



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Caracterización molecular del virus del papiloma bovino, en las áreas de influencia de la
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**

Carvajal Reina, Diego Joel

Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Reyna Bello, Armando. PhD.

01 de marzo de 2024

Reporte de verificación de contenido



Plagiarism and AI Content Detection Report

Carvajal_Diego_Trabajo de Integració...

Scan details

Scan time:
March 1th, 2024 at 2:17 UTC

Total Pages:
60

Total Words:
14877

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.4%	56
Minor Changes	0%	1
Paraphrased	1.3%	189
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	0%	0
Human text	100%	14877

[Learn more](#)

Firma:

Reyna Bello, Armando. PhD.

Director



Departamento de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Caracterización molecular del virus del papiloma bovino, en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**” fue realizado por el señor **Carvajal Reina, Diego Joel**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 01 de marzo de 2024

Firma:

Reyna Bello, Armando. PhD.

C.C: 1758891830

Departamento de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Carvajal Reina, Diego Joel**, con cédula de ciudadanía n° 1719427153, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular del virus del papiloma bovino, en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 01 de marzo de 2024

Firma:



Carvajal Reina, Diego Joel

C.C: 1719427153

Departamento de Ciencias de la Vida

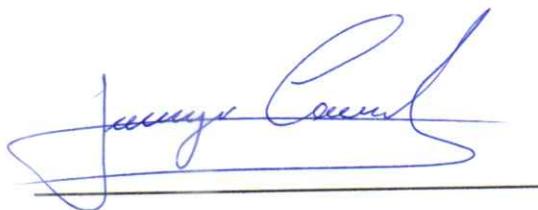
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Carvajal Reina, Diego Joel**, con cédula de ciudadanía n° 1719427153, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización molecular del virus del papiloma bovino, en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 01 de marzo de 2024

Firma:



Carvajal Reina, Diego Joel

C.C: 1719427153

Contenido

Dedicatoria	I
Agradecimiento	II
Resumen	3
Abstract	4
Introducción y estado del arte	5
Introducción	5
Estado del arte	7
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Marco teórico	10
Virus del Papiloma Bovino (BPV)	10
Estructura viral	10
Taxonomía	12
Distribución geográfica y situación en Ecuador	14
Patologías relacionadas	16
Papilomatosis bovina	16
Patologías graves	18
Transmisión	19
Métodos de diagnóstico	20

Métodos de análisis	21
Extracción de ADN	22
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
Secuenciación	26
Metodología	28
Métodos y materiales	28
Método.....	28
Materiales, insumos, equipos, reactivos y muestras	28
Ubicación geográfica.....	30
Procedimiento	31
Recolección de las muestras	31
Análisis molecular.....	32
Análisis de datos	38
Resultados	40
Muestreo.....	40
Extracción de ADN	41
Estandarización de la PCR y amplificación	42
Secuenciación e identificación.....	43
Resultados estadísticos	49
Análisis filogenético.....	51
Discusiones.....	53

Conclusiones y recomendaciones.....	62
Conclusiones.....	62
Recomendaciones	63
Referencias.....	65

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Distribución taxonómica de los tipos de virus de papiloma bovino</i>	13
Tabla 2. <i>Categorías taxonómicas basadas en la secuencia del gen L1</i>	14
Tabla 3. <i>Distribución geográfica global del virus del papiloma bovino</i>	15
Tabla 4. <i>Materiales, insumos y equipos</i>	28
Tabla 5. <i>Reactivos y muestras</i>	30
Tabla 6. <i>Reactivos empleados para la PCR del papilomavirus bovino</i>	37
Tabla 7. <i>Condiciones de reacción para la PCR de papilomavirus bovino con gradiente de temperatura</i>	38
Tabla 8. <i>Tipos y variantes del papilomavirus bovino identificados en este estudio</i>	45
Tabla 9. <i>Coinfecciones de diferentes tipos de papilomavirus bovino</i>	49

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Estructura genómica del BPV y expresión proteica diferencial</i>	11
Figura 2. <i>Bovino joven con papilomatosis</i>	17
Figura 3. <i>Esquema metódico para el análisis de una muestra en biología molecular</i>	21
Figura 4. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	25
Figura 5. <i>Esquema de la secuenciación por el método de terminación de cadena</i>	27
Figura 6. <i>Mapa de los lugares de muestreo y experimentación</i>	31
Figura 7. <i>Protocolo de muestreo</i>	35
Figura 8. <i>Recuento del número de muestras recolectadas por finca</i>	40
Figura 9. <i>Diagramas de pastel de la zona del cuerpo objeto de muestreo, morfología observada y registro fotográfico.</i>	41
Figura 10. <i>PCR de BPV con gradiente de temperatura</i>	42
Figura 11. <i>Electroferogramas de algunos amplicones obtenidos</i>	44
Figura 12. <i>Electroferogramas de la variante y subtipo de papilomavirus bovino encontrados</i>	46
Figura 13. <i>Diversidad de patotipos del papilomavirus bovino identificados</i>	48
Figura 14. <i>Gráfico de barras del género del papilomavirus bovino y el lugar donde ocurrió la infección.</i>	50
Figura 15. <i>Análisis filogenético realizado con los tipos de BPVs encontrados en este estudio</i>	52

