



**Detección Y genotipificación molecular del virus de papiloma
bovino en lesiones de animales afectados por papilomatosis
cutánea**

Detection and molecular genotyping of bovine papillomavirus in lesions of animals affected
by cutaneous papillomatosis

*Artículo resultado de proyecto de investigación financiado por
La Universidad Cuenca*

*Lennin Enrique Sigüencia Santander
Universidad de Cuenca
<https://orcid.org/0000-0002-5676-6019>
lennin.sigüencias@ucuenca.edu.ec
Cuenca - Ecuador*

<http://centrosuragraria.com/index.php/revista>

Publicada por: Instituto Edwards Deming
Quito - Ecuador
Enero - Junio vol. 1. Num. 5 2020

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

RECIBIDO: 8 DE OCTUBRE 2019
ACEPTADO: 14 DE NOVIEMBRE 2019
PUBLICADO: 4 DE ENERO 2020

RESUMEN

La papilomatosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible causada por uno o más de los 15 tipos de papiloma virus bovino, las lesiones se caracterizan por crecimientos neoplásicos dispersos o en grupos, localizados en los epitelios corporales queratinizados y no queratinizados. Así como también en las superficies mucosas del aparato digestivo y genitourinario, relacionado este último con el consumo crónico de helechos del género *Pteridium*. En el presente trabajo se planteó la identificación de material genético de los virus de papiloma bovino y su genotipificación, mediante las técnicas de biología molecular (PCR Y RFLP) para lo cual se efectuó la recolección de 40 muestras *post-mortem* de lesiones sugestivas de papilomatosis bovina, de 30 bovinos faenados en los camales de Cuenca, Paute y Azogues, además se colectaron 13 muestras *ante-mortem* de 11 animales de la provincia de El Oro. Las muestras positivas corresponden a lesiones presentes en el cuello, la ubre, morro y pabellón auricular. Los tipos que se encontraron con mayor frecuencia fueron el 3 y 6, seguido de los tipos 7 y 9. Además se visualizaron 4 tipos de patrones de restricción, uno de los cuales se repitió en 7 de las 18 muestras positivas, las mismas que no corresponden a los patrones predichos para cada uno de los 15 tipos de BPV. Con la detección y genotipificación de los tipos de papiloma virus bovino se puede realizar a posterior una vacuna multivalente como una herramienta profiláctica y terapéutica específica para los tipos de BPV que circulan en el Ecuador.

PALABRAS CLAVE: Papilomatosis cutánea, Virus de papiloma bovino, Detección, Genotipificación.

ABSTRACT

Bovine papillomatosis is an infectious-transmissible disease caused by one or more of the 15 types of bovine papilloma virus, the lesions are characterized by scattered neoplastic growths or in groups located in keratinized and nonkeratinized body epithelia. As well as in the mucous surfaces of the digestive and genitourinary tract, the latter related to the chronic consumption of ferns of the genus *Pteridium*. In the present work, the genetic material of bovine papilloma virus and its genotyping was identified using molecular biology techniques (PCR and RFLP) for which 40 postmortem samples were collected from lesions suggestive of papillomatosis bovine, of 30 cattle slaughtered in the camels of Cuenca, Paute and Azogues. In addition, 13 antemortem samples were collected from 11 animals from the province of El Oro. Positive samples correspond to lesions present in the neck, udder, canopy handset The most frequently encountered types were 3 and 6, followed by types 7 and 9. In addition, 4 types of restriction patterns were visualized, one of which was repeated in 7 of the 18 positive samples, the same as no correspond to the predicted patterns for each of the 15 types of BPV. With the detection and genotyping of bovine papilloma virus types, a multivalent vaccine can be carried out as a prophylactic and therapeutic tool specific to the types of BPV circulating in Ecuador.

