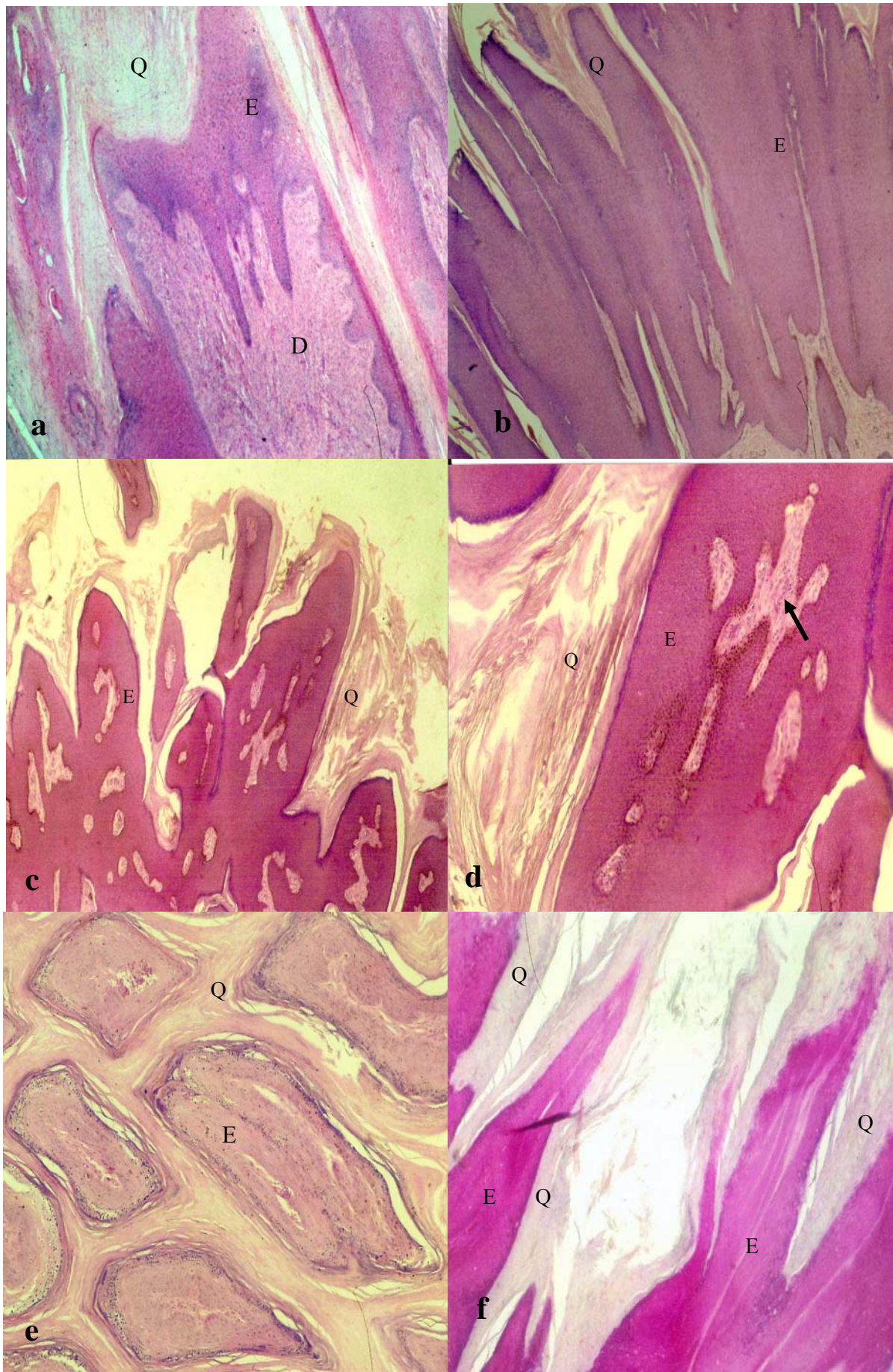
Com relação à avaliação histopatológica observou-se redução nas camadas epiteliais, principalmente, na espinhosa. Tecido conjuntivo da papila dérmica com fibroblastos ativos, apresentando capilares e raras células inflamatórias (linfócitos) (Fig. 3-c, 3-d). Observou-se também redução das cristas epidérmicas, redução do extrato córneo e do crescimento vegetativo. Segundo Olson (1992) a formação tumoral entra no último estágio, denominado de regressão.

Nos grupos controle (G1 e G2), verificou-se o surgimento de novos papilomas, assim como a coloração cinza foi modificado para a preta. Histologicamente observou-se achados típicos de papilomatose (Fig. 3-e, 3-f), caracterizando o período evolutivo da doença, como descrito por Calvert (1990); Campo, (1995); Leukutová et al., (1998) e Campo (2004). Os achados histopatológicos no momento final (MF) dos animais controle são bastante semelhantes aos que foram descritos no momento inicial (M0) de todos os grupos (Fig. 3-a, 3-b).



Figura 2. Evolução clínica dos grupos tratados com *Thuya occidentalis* CH6: tumorações vegetativas fungiformes e pedunculadas nas orelhas, barbeta, olhos e pescoço (2-A); sangramento com facilidade após trauma (seta laranja) (2-B); 15 dias após o tratamento, áreas de regressão após queda de alguns papilomas (setas laranjas) (2-C); 45 dias após, apresentando 90% de regressão (2-D); animal 100% curado após 60 dias de tratamento.

Com relação aos aspectos hematológicos, bioquímico e urinário verificou-se que permaneceram dentro do intervalo considerado fisiológicos para a espécie estudada (JAIN, 1993; KANEKO, 1997), em todos os grupos (G1, G2 e G3). Estes resultados demonstram que a *Thuya occidentalis* CH6, não predispõe de efeitos sistêmicos, colaterais ou tóxicos no período testado.



**Figura 3. Fotomicrografias da pele de bovinos com papilomatose cutânea submetidos a tratamento com *Thuya occidentalis* CH6, no período de 63 dias.**

**3-a.** Papiloma típico em corte transversal (M0). Observar um aumento na produção celular da epiderme (E) com projeções intradérmicas; aumento e desordem das células e das fibras colágenas na derme (D); e maior queratinização e descamação do epitélio (Q). Aumento 30x.

**3-b.** Crescimento epidérmico exuberante em direção à derme (M0). Limite entre a crista epidérmica e derme (seta). Observar área queratinização da epiderme (E). Aumento de 30x.

**3-c.** Fragmento de papiloma de animal tratado com *Thuya occidentalis* CH6 em corte transversal (MF). Observar redução da camada celular da epiderme (E) e do tecido conjuntivo da derme (D); redução da queratinização do epitélio (Q). Aumento 30x.

**3-d.** Detalhe da fotomicrografia anterior. Observar em maior aumento camada epidérmica (E); redução da derme papilar (seta) e da camada queratinizada (Q). Aumento 150x.