Dedicatoria

A mis padres, Diego Xavier Carvajal Barreiro y Adriana Magdalena Reyna Tello. Este estudio ha sido fruto del apoyo incondicional que siempre me supieron brindar; más que un trabajo, representan años de dedicación, donde supieron brindarme los conocimientos que sin duda han permitido que hoy me encuentre en esta etapa académica. Este y todos mis logros siempre serán dedicados a ellos.

A mi yo de pequeño, que siempre soñó con ser investigador y dedicarle su tiempo al laboratorio, este es uno de muchos trabajos que alimentarán día a día su curiosidad y pasión por el mundo de la ciencia.

Agradecimiento

A mis padres, por el tiempo, cariño, paciencia y amor que supieron darme a lo largo de mi carrera universitaria.

A mi hermana, Karelys Carvajal, porque a pesar de los obstáculos, siempre confió en mí y me hizo saber que soy capaz de esto y mucho más. Por siempre estar a mi lado y darme consejos y ánimos para seguir adelante.

A mis hermanos menores, Kamila y Adrián, por ser mi motor a seguir aprendiendo para poder brindarles mi apoyo cuando lo necesiten.

A mis abuelos, por todo el apoyo incondicional, paciencia y cariño que me brindaron.

A mi tutor de tesis, Dr. Armando Reyna, por poner su confianza en mí al permitirme trabajar bajo su tutela y por apoyarme a lo largo de este trabajo. Por los conocimientos que me ha brindado y por motivarme a ser un profesional en la ciencia. Sin duda, un ejemplo a seguir.

Al Dr. Jacobus de Waard, ya que su respaldo y contribución han sido fundamentales para llevar a cabo esta investigación y por su contribución en mi desarrollo académico y profesional.

A los técnicos de laboratorio: Ing. Fausto Bedoya, su experiencia, habilidad y paciencia han sido fundamentales para llevar a cabo los experimentos con éxito; Ing. Yanua Ledesma e Ing. Salomé Guerrero, por sus conocimientos y su tiempo durante la etapa experimental. Ing. Jimmy Jumbo, por su generosidad al compartir sus recursos y abrirme las puertas a sus fincas y permitirme realizar el muestreo.

A mis amigos, Melanie Salazar y Christopher Cuenca, por hacer de la vida universitaria un capítulo inolvidable en mi vida.

Por último, a Nohelia, su apoyo incondicional y aliento sin duda me han permitido llegar hasta este punto y lograr cumplir una de mis metas más anheladas.

Resumen

Los virus del papiloma bovino son un grupo creciente de papilomavirus que infecta al ganado bovino, ocasionando la papilomatosis bovina. Este virus está relacionado con enfermedades de relevancia veterinaria y es considerado un modelo para el estudio del virus del papiloma humano, pues poseen características similares. Por lo anterior, se realizó la caracterización e identificación molecular del virus del papiloma bovino con el objetivo de determinar su diversidad genotípica en la zona. Para ello, se extrajeron verrugas de bovinos con papilomatosis encontrados en distintas fincas de Santo Domingo, Ecuador; luego, las verrugas obtenidas se sometieron a un proceso de extracción directa de ADN; posteriormente, se estandarizó una PCR para la amplificación parcial del gen L1 del BPV mediante un gradiente de temperatura en el proceso de anillamiento; los resultados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y los productos de PCR fueron secuenciados mediante Sanger; finalmente, se elaboró un análisis filogenético con las secuencias obtenidas. Como resultados, se obtuvo una temperatura óptima de anillamiento de 48°C y luego de la secuenciación, se identificaron los tipos BPV1, BPV2, BPV4, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV13, BPV14 y BPV43. Además, se identificó el nuevo tipo putativo BPV-CR2 proveniente de Costa Rica y el nuevo tipo viral BPV/BR-UJEL08 reportado en Brasil. Adicionalmente, se reportó una nueva especie putativa del BPV, nombrada BPVEC2024_22.1, perteneciente al género *Xipapillomavirus*. Gracias a este estudio se logró determinar la diversidad genotípica del BPV en la zona, ayudando a identificar tipos virales asociados a múltiples enfermedades.