KEY WORDS: Cutaneous papillomatosis, Bovine papilloma virus, Detection, Genotyping

INTRODUCCIÓN

La papilomatosis bovina es una enfermedad viral de carácter infecto-transmisible caracterizada por provocar alteraciones a nivel de la piel y las mucosas que están revestidas por epitelio estratificado plano queratinizado y no queratinizado (White & Howley, 2013; De Melo T.C., et al, 2011). Su agente causal es un virus, denominado virus del papiloma bovino (BPV). Entre los efectos que genera la papilomatosis se encuentra la formación de lesiones neoplásicas benignas denominadas papilomas o fibropapilomas, las lesiones tienden a ser múltiples y se ubican principalmente en la cara, cuello, espalda, tronco, ubre, pezones, incluso en el esófago, rumen y vejiga urinaria (Bocaneti et al., 2014; De Araldi, R.P., et al., 2014). Además puede causar ceguera, desarrollo retardado, problemas de infertilidad, desvalorización del cuero del animal debido a su apariencia y consecuentemente la disminución del valor de los animales al momento de la comercialización (Bocaneti F., et al, 2014).

En ocasiones los papilomas pueden progresar a la magnificación, o a la desaparición de la infección cuando el sistema inmune del animal logra controlar la infección. En el Ecuador la papilomatosis bovina perjudica significativamente la producción de los hatos ganaderos, generando pérdidas económicas a los propietarios (Borzacchiello et al., 2008).

A más de las afecciones de la piel algunos tipos de virus están relacionados con el desarrollo de hematuria vesical enzoótica bovina junto a la intoxicación con Ptaquilosido originada por la ingesta aguda de helechos del género *Pteridium*. En el momento en que los bovinos afectados por papilomatosis consumen los helechos, los mismos que poseen otro compuesto inmunosupresor que favorece la infección, lo que favorece el desarrollo y la evolución de neoplasias malignas (Aguilar, J. M., & C. Alvarado. 2006).

Para el tratamiento y prevención de esta infección viral se han utilizado estrategias no inmunológicas e inmunológicas, dentro de las primeras se encuentran acciones como la remoción quirúrgica, y en las segundas la hemoterapia, terapia con auto antígenos, y los no autógenos, éstos últimos antígenos se han sido elaborados a partir de material genético obtenido de los papilomas o fibropapilomas (Cantú, D. 2014).

En la actualidad en el Ecuador no se cuenta con vacunas específicas contra la papilomatosis bovina; ya que se desconoce cuál o cuáles de los 15 tipos de BPV descritos en varias investigaciones, son los agentes causales más frecuentes de las lesiones encontradas a nivel de la piel de los animales (Charry-Dávalos J.V. & M.F. Hinojosa-López. 2011).

Para la detección y genotipificación se emplearon las herramientas de biología molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ésta técnica tiene como finalidad obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) particular, partiendo de una copia del fragmento original o molde, y PCR-RFLP (Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción) la cual se refiere a la determinación del patrón de fragmentos y su longitud, obtenidos al digerir un fragmento de ADN

Implementar técnicas de biología molecular para identificar y genotipificar los diferentes tipos de virus de papiloma bovino que afectan la piel de animales con lesiones compatibles a papilomatosis bovina, que son faenados en los camales Municipales de Azogues, Cuenca y Paute, lo que permitirá estimar la frecuencia de presentación de cada uno de los tipos de virus de papiloma bovino.

Implementar y validar un ensayo de PCR para la identificación de ADN genómico de los diferentes tipos de virus de papiloma presentes en muestras de animales con lesiones sugestivas a papilomas cutáneos.

Implementar y validar un ensayo de RFLP para la identificación genotípica de cada uno de los diferentes tipos de virus de papiloma bovino hasta ahora descritos que afectan a estos animales.

Determinar la frecuencia, ubicación de los papilomas en el cuerpo del animal, así como los tipos de virus que se encuentran presentes en los bovinos que serán faenados en los camales municipales de Azogues, Cuenca y Paute.

En las muestras de lesiones cutáneas obtenidas de bovinos afectados por papilomatosis bovina es posible detectar y genotificar mediante las herramientas de biología molecular PCR-RFLP los 15 tipos de virus de papiloma descritos.