**3-e.** Fragmento de um papiloma em dedo de luva típico (E) em corte transversal de animal controle no momento final. Observar extensa queratinização (Q) arredor do eixo camada epitelial (E). Aumento de 30x.

**3-f.** Fragmento de papiloma em corte longitudinal de animal controle no momento final. Observar arranjo filiforme de papiloma típico ativo (E) e da camada acelular de descamação (Q). Aumento 30x.

Apesar da homeopatia ser uma terapêutica que busca individualizar cada animal, ou seja, para cada doente um medicamento diferente, optou-se neste estudo, a escolha deste medicamento pelo o princípio da similitude entre os sintomas da matéria médica com os sintomas apresentados pelo coletivo (TEIXEIRA, 2003), visto que, o medicamento homeopático *Thuya occidentalis* CH6, conforme proposto pela literatura compulsada exerce ação terapêutica nas neoplasias, sendo estas caracterizadas como tendo aspecto de couve-flor ou planas, cheirando a queijo, com sensibilidade ao toque, sangram com facilidade e apresentam-se pruriginosas. Os sintomas encontrados neste experimento condiziam com os encontrados na matéria médica (Fig. 4).

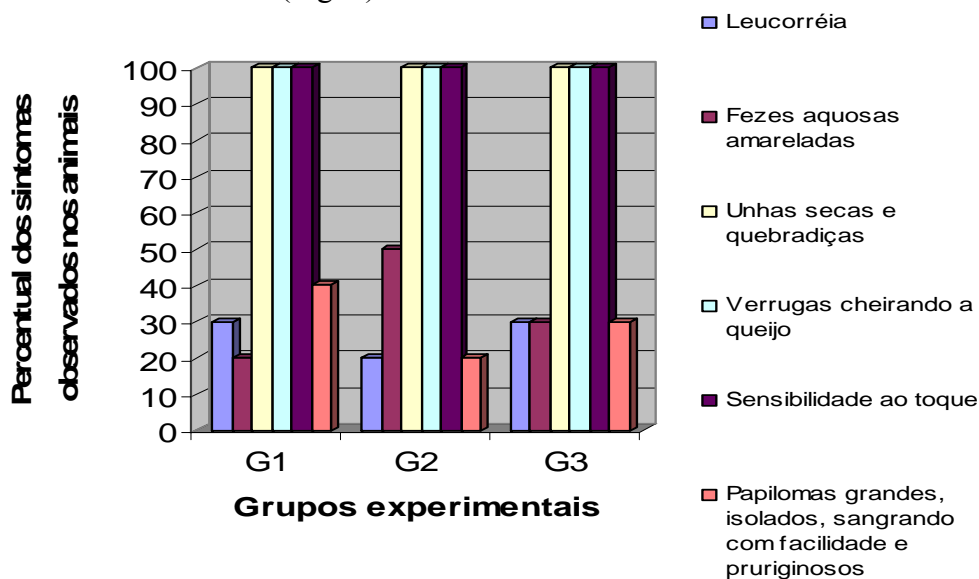


Figura 4 – Frequência dos sintomas observados em todos os animais no MO.

Utilizou-se a homeopatia de primeiro nível, considerando os sintomas locais e as modalidades lesionais, devido a se tratar de um rebanho, denominado de gênio epidêmico. Caracterizado pela utilização de um medicamento mais específico para curar o conjunto de sintomas expresso não num doente apenas, mas no coletivo (Bergo et al. 2000).

A maioria dos tratamentos, além da medicação oral, utiliza-se produtos tópicos (RÜDINGER, 1998), neste estudo, a medicação tópica não foi utilizada porque, segundo Hahnemann, (1996), nenhum mal externo pode nascer, persistir e muito menos se agravar, sem causa interna ou cooperação do organismo doente. Portanto, a mera aplicação tópica nos sintomas locais de doenças crônicas não é recomendada, pois remove apenas parcial e localmente os sintomas, não levando ao restabelecimento da saúde e conseqüentemente aparecendo novos casos e recidiva.

#### **4 CONCLUSÃO**

A *Thuya occidentalis* CH6 contribuiu no tratamento de papilomas pedunculados em bovinos, podendo ser indicado na presença desta infecção.

Estudos com a *Thuya occidentalis* CH6 devem ter continuidade com bovinos portadores de papilomatose basais com período de tratamento superior a 63 dias.



## 5 REFERÊNCIAS

ARENALES, M.C. Viabilidade da homeopatia na medicina veterinária- **Revista Nosso Clínico**, ano 2, n.10, p.26-28, 1999.

ARENALES, M.C. Homeopatia em Gado de Corte- *I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte-02* de setembro a 15 de outubro de 2002.

ARIOVALDO, FILHO, R. Novo repertório de sintomas homeopático. Robe editorial, Pp.1201, 2002.

BERGO, S. M. et al. Protocolo de tratamento homeopático das lesões provocadas pelo Papiloma Vírus Humano. **Pesquisa Homeopática**. v.15, Fas. 1, 2000

CALVERT, C. A. Canine viral papillomatosis. In: GREENE, E. C. **Infectious diseases the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, v.1, p. 288 – 290, 1990.

CAMPO, M. S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 92 97, 1995.

CAMPO M.S. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary and comparative oncology**. v.1, n.1, p.3-14, 2003.

HAHNEMANN, S. **Doenças crônicas: sua natureza peculiar e sua cura homeopática**. 4.a. ed. São Paulo: GEHSP “Benoit Mure”, 1996.

JAIN, N.C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia : Lea e Febiger, 1993. 417p.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic, 1997. 932p.

LATHOUD, J.A. Matéria médica homeopática Revisada e atualizada. Buenos Aires: Editorial Robe, p.577-582, 2002.

LEVKUTOVÁ, M. et al. Subpopulation of lymphocytes in cattle naturally infected with papillomavirus. **Acta Vet Hung**, v.46, n.1, p.13-18, 1998.

OFFERGELD, R. et al. Mitogenic Activity of high molecular polysaccharide fractions isolated from the Cupressaceae *Thuya occidentalis* L. enhanced cytokine- Production by Thyapolsaccaride, G. Fraction (TPSg),. **Leukemia**, v.6, suppl.3, p.189-191, 1992.

OLSON, C. **Papillomaviruses**. In: Virus infections of ruminants. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. B. V., 1990, 572p.

PULFORD, A. A potência e sua escolha. **Revista Selecta Homeopathica**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p. 66-68, 1999.

RÜDINGER, B. Pesquisa clínica em homeopatia veterinária. **Homint R&D Newsletter**, n.2, p. 19/22, 1998.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SANTIN, A.P.I.; BRITO, L.A.B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros. **A Hora Veterinária**, ano 23, nº 136, novembro/dezembro, 2003.