Palabras clave: BPV, papilomavirus, caracterización, PCR, secuenciación.

Abstract

Bovine papillomaviruses (BPVs) are a crescent group of papillomaviruses that infect cattle, causing bovine papillomatosis. These viruses are related to diseases with veterinary relevance and it are also considered as a model for the study of human papillomavirus, since its similar characteristics. Therefore, the aim of this study was to determinate the genotypic diversity of bovine papillomavirus in the area, by carrying out a characterization and molecular identification of this virus. To this purpose, a specific sampling protocol were followed to obtain warts from animals with papillomatosis located in farms near UFA-ESPE, then, a direct DNA extraction process was carried out to the warts obtained previously; subsequently, the partial L1 gene of BPV were amplified by a PCR process previously standardized by using a gradient of temperature in the annealing step. The DNA were visualized by agarose gel electrophoresis, PCR products were sequenced with Sanger and sequences were used for phylogenetic analysis. As results, an optimal annealing temperature of 48°C were obtained. After sequencing process, viral types BPV1, BPV2, BPV4, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV13, BPV14 and BPV43 were identified. In addition, here we identified the putative novel viral type BPV-CR2 from Costa Rica and the novel viral type BPV/BR-UJEL08 reported in Brazil. Furthermore, a putative novel specie of BPV was reported, named BPVEC2024_22.1, that is presumed to belong to the genus Xipapillomavirus. Thanks to this study, it was possible to determine the genotypic diversity of BPV in the area, helping to identify viral types associated with multiple diseases.

Key words: BPV, papillomavirus, characterization, PCR, sequencing.

Introducción y estado del arte

Introducción

La papilomatosis es una enfermedad causada por el papilomavirus, un virus de la familia Papillomaviridae que afecta a la mayoría de los animales vertebrados, incluyendo al hombre, y es caracterizada por la generación de “verrugas” o “papilomas” en varias partes del cuerpo. El virus del papiloma bovino (BPV del inglés Bovine Papilloma Virus) es uno de los más estudiados en este grupo porque compromete en gran medida la salud del ganado vacuno al presentar estas verrugas en boca, glándulas mamarias, párpados, entre otras partes del cuerpo; además, se relaciona con algunas enfermedades de relevancia veterinaria, como mastitis, hematuria enzoótica y cáncer de vejiga o esófago, que están arraigadas a su vez a problemas de higiene, infecciones bacterianas, dolor, dificultades durante el ordeño mecánico y en ocasiones, la muerte (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019).

El BPV es un grupo creciente de papilomavirus que infectan el epitelio escamoso y la mucosa del hospedero, ocasionando la papilomatosis bovina (Daudt et al., 2018; Ugochukwu et al., 2019). Su estructura genómica es simple, cuya región codificante expresa diferentes proteínas con funciones estructurales, reguladoras, oncogénicas e inmunogénicas (Daudt et al., 2018). La papilomatosis bovina puede ocurrir por la infección de uno o varios tipos de BPV, de los cuales se habían identificado sólo 6 a inicios de los 80s; no obstante, con el paso del tiempo y gracias a técnicas de biología molecular, se ha determinado una taxonomía más diversa, similar a la del papilomavirus humano, existiendo actualmente 44 tipos virales descritos (Lunardi et al., 2013, p. 22; National Institute of Allergy & Infectious Diseases, 2023).

El BPV es cosmopolita y se distribuye por todo el mundo, siendo prevalente en países de Asia, Europa y África; en América se ha reportado en países como México y Brasil, existiendo en este último un 60% estimado del ganado bovino, valor que podría ser aún mayor por infecciones asintomáticas (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019). Esto sumado a la ausencia de más estudios epidemiológicos sobre su distribución y el desconocimiento de la

prevalencia real de los tipos de BPV en cada país, ocasiona dificultades para la búsqueda de soluciones tempranas para estas infecciones, como el desarrollo de vacunas (Araldi et al., 2017, p. 6).

En Ecuador, la diversidad molecular del BPV es un tema aún sin explorar, con limitada información disponible sobre la prevalencia y las características genómicas de los distintos tipos presentes en zonas de alta productividad afectadas por la papilomatosis bovina (Villagómez, 2020).