El Papilomavirus Bovino (BPV) es el agente etiológico de la papilomatosis bovina, una enfermedad infecto-transmisible caracterizada por la presencia de lesiones neoplásicas benignas. La enfermedad no sólo afecta al tejido de la piel y de la mucosa, sino también puede contribuir al desarrollo de cáncer (Stocco dos Santos *et al.*, 1998).

Los BPV se han descrito a través de todo el mundo, y su transmisión puede ocurrir mediante contacto directo o indirecto entre los animales infectados o por contacto con fómites contaminados, tales como máquinas de ordeño, dispensadores de agua, comederos, cuerdas o vallas o transmitida por insectos (Love *et al.*, 2012).

La infección de BPV parte de un micro lesión, que expone el peptidoglicano de sulfato de heparina presente en la membrana plasmática, la misma que es el receptor que permite que se adhieran las partículas de BPV. La infección comienza en la capa basal del epitelio, donde el genoma viral se mantiene a un bajo número de copias, y depende de la diferenciación celular de los queratinocitos para continuar con el proceso de replicación viral (McBride *et al.*, 2012).

El BPV es un virus epiteliotrópico, con un genoma constituido por ADN de cadena doble. Provoca diversas enfermedades tumorales bovinas en todo el mundo (He *et al.*, 2013).

Aunque las lesiones del papiloma se encuentran en los pezones y ubres pueden ser causadas por diversos tipos de BPV, el tipo 6 es el que más a menudo se ha identificado en ésta localización anatómica. Sin embargo, la infección por los tipos BPV 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 11, y otros tipos puede presentarse en las glándulas mamarias del ganado (Jarreté *et al.*, 1984; Campo *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 2004; Claus *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2007; Noel *et al.*, 2008).

A los BPV no se les puede aislar y cultivar de la misma forma que el resto de los virus, y la diferenciación de los tipos se basa en las características de las lesiones, análisis de ADN, hibridación y PCR.

En resumen, en los bovinos hasta el momento se conocen 15 tipos diferentes de BPV, los que causan diferentes tipos de lesiones. En el caso del BPV tipo 1 causa papilomas frondosos de la piel de pezones y fibropapilomas en el pene; junto con el BPV tipo 2, fibropapilomas de la piel de la zona anteroventral del cuerpo, incluyendo la frente, cuello y espalda, llamadas verrugas comunes. Adicionalmente el BPV tipo 2 es responsable fibropapilomas en forma de coliflor en la piel ventral del abdomen y región anogenital. Se asocia con cáncer de vejiga en los bovinos.

El BPV tipo 3 se asocia a papilomas cutáneos; el BPV tipo 4 a papilomas de esófago, pre estómagos, estómago glandular e intestino delgado. Puede favorecer la malignificación de éstas lesiones sobre todo en animales que consumen hebrecho. En general el BPV tipo 4 tiene especificidad por el tracto gastrointestinal superior y ocasiona papilomas orales, principalmente en animales adultos.

Es por ello que la papilomatosis bovina se ha presentado en los rebaños lecheros de todo el mundo como un problema de salud del ganado que provoca pérdidas económicas (Field, 2003). Por lo que el ordeño puede llegar a ser difícil en los bovinos notoriamente afectados, la presencia de ulceración y rotura de las lesiones cutáneas establecidas podrían predisponer a las vacas lecheras a la mastitis y la distorsión de los conductos de la leche. Además, el mantenimiento de vacas afectadas con alteración en la glándula mamaria incluso en rebaños con un elevado número de animales afectados pueden reducir las ganancias económicas en la industria láctea (Campo, 2002; Borzacchiello *et al.*, 2008). En otros animales se ha relacionado a los BPV con la presencia de sarcoide, como en los equinos, felinos y cáncer de oreja en las ovejas (Falah *et al.*, 2000).

En la papilomatosis bovina el virus es excretado en las células descamadas de la epidermis de animales infectados y se transmite por contacto directo con éstas, o con objetos inanimados contaminados, como sogas, agujas, narigueras, equipo de areteo, tijeras de descorne, postes, las manos humanas e incluso se sugiere por acción de vectores artrópodos.