SILVA, L. A. F. et al. Papilomatose bovina: comparação e avaliação de diferentes tratamentos. **A Hora Veterinária**, n. 121, p. 55-60, 2001.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopathic use of modern medicines: utilization of the curative rebound effect. **Medical Hypotheses**. 60 (2), 276 – 283, 2003

VEIGA, V. M. O. et al. Avaliação de tratamento químico da papilomatose cutânea bovina. **Rev. Bras. Med.Vet.**, v.22, n.2, p.74-77, 2000.

## *Artigo IV*

### **OCORRÊNCIA DA BPV2 EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE PERNAMBUCO-BRASIL**

## **OCORRÊNCIA DA BPV2 EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE PERNAMBUCO-BRASIL**

### **INCIDENCE OF BPV2 IN DAIRY COWS IN PERNAMBUCO STATE-BRAZIL**

Vanda Lúcia da Cunha MONTEIRO<sup>6</sup>; Maria Angélica Ramos da SILVA<sup>2</sup>, Cybelle Cristina da Rocha CARVALHO<sup>2</sup>, Antônio Carlos de FREITAS<sup>3</sup>, Andréia Lais Teodoro da CUNHA<sup>4</sup>; Maria Cristina de Oliveira Cardoso COELHO<sup>5</sup>

#### **RESUMO**

A papilomatose bovina (BPV) é uma enfermidade complexa que representa entrave produtivo e econômico à pecuária mundial. O BPV 2 é um vírus epiteliotrópico, cujo material genético é o DNA que, possivelmente, está associado a lesões benignas de pele e malignas de bexiga. Considerando a disseminação deste vírus em vários Estados Brasileiros, devido à ausência de trabalhos científicos a respeito do isolamento do vírus no Estado de Pernambuco, este trabalho teve como objetivo identificar o BPV 2 em amostras de verrugas cutâneas de bovinos, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Utilizando-se os *primers* gerais (FAP59/64 e MY 11/09) e específico para BPV-2 obteve-se uma positividade de 33 (82,5%) das 40 amostras analisadas. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a presença da BPV no Estado de Pernambuco está em concordância com os achados mundiais, destacando-se a importância do diagnóstico no controle da infecção e, conseqüentemente, adoção de uma terapia específica.

**Palavras chave:** Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); papilomatose cutânea bovina, Pernambuco-Brasil.

#### **SUMMARY**

The bovine papillomatosis (BPV) is a complex disease that represents productive and economical impediment to the world livestock. The BPV-2 is an epitheliotropic virus whose genetic material is a DNA that, possibly, is associated to benign lesions on skin and malignant

---

<sup>6</sup> Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária (PPGCV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Departamento de Medicina Veterinária (DMV). E-mail: vandamonteiro@yahoo.com

<sup>2</sup> Bióloga, Mestranda em Genética Animal Universidade Federal de Pernambuco UFPE

<sup>3</sup> Biólogo, Professor Adjunto do Departamento de Genética Animal (DGA) da Universidade Federal de Pernambuco(UFPE)

<sup>4</sup> Médica Veterinária, Residente do PPGCV/UFRPE

<sup>5</sup> Médica Veterinária, Professora Adjunta Orientadora DMV/UFRPE.

on bladder. Considering the spread of this virus in several Brazilian States and owing to the absence of scientific works regarding to the presence of the virus in the State of Pernambuco, this work aimed to identify the presence of BPV-2 in samples of bovine cutaneous warts, using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Using the general (FAP59/64 and MY 11/09) and the specific *primers* for BPV-2 it was obtained an assertiveness of 33 (82.5%) in 40 analyzed samples. According to the obtained results, it can be concluded that the prevalence of BPV in the State of Pernambuco is in agreement with the world findings, standing out the importance of the diagnose on the control of the infection and , consequently, adoption of an specific therapy.

**Key-words:** Polimerase Chain Reaction (PCR), bovine cutaneous Papillomatosis, Pernambuco-Brazil

## 1 INTRODUÇÃO

Os papilomavírus (PV) são um grupo diverso de vírus de DNA dupla fita circular circundado por um capsídeo externo formado por proteínas virais arranjadas de forma icosaédrica, que infectam o epitélio escamoso da pele e mucosas. Causam infecções assintomáticas e várias lesões benignas ou malignas em várias espécies de mamíferos (CAMPO, 2006).

De acordo com a estrutura e composição do DNA são conhecidos seis diferentes tipos de papilomavírus bovino (BPV) classificados em 2 subgrupos: o subgrupo A contendo os BPVs 1, 2 e 5 que são os fibropapilomavírus, e o subgrupo B contendo os BPVs 3, 4 e 6 que compreende os papilomavírus epiteliotrópicos (CAMPO, 2006).

Os BPVs 1 e 2 causam fibropapilomas cutâneos e podem causar câncer de bexiga. O BPV 4 causa papilomatose e câncer do trato gastrointestinal superior, BPVs 5 e 6 causam papilomatose das tetas e úbere (CAMPO, 1999; WOSIACKI et al., 2002). Apesar dos PV serem vírus epiteliotrópicos, além de queratinócitos e fibroblastos, os BPV também podem ser encontrados em outros tecidos ou fluidos corporais. Em bovinos foi detectada a presença de BPV em sangue periférico (STOCCO et al., 1998), no trato reprodutivo e em gametas de fêmeas, bem como em amostras de sêmen (CARVALHO et al., 2003).

Os vírus da família papillomaviridae apresentam dificuldades para serem cultivados em sistemas de culturas celulares e então a técnica por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) apresenta-se adequada para a detecção do papilomavírus devido à alta sensibilidade e especificidade e por não requerer o cultivo do vírus (WOSIACKI et al., 2002). O segmento L1 do genoma do papilomavírus é o bastante conservado, e por isso, tem sido usado para a

detecção de papilomavírus (KARLSEN et al., 1996; QU et al., 1997; De VILLIERS et al., 2004). Visto que, as células da camada dérmica de uma lesão papilomatosa proliferam excessivamente e nessas células é possível encontrar inúmeras cópias do DNA viral (CARVALHO, 2003).

Os pares de *primers* FAP59/FAP64 e MY09/MY11 foram desenhados para anelar em uma região conservada do gene L1 de muitos tipos de HPV e, com o emprego desses *primers*, tem sido demonstrada a amplificação do DNA de papilomavírus de muitas espécies de animais, incluindo bovinos (CHAN et al., 1995; QU et al., 1997; FORSLUND et al., 1999; MANOS et al., 2004; OGAWA et al., 2004). Face ao conhecimento acumulado na literatura e dado à ausência de trabalhos científicos a respeito da presença do vírus da papilomatose bovina no Estado de Pernambuco, este trabalho teve como objetivo identificar a presença do BPV 2 em amostras de verrugas cutâneas, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para a realização do experimento o projeto foi encaminhado à Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sendo iniciado após análise e parecer favorável para seu desenvolvimento.