En los elementos contaminados el virus puede mantenerse activo por varios días e infectar a los animales cuando estos se frotan entre ellos (Cantú, 2014).

Se ha descrito que es común que los animales que son sometidos a acicalamiento (*grooming*) para exposiciones desarrollen lesiones extensas, por otro lado se sugiere que la transmisión sexual es posible en procesos reproductivos. También se ha reportado que a nivel perianal la transmisión ocurre por examen rectal durante chequeos ginecológicos, sobre todo en vaconas. La presencia de ADN en fluidos corporales como leche, sangre y semen sugiere que la transmisión de los BPV por otros medios, además del contacto directo con epitelio o instrumentos contaminados. La monta y la lactancia son los principales medios para el intercambio directo de fluidos corporales entre el ganado, por lo que son mecanismos muy importantes para la transmisión de los BPV (Yagui *et al.*, 2006).

El proceso de la enfermedad se relaciona directamente con una débil respuesta inmunológica. Los papilomas se presentan luego de que el virus ha ingresado en el hospedero, a través de abrasiones o heridas en la piel. La infección de las células epiteliales lleva al desarrollo de hiperplasia, seguida de degeneración epitelial e hiperqueratinización. Estos cambios se presentan luego de 4 a 6 semanas después de establecida la infección inicial (Campo M. (2003). Las lesiones hiperplásicas iniciales se describen como verrugas, papilomas o condilomas, que usualmente son benignas, pero pueden experimentar una transformación neoplásica maligna influenciada principalmente por factores ambientales. El virus infecta los queratinocitos basales y replican su genoma en las capas diferenciadas espinosa y granular, provocando el crecimiento excesivo de las verrugas. El tumor contiene tejido epitelial y conectivo, puede ser un papiloma o fibropapiloma dependiendo si contiene poco tejido conectivo o tejido fibroso con poco tejido epitelial respectivamente. Los papilomas se producen como resultado de una hiperplasia celular sin producción de antígenos virales

(Brandt S., *et al*, 2011). Puede desarrollarse una infección latente a nivel cutáneo y de linfocitos.

El nivel de los anticuerpos neutralizantes parece estar relacionado con la regresión de lesiones y con la protección contra la reinfección. El progreso de las lesiones a la malignidad es consecuencia de las acciones virales oncogénicas dentro del huésped, que corresponden a los genes tempranos. Se ha dicho que el virus de BPV se ha caracterizado por ser un virus epiteliotropo, se sugiere que puede también encontrarse en otros fluidos corporales como sangre completa, (pudiendo ser los linfocitos el sitio de latencia del virus), plasma, leche, calostro, placenta, y líquido amniótico (Babaahmady & Taherpour, 2011).

El análisis histopatológico de la lesión es un procedimiento importante, ya que permite identificar tumores intra-epiteliales asociados con virus oncogénicos, como las causadas por BPV, haciendo de esta una herramienta complementaria en el diagnóstico molecular (Turk *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2008; Leto *et al.*, 2011). El análisis histopatológico también indica una predilección por las zonas anatómicas y topográficas relacionadas con los tipos virales específicas (Monteiro *et al.*, 2008). Los hallazgos patológicos incluyen hiperplasia de las células de la capa espinosa (acantosis), hiperqueratosis, paraqueratosis, papilomatosis y koilocitosis (Turk *et al*, 2005; Anjos *et al*, 2010; Marins & Ferreira, 2011). Aunque koilocitosis está presente en el tejido infectado por el BPV, esto no se considera un marcador patognomónico.

En el Ecuador no existe una vacuna multivalente efectiva contra la papilomatosis bovina. Es por ello que esta investigación se encaminará a realizar la identificación y genotipificación de los diferentes tipos de BPV que afectan a los animales en estudio, para posterior a ello fabricar una vacuna multivalente con los tipos de BPV más frecuentes que afectan a los animales.

En el estudio desarrollado por Ruiz *et al.*, (2015) relacionado a la obtención de vacunas, la investigación determinó que la proteína principal de la cubierta del papilomavirus (L1) puede auto-ensamblarse en partículas semejantes a VLP (*Virus- particle like*) altamente inmunogénicas

La expresión de la proteína L1 en *Nicotiana benthamiana* con el vector pEAQ (Sainsbury *et al.*, 2009), con rendimientos de 183 mg/kg de tejido de la hoja en peso fresco, y de las cuales las VLP de alta pureza fueron capaces de inducir una fuerte respuesta inmune en los conejos inoculados. En este trabajo, el rendimiento de proteína excede el nivel básico requerido para la producción económica de una vacuna con lo que ésta planta es una excelente candidato para producir potenciales vacunas contra los BPV. Sin embargo, en otros intentos de la expresión transitoria de VLP en plantas han sido difíciles debido a los bajos rendimientos,

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se indican los materiales y los métodos que se usaron y aplicaron en cada una de las actividades planificadas para el proyecto de titulación.

Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de lesiones de papilomatosis bovina para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1):

Biológicos

Se colectaron 53 muestras de 41 bovinos que presentaron papilomas a nivel cutáneo y mucosas del aparato digestivo.

Reactivos y soluciones

Solución de conservación (Solución al 90% de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0; 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.: G5516)).

Solución TE 10:1 100X (Solución de 1 M de Tris-HCl, pH 8.0 y 100 mM de EDTA).

Solución a 2 M de Tris-HCl, pH 8.0.

Solución a 500 mM de EDTA, pH 8.0.

Equipos y otros materiales

Platina de calentamiento con agitación magnética.

Potenciómetro (pHmetro).

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

Autoclave.

Equipo de filtración (Ø 0.22 µm).

Probetas y recipientes para soluciones.

Recipientes para las muestras (Tubos Falcon de 15 ml).

Kit de disección.

Guantes.

Solución desinfectante (Etanol al 70%).

Caja térmica para el transporte de muestras.

Formatos para la colección de la muestra (Anexo 1).

Métodos para realizar la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de lesiones de papilomatosis bovina para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1):

Pasos ejecutados

Paso 1. Se prepararon las soluciones requeridas.

Paso 2. Se colocaron en los recipientes para las muestras 8 ml de la solución de conservación de la muestra.

Paso 3. Se tomaron las muestras *post-mortem* de bovinos con papilomatosis cutánea faenados en los camales Municipales de Azogues, Cuenca y Paute, de acuerdo a la normativa del manejo respetuoso de los animales y así como también tomando las seguridades del caso para la viabilidad de las muestras en estudio.

Paso 4. Para la colecta se tomó una cantidad máxima de tejido de la lesión no mayor a la necesaria para llegar a tener un volumen de 10 ml (Marcado en el recipiente el volumen de 10 ml). El tejido se colectó en secciones de tejidos no mayor a 2 mm de grosor.

Paso 5. Se identificaron el o los recipientes y colectaron los datos necesarios para llenar el formato de datos para la colecta de las muestras.

Paso 6. Para el transporte de las muestras se procedió a colocar los recipientes en una caja térmica, evitando que se vuelquen y se generen derrames.

Paso 7. Para el almacenado de las muestras, se colocó los recipientes en refrigeración (4 °C). Con este procedimiento se pueden mantener viables las muestras por un periodo de 6 a 8 meses para la obtención del material genético.

3.3. Materiales a emplear para el procesamiento de las muestras de lesiones de papilomatosis bovina, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2):

3.3.1. Biológicos

Muestras de tejido colectado de las lesiones de papilomatosis bovina mantenidas en la Solución de conservación a 4°C.