O experimento foi desenvolvido na fazenda de beneficiamento de leite tipo B localizada no município de Ribeirão, Pernambuco (PE) e no Departamento de Genética Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### **2.1 Animais**

A propriedade escolhida tinha em seu plantel animais de aptidão leiteira, entre bovinos e bubalinos, destes foram utilizadas 40 amostras de verrugas cutâneas de bovinos, com idades variadas, mestiços de holandês. Os animais apresentaram, após resultado macroscópico e histopatológico, diferentes tipos de papilomas cutâneos (pedunculado, plano e misto) e de variáveis graus de papilomatose (leve, moderado e intenso, considerando 25, 50 e acima de 50% respectivamente do corpo afetado por papilomas).

### **2.2 Amostras e Extração do DNA**

Foi feita coleta de papilomas localizados em diversos locais do corpo dos animais. A coleta das verrugas seguiu um protocolo de desinfecção e anti-sepsia. Com limpeza local com água e sabão e anti-sepsia da área ao redor das verrugas com álcool a 70°C, em seguida, realizou-se a incisão dos papilomas, utilizando-se tesoura de Mayo® e lâmina de bisturi.

Utilizaram-se luvas descartáveis para cada animal. As amostras foram empacotadas em papel alumínio e emersas em nitrogênio líquido, após a congelação, as mesmas foram transportadas sob gelo para o laboratório e mantidas em refrigeração a -4°C até o momento de processamento. Cerca de 30 mg de material das verrugas selecionadas foram maceradas individualmente para extração de DNA total com o auxílio do kit da Ambresco e a mesma foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante.

### 2.3 Análise por PCR

Cerca de 100 µg de DNA foi utilizado para a análise por PCR. A qualidade do DNA foi controlada por amplificação com os *primers* para detecção do gene β-globina bovina (fw: 5' – AAC CTC TTT GTT CAC AAC CAG – 3' rev 5' – CAG ATG CTT AAC CCA CTG AGG – 3') que amplificam um fragmento de 450 pb, como controle da qualidade do DNA extraído. Além dos controles negativos e positivos. A reação foi realizada com adaptações do protocolo de Stocco et al, 1998.

O ciclo da PCR consistiu de uma desnaturação inicial por 3 min. a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40s, anelamento por 40s a 58°C, e extensão por 1 min. a 72°C. A reação de amplificação ocorreu em volume final de 25 µL, contendo 1X o tampão da enzima, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP mix, 1 µL de cada *primer* e 0,625U/µL de **Taq** DNA polimerase (Cenbiot Enzimas). A detecção de papilomavírus foi realizada por dois diferentes pares de *primers* Consenso, FAP59 (Fw 5'-TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT-3') e FAP64 (Rev 5'-CCW ATA TCW VHC CAT ITC ICC ATC-3'); e MY11 (Fw 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') e MY09 (Rev 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') a partir do protocolo de Ogawa et al (2004) com adaptações.

A reação de amplificação ocorreu em um volume de 25 µL, contendo 1X do tampão da enzima, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP mix (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, USA ), 0,25 µM de cada *primer* e 0,625U/ µL de **Taq** DNA polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup> ). Para o par de *primer* FAP59/64, após uma desnaturação inicial a 94°C por 10 min., a PCR consistiu de 45 ciclos de 1,5min. a 94°C, 1,5min. a 50°C e 1,5min. a 72°C, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 min. Para o par de *primer* MY09/11, inicialmente houve uma desnaturação a 95°C por 5 min., seguida por 35 ciclos de 30s a 94°C, 30 s a 58°C, e 1 min. a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 min. O processo de amplificação foi realizado utilizando-se um termociclador (PTC 200-Mj Research Co. Water Town, MA, USA).

Para a tipificação do papilomavírus foram utilizados *primers* específicos para BPV-2 (Fw 5'-GTTATACCACCCAAAGAAGACCCT-3' e Rev 5'-



CTGGTTGCAACAGCTCTCTTTCTC-3’), com seqüências complementares à região codificadora L1 (STOCCO et al, 1998). As condições da PCR são as mesmas descritas acima para a amplificação com os *primers* para  $\beta$ -globina.

Os produtos de amplificação (10 $\mu$ l) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, corados com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, onde foram fotografados utilizando máquina Polaroid®.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a infecção pelo BPV possa ser detectada por outras técnicas, como a histopatologia, optou-se, neste trabalho, pela técnica da PCR, já que, a rapidez, a alta sensibilidade e especificidade na obtenção dos resultados, em comparação aos outros métodos convencionais, tornam a PCR um instrumento alternativo e prático na detecção do papilomavírus (WOSIACKI et al., 2002).

A análise molecular resultou bandas com *primers* genérico (FAP e MY) e específico (BPV2) em 33 amostras (82,5%), indicando a presença do vírus na propriedade (Tab. 1).

AMOSTRAS	PRIMERS			
	B-GLOBINA	FAP	MY	BPV2
1	-	ND	ND	+
2	+	+	-	+
3	+	+	-	+
4	+	+	-	+
5	+	-	-	+
6	-	ND	ND	+
7	+	-	-	+
8	+	+	-	+
9	+	+	-	+
10	-	ND	ND	+
11	-	ND	ND	+
12	+	-	-	+
13	+	-	-	+
14	+	+	-	+
15	+	-	-	-
16	+	+	-	+
17	+	+	+	+
18	+	-	-	+
19	+	-	-	+
20	+	+	-	+
21	-	ND	ND	+
22	+	+	-	-
23	-			+
24	+	+	-	+

25	-	ND	ND	+
26	-	ND	ND	+
27	-	ND	ND	+
28	-	ND	ND	+
29	+	-	-	-
30	-	ND	ND	+
31	-	ND	ND	-
32	-	ND	ND	-
33	-	ND	ND	-
34	-	ND	ND	-
35	-	ND	ND	-
36	+	-	-	+
37	-	ND	ND	+
38	+	-	-	+
39	-	-	-	+
40	+	+	-	+

(ND) Não determinado; (+) presença; (-) ausência.

Tabela 1 Positividade para BPV em verrugas cutâneas de bovinos na Região Agreste do Estado de Pernambuco/Brasil, 2006.

Os resultados reforçaram os relatos de Molineros e Rojas (1999); Olson (1990) e Carvalho et al. (2003) que detectaram a presença do vírus em vários países, estando presente em importantes regiões criatórias, como nos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, reforçando a idéia de que esta infecção existe também em Pernambuco (Fig. 1).