3.3.2. Reactivos y soluciones

Solución de lisis (Solución con 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4 y 0.5 % de SDS (Sigma, Cat. No.: 71725). La solución ya preparada se almacenó a temperatura ambiente protegida de la luz solar directa

Tabla 1

Preparación de la premezcla para la generación de los productos de PCR específicos para el control de proceso y de los BPV

| Reactivo: | Concentración | | Volumen | |
|--------------------------------------|---------------|------------|---------------|----------------|
| | inicial: | final: | por reacción: | de premezcla*: |
| Agua grado biología molecular | No aplica | No aplica | 18.65 µl | 18.65 µl X n |
| Solución buffer de amplificación 10X | 10X | 1X | 2.5 µl | 2.5 µl X n |
| Solución de dNTP's | 10 mM | 0.1 mM | 0.5 µl | 0.5 µl X n |
| Solución de MgCl ₂ | 50 mM | 2.0 mM | 1.0 µl | 1.0 µl X n |
| Oligonucleótido 12SREVMod o FAP59For | 100 µM | 0.8 µM | 0.2 µl | 0.2 µl X n |
| Oligonucleótido 12SREVMod o FAP64Rev | 100 µM | 0.8 µM | 0.2 µl | 0.2 µl X n |
| Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa | 5 U/µl | 0.04 U/µ | 0.2 µl | 0.2 µl X n |
| Muestra de ADN total | ---- µg/µl | ---- µg/µl | 2.0 µl | 2.0 µl X n |
| Volumen final: | ----- | ----- | 25 µl | 25 µl X n |

Paso 3. La premezcla preparada se mezcló en el vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

Paso 4. Se marcaron los tubos de PCR (200 µl) y les fue colocado 23 µl de la premezcla y se les adicionó 2 µl de la muestra correspondiente.

Paso 5a. Las reacciones así preparadas se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del control de proceso en primer lugar.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las diferentes actividades experimentales realizadas:

En éste trabajo para la identificación y genotipificación molecular de los diferentes tipos de BPV se colectaron *post-mortem* 53 muestras de tejido de lesiones sugestivas a papilomatosis cutánea, 40 muestras procedentes de 30 bovinos que fueron faenados en los camales municipales de Azogues, Cuenca y Paute, adicionalmente se incluyeron 13 muestras *ante-mortem* de 11 bovinos procedentes del Cantón Zaruma (Provincia de El Oro).

Las muestras colectadas y mantenidas en la solución de conservación se transportaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca, en donde se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento y obtención del ADN total.

En con la aplicación de los protocolos de procesamiento y purificación de ADN total se logró obtener ADN total de 52 muestras de las 53 colectadas. De estas 52 muestras en 51 de ellas se logró obtener el amplicón en el ensayo de PCR correspondiente al control de proceso

De las 51 muestras válidas, es decir, que se logró obtener ADN total susceptible de ser amplificado, en 18 se observó un producto de PCR con un tamaño similar al esperado cuando se emplean los primers FAP59-FAP64, por lo que se les consideró como muestras positivas a la presencia de material genético de BPV.

Las 18 muestras positivas fueron reamplificadas para la detección de material genético y los productos de PCR obtenidos se sometieron al análisis mediante el ensayo de RFLP. Con el ensayo de RFLP se logró genotipificar la presencia de 4 tipos diferentes de BPV en 6 de las 18 muestras (BPV-3 en 2 muestras, BPV-6 en 2 muestras, BPV-7 y BPV-9 en 1 muestra respectivamente). En 2 muestras de las 18 no fue posible identificar un tipo de patrón de restricción claro, lo cual sugiere que puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión. En las 10 muestras restantes se logró visualizar claramente 4 tipos de patrones de restricción, que no corresponden a los predichos para cada uno de 15 tipos de BPV previamente descritos. En patrón de restricción nuevo que se denominó 1, fue el más frecuente en las muestras positivas (7 de 18), y para los patrones nuevos 2, 3, y 4, se encontró una muestra para cada uno de ellos.

En las muestras que no se logró identificar el tipo o los tipos de virus causales de las lesiones, ya sea por que pueden corresponder a una coinfección (mezcla de virus), nuevos tipos de BPV (Nuevos patrones de restricción) en futuros estudios se procederá a clonar los productos de PCR para ser sometidos a secuenciación. Y si las secuencias obtenidas no corresponden a las previamente reportadas, se procederá a amplificar y clonar los genomas completos para secuenciarlos, lo que podría informarnos de si se trata de BPV no descritos previamente.

Para el caso de las muestras en las que se logró identificar el tipo de BPV que causó la lesión, éstas se colectaron de regiones corporales diversas

Distribución de la localización de las lesiones positivas a BPV.

La mayor cantidad de lesiones positivas a los BPV se encontraron en el cuello (n = 5), seguido de la ubre(n=4), pabellón auricular(n=2), morro(n=2). Las otras lesiones en las que se identificó material genético de los BPV se ubicaron en el muslo, articulación del encuentro, grupa, finalmente en la caña y cruz(n=1) respectivamente

CONCLUSIONES

Luego de haber desarrollado la presente investigación en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en la que se efectuó la recolección de 40 muestras *post-mortem* de lesiones sugestivas de papilomatosis bovina, de 30 bovinos faenados en los camales de Azogues, Cuenca y Paute, además se recolectaron 13 muestras *ante-mortem* de 11 animales de la provincia de El Oro.

A las muestras antes indicadas se les implementaron técnicas de biología molecular (ensayos de PCR y RFLP), a través de las que se logró obtener ADN, detectar y genotipificar los diferentes tipos de virus de papiloma bovino.

Las muestras detectadas y genotipificadas corresponden a las zonas del cuerpo que se detallan a continuación; cuello, ubre, morro, pabellón auricular, Muslo; grupa, articulación del encuentro, Caña y Cruz. En estas muestras se encontró con mayor frecuencia a los BPV tipo 3 y 6 seguido de los tipos 7 y 9. En dos muestras no fue posible identificar un tipo de patrón de restricción claro, lo cual puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión. Mientras que en las 10 muestras restantes se logró visualizar claramente 4 tipos de patrones de restricción, uno de los cuales se encontró en 7 de las 18 muestras que no corresponden a los predichos para cada uno de 15 tipos de BPV previamente descritos.

También se logró establecer que los bovinos con mayor tendencia a padecer papilomatosis bovina son los de raza Holstein mestiza y Holstein roja; así como también se determinó que la mayor parte de las lesiones corresponden a hembras, ya que se ubican a nivel de las ubres y tetillas. Además se observó que los bovinos con edad superior a los 24 meses, en comparación con los bovinos que tienen edades superiores a los 12 meses. Por lo que se puede decir que las lesiones provocadas por BPV son más evidentes en bovinos adultos

REFERENCIAS

- Aguilar, J. M., & C. Alvarado. (2006). Hematuria vesical bovina (UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO). Zaruma, Povincia de El Oro: Digrafica S.A.
- Al-Ani F.K., O.F. Al-Rawashdeh, N.K. Hailat & A. Shotar. (2000). Cutaneous papillomatosis in horses: Response of horses to autogeneous wart vaccine. Veterinarski Arhiv. 70(69), 331-337.
- Anjos B.L., S.A. Silva, A. DiefenbachI, M.F. Brito, G.S. Seppa & C.S. Brum. (2010). Equine sarcoid associated with bovine papillomavirus BR-Uel-4. Ciencia Rural. 40(6), 1456-1459.