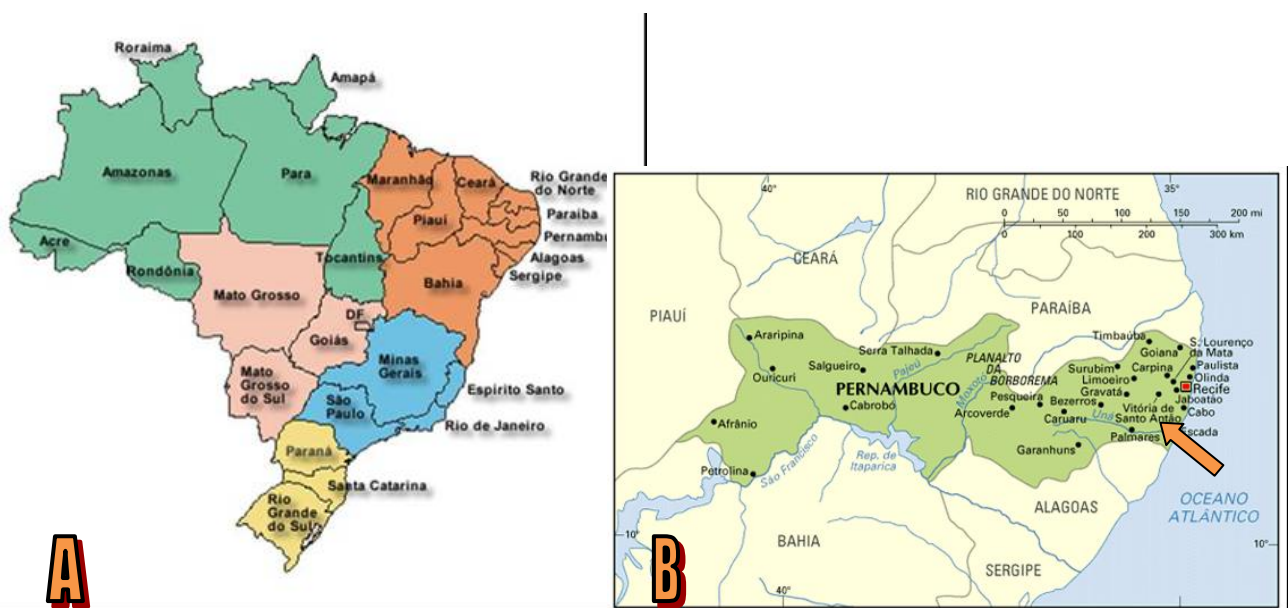
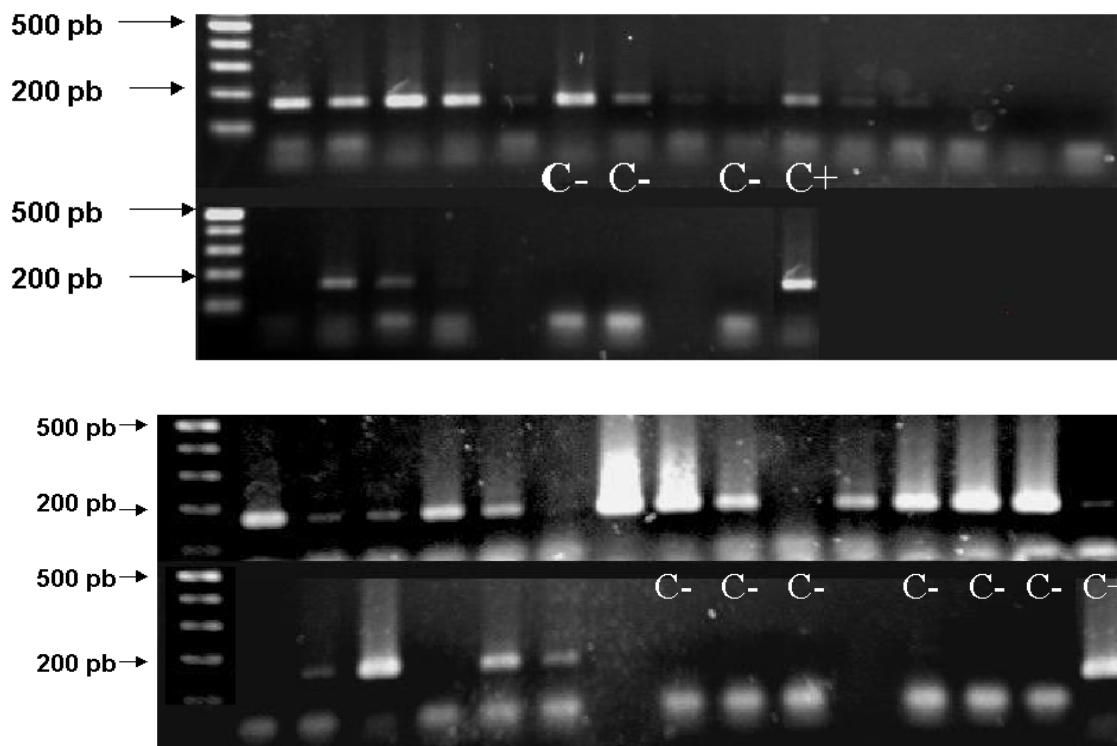


Figura 1. A-Mapa do Brasil. B- Observar em maior aumento a Região Agreste do Estado de Pernambuco (seta) onde foi detectada a presença do vírus da papilomatose cutânea bovina. In.: [www.espacociencia.pe.gov.br](http://www.espacociencia.pe.gov.br)

A qualidade do DNA extraído das amostras de verrugas cutâneas de bovino foi controlada pela amplificação de um fragmento do gene  $\beta$ -globina bovina. O fragmento de 450 pares de base foi amplificado em 22 das 40 amostras avaliadas (55%). A presença de papilomavirus foi avaliada por PCR com os *primers* FAP59/94 e MY09/11 apenas nas amostras onde houve a amplificação com na  $\beta$ -globina. Houve amplificação em 12 das 22 (54,5%) amostras avaliadas para os *primers* FAP59/64 e em apenas 1 das 22 (4,5%) com o MY09/11, mostrando assim, uma maior sensibilidade do FAP59/64.

Utilizando-se os *primers* específicos para BPV-2 obteve-se uma positividade em 32 das 40 amostras avaliadas (80%), não sendo possível, nas amostras restantes, a diferenciação nos demais tipos virais. Considerando-se apenas as amostras que amplificaram com os *primers* para  $\beta$ -globina, houve a amplificação em 19 das 22 amostras avaliadas (86%). (Fig.2)



**Figura 2** - PCRs com primer BPV-2 para tipificação de DNA viral extraído de verrugas cutâneas. Na imagem estão representadas diferentes amostras de DNA seguidas por controles negativos e positivo respectivamente. Como esperado para BPV 2 o fragmento amplificado contém 172 pb.

Apesar dos conjuntos de *primers* FAP59/64 e MY09/11 serem largamente utilizados em estudos epidemiológicos na detecção de papilomatose humana a vírus (HPV) devido a sua alta sensibilidade (CHAN et al., 1995; FORSLUND et al, 1999; MANOS et al, 2004; De VILLERS et al, 2005), os *primers* supracitados mostraram-se relativamente ineficientes na detecção do BPV em várias amostras, não sendo possível a identificação de bandas

equivalentes aos fragmentos esperados para os tipos virais. Contradizendo os achados de Ogawa et al. (2004), que relata que estes *primers* detectaram 100% de BPV nas amostras de verrugas cutâneas de bovino.