- Antonsson, A. & B.G. Hansson. (2002). Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virology*, 76(24), 12537-12542.
- Araldi R.P., T.C. Melo, N. Diniz, J. Mazucchelli-de-Souza, R.F. Carvalho, W. Beçak & R.C. Stocco.(2013). Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. *Biomed Res Int*. 2013: 630.683.
- Araldi, R.P., R.F. Carvalho, J. Mazzuchelli-de-Souza, D.S. Morena, W. Becak & R.C. Stocco. (2014). Bovine papillomavirus in beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Genet Mol Res*. 13(3), 5644-5653. DOI :10.4238/2014.July.25.20.
- Araldi, R.P., T.C. Melo, A.C. Neves, D.D. Spadacci-Morena, R.F. Magnelli, D.G. Modolo, P.L. de Sá-Júnior, J. Mazucchelli-de-Souza, R.F. Carvalho, W. Beçak & R.C. Stocco. (2015). Hyperproliferative action of bovine papillomavirus: genetic and histopathological aspects. *Genet Mol Res*. 14 (4), 12942-12954. DOI: 10.4238/2015.October.21.15.
- Babaahmady, E., & K. Taherpour. (2011). Verrugas en los pezones de vacas lecheras. *REDVET*. 12(6), 1-6.
- Baker C.C., W.C. Phelps, V. Lindgren, M.J. Braun, M.A. Gonda & P.M. Howley. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Virology*. 61(4), 962-971.
- Batista M.V., M.A. Silva, N.E. Pontes, M.C. Reis, A. Corteggio, R.S. Castro, G. Borzacchiello, V.Q. Balbino & A.C. Freitas. (2013). Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Vet J*. 197(2), 368-373. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.01.019
- Bergvall M., T. Melendy & J. Archambault. (2013). The E1 proteins. *Virology*. 445(1-2):35-56. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.020
- Bernard H.U., R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen & E.M. de Villiers. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401(1), 70-79. DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.002.
- Betiol J.C., S. Kignel, W. Tristão, A.C. Arruda, S.K. Santos, R. Barbieri & J. de Sousa Ribeiro Bettini. (2012). HPV 18 prevalence in the oral mucosa diagnosed with verrucous leukoplakia: cytological and molecular analysis. *J Clin Pathol*. 65, 769-770. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200673.
- Bocaneti F., G. Altamura, A. Corteggio, E. Velescu, F. Roperto, G. Borzacchiello. (2014). Bovine papillomavirus: New insights into an old disease. *Transbound Emerg Dis*. 63(1):14-23. DOI: 10.1111/tbed.12222.
- Borzacchiello G. & F. Roperto. (2008). Bovine papillomaviruses, papilomas and cancer in cattle. *Vet Res*. 39(5):45. DOI: 10.1051/vetres:2008022.
- Borzacchiello G., V. Ambrosio, S. Roperto, F. Poggiali, E. Tsirimonakis, A. Venuti, M.S. Campo & F. Roperto. (2003). Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. *J Comp Pathol*.128(2-3), 203-206.
- Brandt S., A. Schoster, R. Tober, C. Kainzbauer, J.P. Burgstaller, R. Haralambus, R. Steinborn, C. Hinterhofer & C. Stanek. (2011). Consistent detection of bovine papillomavirus in lesions, intact skin and peripheral blood mononuclear cells of horses affected by hoof canker. *Equine Vet J*. 43(2), 202-209. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00147.x.

- Burnett S., N. Jareborg & D. DiMaio. (1992). Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proc.Natl Acad Sci USA*. 89(12), 5665-5669.
- Campo M. (2003). Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol*. 1(13-14), 1-12. DOI: 10.1046/j.1476-5829.2003.00001.x.
- Campo M.S., M.H. Moar, H.M., Laird & W.F. Jarrett. (1981). Molecular heterogeneity and lesion site specificity of cutaneous bovine papillomaviruses. *Virology*. 113(1), 323-335.
- Campo M.S., W.F. Jarrett, R.O. Barron, B.W. Neil & K.T. Smith. (1992.). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res*. 52(24), 6898-6904.
- Cantú D. (2014). Estudio epidemiológico del Virus de papiloma bovino, caracterización y alternativas de producción de una vacuna multivalente en Tamaulipas. *Cofupro*. 1, 1-39.
- Carvalho C.C., M.V. Batista, M.A. Silva, V.Q. Balbino & A.C. Freitas. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transbound Emerg Dis*. 59(5), 441-447. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01296.x.
- Carvalho R.F., S.T. Sakata, D.N. Giovanni, E. Mori, P.E. Brandão, L.J. Richtzenhain, C.R. Pozzi, J.R. Arcaro, M.S. Miranda, J. Mazzuchelli-de-Souza, T.C. Melo, G. Comenale, S.L. Assaf, W. Beçak & R.C. Stocco. (2013). Bovine papilloma virus in Brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *Biomed Res Int*. 2013:270898. DOI: 10.1155/2013/270898.
- Charry-Dávalos J.V. & M.F. Hinojosa-López. (2011). Estudio de papilomatosis bovina en cinco propiedades de ganadería de leche, en cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha. Quito. UDLA, Sede Ecuador, Facultad de Salud. 194 p.