Por outro lado, não se pode categorizar como negativas estas amostras, salvo que, há relatos na literatura (ROCHA et al., 1998) que descrevem que há relação entre a carga viral, o momento da coleta e a eficiência da técnica como método de diagnóstico, visto que, se a amostra coletada apresentar baixa carga viral, a PCR pode não detectar a presença do vírus, corroborando com os resultados verificados neste experimento.

Porém, a análise molecular do DNA extraído das verrugas com *primers* genéricos, para ampliação de qualquer tipo de papiloma, justifica-se pela necessidade de aumentar a capacidade de detecção do genoma viral por PCR, uma vez que a inserção do DNA viral no genoma da célula ocorre perda parcial de seqüências dos genes da papilomatose, com perdas das regiões de anelamento dos *primers* genéricos (KARLSEN et al., 1996; QU et al., 1997; GRAVITT et al., 2000; KADO et al., 2001; SILVA et al., 2003). Trabalhos utilizando esses mesmos *primers* para a detecção de BPV são menos freqüentes, porém a sua utilização tem sido demonstrada (OGAWA et al., 2004).

Diferentes fatores influenciam na sensibilidade da PCR como: o método utilizado na extração do DNA, o tamanho do fragmento amplificado, a qualidade do tecido de onde ocorreu à extração, a quantidade e qualidade de DNA utilizada e as condições da PCR (GEBARA, 2004), assim sendo, a diferença de sensibilidade entre os *primers* de detecção geral (FAP59/64, MY09/11),  $\beta$ -globina bovina e BPV-2 pode ser explicada pelo tamanho do fragmento amplificado nessas amostras, que apresentavam DNA possivelmente degradado, mas que foi possível a amplificação de um fragmento pequeno de L1 a partir do *primers* específicos para BPV-2 mesmo em amostras  $\beta$ -globina negativas.

Optou-se por usar o *primer* específico para o tipo 2, salvo que, a infecção pelo BPV 2 é precursora para o desenvolvimento de outras doenças. Como observado em amostras de bexiga urinária de bovinos com hematúria enzoótica crônica, em bexiga apresentando lesões neoplásicas ou não, no trato reprodutivo e gametas de vacas e em sangue periférico de bovinos, podendo produzir abortos e infecções ocultas, sendo importante a sua investigação. Este achado corrobora com os de Campo (1999); Stocco et al. (1998); Borzachiello et al. (2003); Freitas, (2003); Campo (2006) e Wosiacki et al. (2006).

#### **4 CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados, pode-se concluir que a presença da BPV no Estado de Pernambuco, está em concordância com os achados mundiais, destacando-se a importância da genotipagem no controle da infecção, e, conseqüentemente, adoção de terapia específica.

## 5 REFERÊNCIAS

BORZACCHIELLO, G.; LOVANE, G.; MARCANTE, M.L Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein e5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. **Journal of General Virology**, v.84, p.2921–2926, 2003.

CAMPO, M. S .et al. Synergism between papillomavirus and bracken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In: TAYLOR, J.A., SMITH, R.T. (Eds.), Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control, pp. 116\_/122. 1999.

CAMPO, M. S. *Bovine papillomavirus: old system, new lessons?* In Campo, M.S. (Eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond, Chap 23. First published in Wymondham, England: Caister Academic Press pP.1 - 34, 2006.

CARVALHO, C. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, p.82-84, 2003.

CHAN, S. Y. et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing phylogeny, and taxonomy. **J Virol**, v.69, p.3074 – 3083, 1995

DeVILLIERS, E-M., et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v.324, p.17-27, 2004.

FORSLUND, O. et al. A broad range of human papillomaviruses types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal of General Virology**. 80, 2437 – 2443, 1999.

FREITAS, A. C. Viral DNA Sequences In Peripheral Blood And Vertical Transmission of the virus: a discussion about BPV-1 **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 34 (Suppl.1), v.76-78, 2003.

GEBARA, E.T . Optimizing DNA amplification protocols. Genoma analysis: a practical approach. .Oxford: IRL Press, p.141-152. 2004.

GRAVITT, E. P. et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **J Clin Microbiol**. v.38, p. 357 – 361, jan/2000.

KADO, S. et al. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. **Gynecol Oncol**, v.81, p.47 – 52, 2001.

KARLSEN, F. et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, sept,v.34, n.9, p.2095-2100, 1996.

KNOWLES, G.; O’Neil, B.W.; Campo, M.S. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. **J. Virol.**, v.70, p.8451-8458, 1996.

MANOS et al. The use of polimerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cell**, v.7, p.209 – 214, 2004.

MOLINEROS, L.F, ROJAS, N. Diagnóstico sanitario de la papilomatosis bovina em el Municipio de Popayán e alguns de sus alrededores. Popayán (Cauca): Universidad del Cauca, p.1-4, 1999.

MUTIRANGURA, A. Serum/plasma viral DNA. **Ann. Acad. Sci.**, v.945, p.59-67, 2001.

OGAWA, T. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **J. Gen. Virol.** v.85, p.2191-2197, 2004.

OLSON, C. **Papillomaviruses**. In: Virus infections of ruminants. Amsterdam: Elsevier Science Publisher. B., v. 572p, 1990.

QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP05+/GP06+ primers systems. **J Clin Microbiol.** v.35, n.6, p.1304-1310, 1997.

ROCHA, M.A. et al. Hig sensitivity-nested PCR assay for HBV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary microbiobiology**, v.63, p.1-11, 1998.

SILVA, A. M. T. C. et al. Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em pacientes com papilomatose laríngea recorrente. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.49, n.3, p.167 – 174, 2003.

STOCCO S. R.C. et al., Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **J. Gen. Virol.**, v.79, p.2127-2135, 1998.

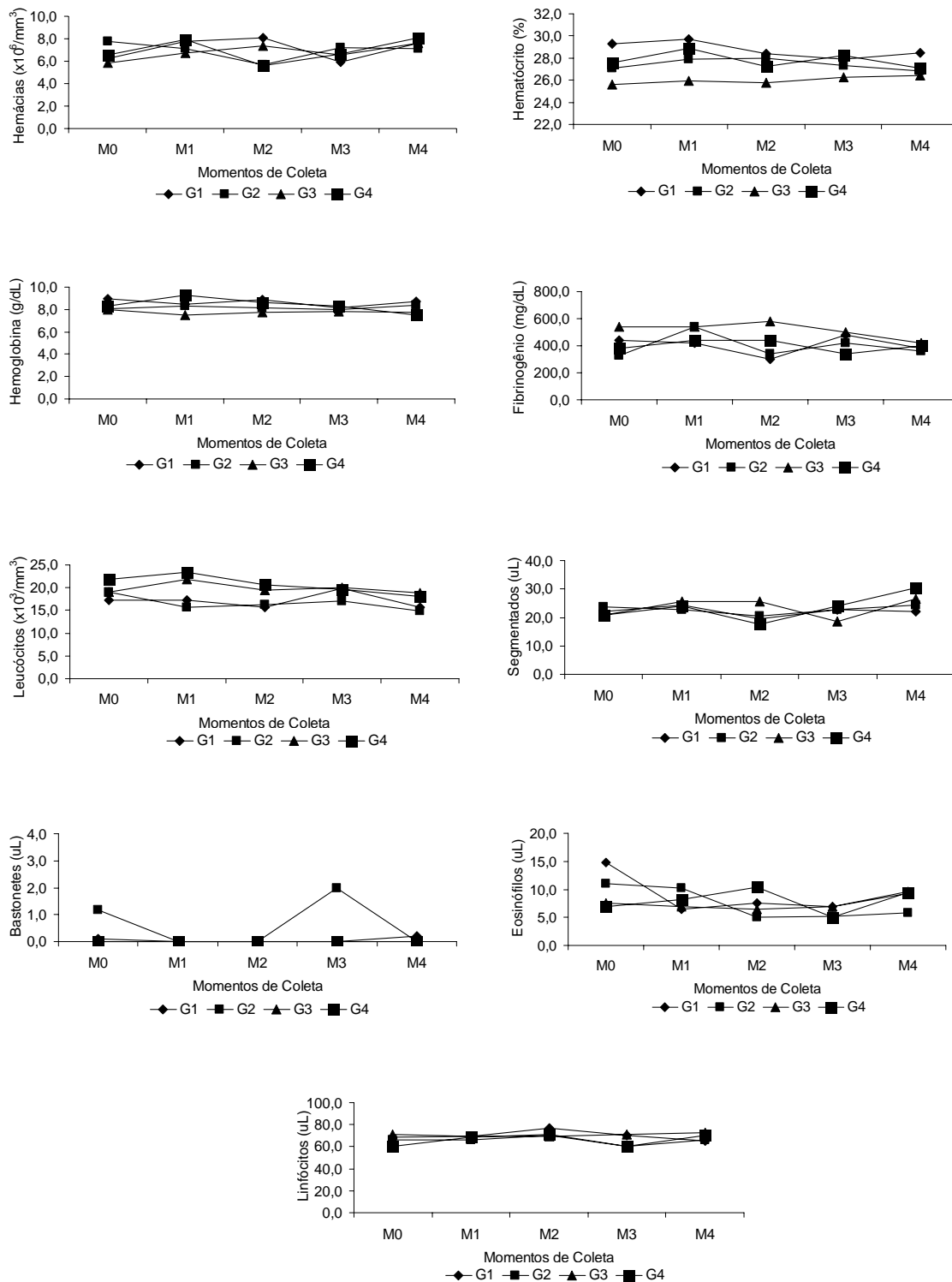


WOSIACKI, S.R. **Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia polimerase e estudo histopatológico** 102p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.Centro de Ciências Agrárias. Londrina, 2002.

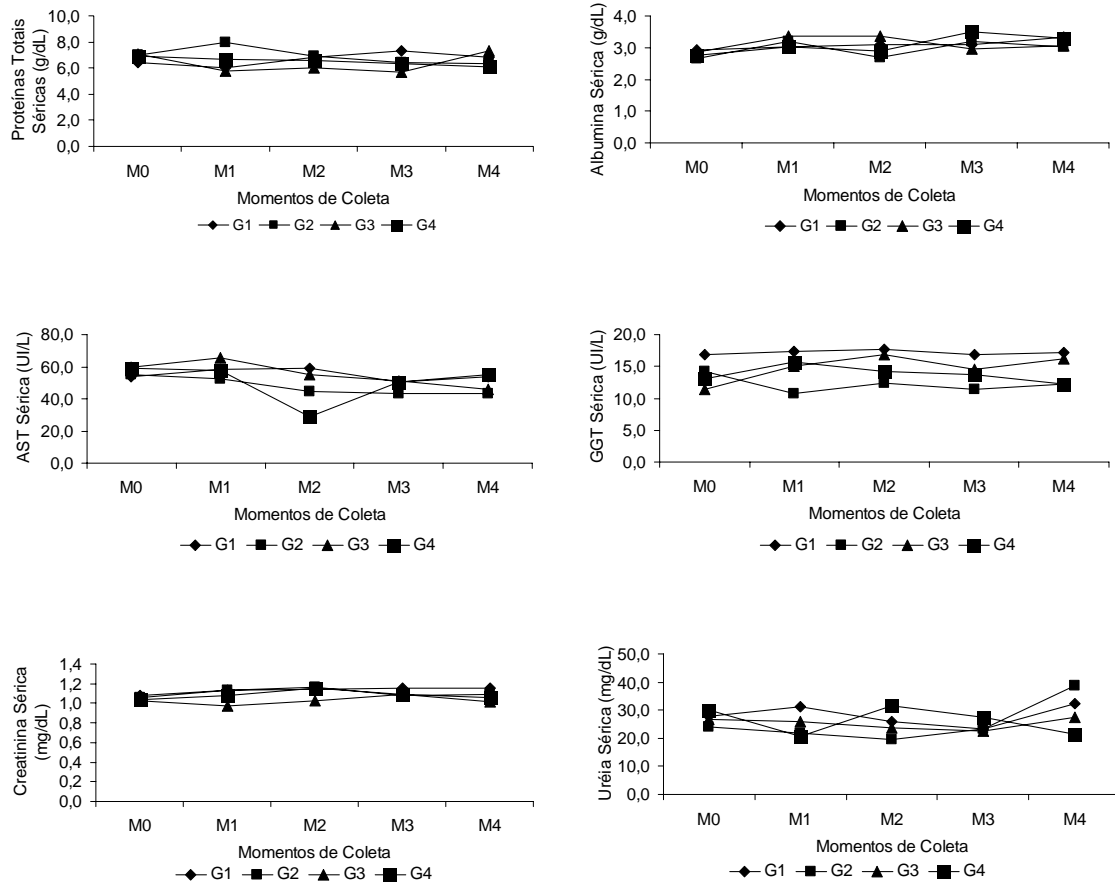
WOSIACKI, S. R. et al. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, n.6, p.635-638, 2006.

## *ANEXOS*

Médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dos bovinos com papilomatose cutânea e tratados com *Thuya occidentalis* tintura mãe (T.M.) a 30% e *Thuya occidentalis* tintura mãe (T.M.) a 30% com própolis.

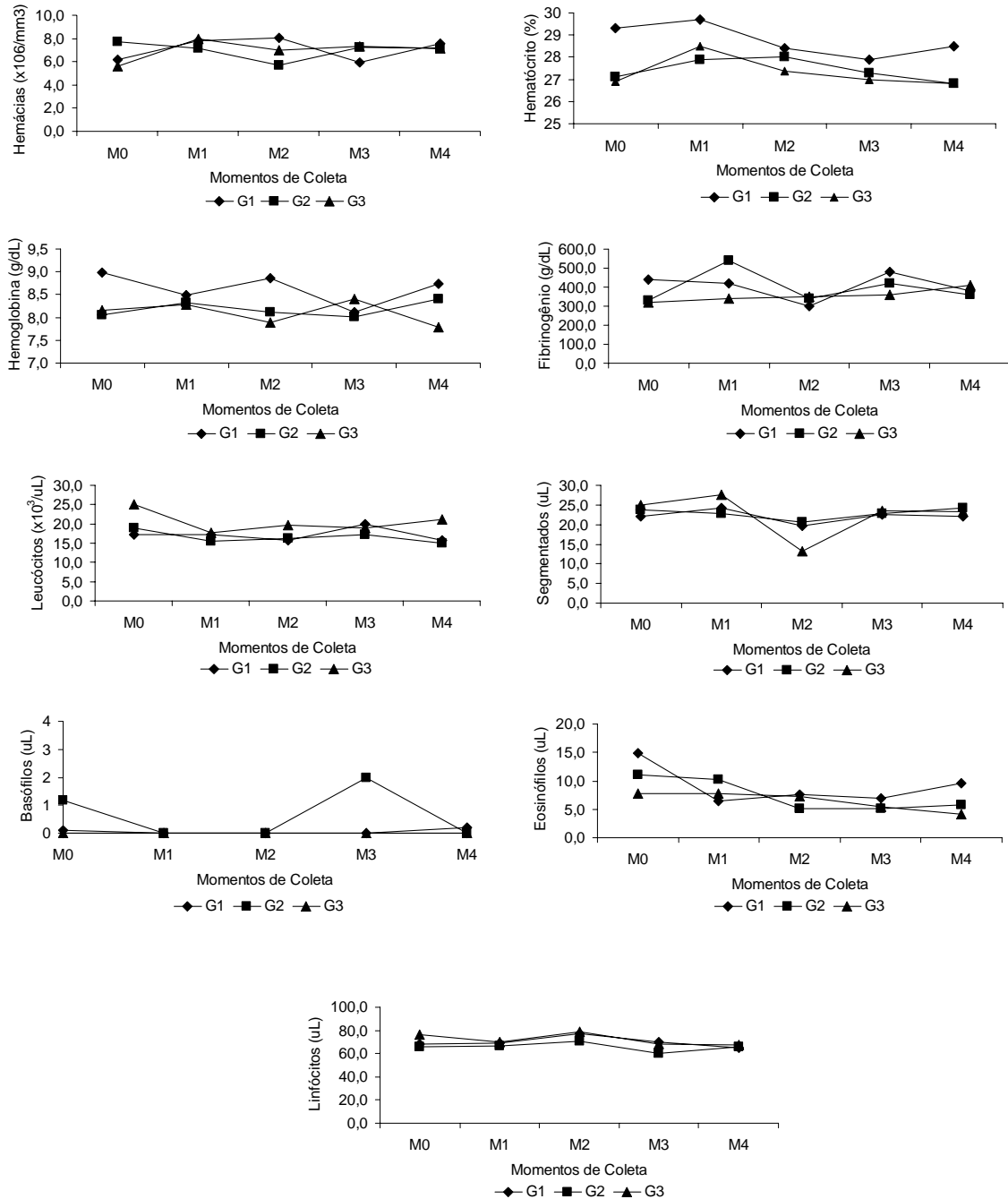


As figuras ilustram os parâmetros médios da hematologia de bovinos com papilomatose cutânea em todos os grupos e momentos, no período de 63 dias.

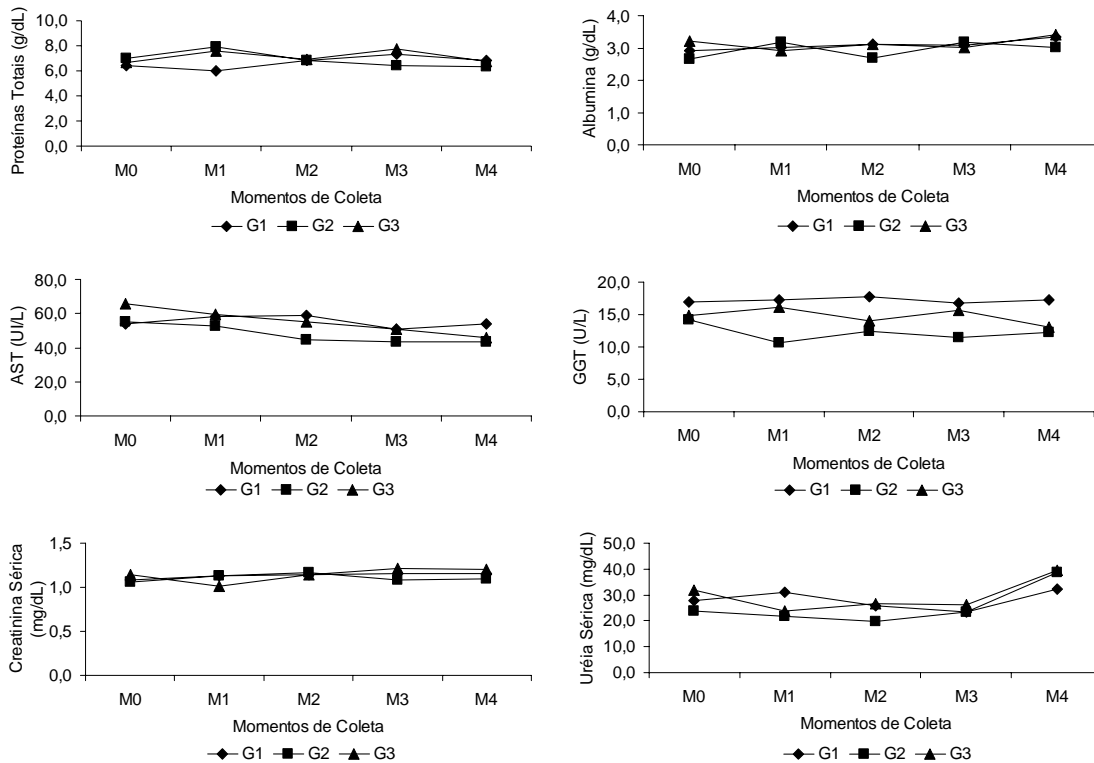


As figuras ilustram os parâmetros médios da bioquímica sérica de bovinos com papilomatose cutânea em todos os grupos e momentos, no período de 63 dias.

### Médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos dos bovinos com papilomatose cutânea e tratados com *Thuya occidentalis* CH6.



As figuras ilustram o perfil das médias dos parâmetros hematológicos de bovinos com papilomatose em todos os grupos e momentos, no período de 63 dias.



As figuras ilustram o perfil das médias dos parâmetros bioquímicos séricos de bovinos com papilomatose cutânea em todos os grupos e momentos, no período de 63 dias..