Las lesiones que se generan por infecciones con BPV generalmente son benignas y desaparecen en algunos casos o pueden progresar a neoplasias malignas. En estos últimos casos, la persistencia de las lesiones puede ocasionar problemas para la alimentación, respiración y otras enfermedades que requieren someter al animal a eutanasia (Araldi et al., 2017, p. 6). Esto supone importantes pérdidas económicas si no se tiene un control y manejo adecuado. A pesar de los esfuerzos por controlar la enfermedad, los tratamientos actuales no parecen ser lo suficientemente eficientes y el mejor método de prevención continúa siendo la inmunización; sin embargo, hasta la actualidad no existe una vacuna comercial para la papilomatosis bovina disponible en el país (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019).

Los estudios sobre la diversidad y prevalencia del BPV son necesarios para el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos, debido a que la inmunidad que se genera es específica a la especie de virus (Araldi et al., 2017). Por ello, el realizar una caracterización molecular de los diferentes tipos de BPV existentes en zonas geográficas específicas del Ecuador, sentaría las bases para la investigación encaminada a la elaboración de posibles vacunas contra esta enfermedad; además, permitiría fortalecer el entendimiento de su diversidad taxonómica y las implicaciones necesarias para su control.

En el presente trabajo se planteó caracterizar molecularmente el virus del papiloma bovino en áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, de modo que sea posible identificar en la zona fincas con bovinos con papilomatosis,

para realizar muestreos y registro fotográfico; con ello, realizar la extracción de ADN de las muestras para su análisis mediante PCR-secuenciación y así, finalmente, con los datos obtenidos, elaborar árboles filogenéticos para la identificación y caracterización molecular del virus.

Estado del arte

El estudio del BPV es de suma importancia para entender mejor el VPH, pues los diferentes tipos comparten características morfológicas y patogénicas entre sí; además, investigaciones realizadas en el BPV han contribuido al entendimiento de la biología y la oncogénesis de los papilomavirus (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019). Del mismo modo, el BPV ha demostrado ser un virus con alta diversidad taxonómica, similar a lo ya observado con el VPH del cual se conocen aproximadamente 225 tipos (Sauthier et al., 2021). En 2008 se mencionaron hasta 10 tipos de BPV (Borzacchiello & Roperto, 2008), para 2014 se reportaron 13 tipos (Munday, 2014), 15 en 2017 (Araldi et al., 2017) y 29 en 2021 con 15 nuevos tipos descritos (Sauthier et al., 2021), sumando hasta la fecha 44 tipos de BPV. Esto junto con la problemática actual relacionada con las coinfecciones por VPH, suponen que el estudio de aquellas que ocurren con el BPV y las alternativas para su prevención pueden aplicarse como modelo en la papilomatosis humana.

El diagnóstico del BPV puede llevarse a cabo por diversas técnicas moleculares e inmunológicas, pero la más utilizada es la PCR por su sensibilidad (Araldi et al., 2017). Cabe recalcar que, hasta la fecha no existen primers “gold standard” para la técnica y los que se emplean habitualmente son de dos tipos: tipo-específicos y degenerados; siendo el par FAP59/64, que amplifica parte del gen L1, por mucho los más utilizados y descritos en la literatura por permitir la identificación de nuevos tipos (Araldi et al., 2017). Los métodos, como CISH, inmunodetección y técnicas histopatológicas, se presentan como alternativas para investigación, pues a través de PCR no se puede determinar características como la localización del virus (Araldi et al., 2017). Otras técnicas incluyen examinación clínica, biopsias

quirúrgicas, southern blot, dot blot, reverse blot y LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) (Ugochukwu et al., 2019).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar molecularmente el virus del papiloma bovino, en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Objetivos específicos

- Identificar en la zona fincas con bovinos con papilomatosis, para realizar muestreos y registro fotográfico.
- Realizar extracciones de ADN de las muestras, amplificaciones y secuenciación de genes específicos.
- Elaborar árboles filogenéticos para la identificación y caracterización molecular de los virus.

Marco teórico

Virus del Papiloma Bovino (BPV)

Los papilomavirus (PVs) constituyen a un grupo diverso de virus pequeños, circulares, sin envoltura, de cadena doble de ADN, carcinógenos, que infectan el epitelio escamoso y la mucosa de todos los vertebrados, causando, en su mayoría, lesiones benignas proliferativas denominadas “verrugas” o “papilomas”; pertenecen a la familia Papillomaviridae y su clasificación se basa en: género, especie, tipos, subtipos y variantes (Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018; Lunardi et al., 2013; Ugochukwu et al., 2019). Los papilomavirus son microorganismos sitio-específicos y especie-específicos, por lo que no infectan a otro hospedero diferente al natural; el único caso conocido de coinfección es por el virus del papiloma bovino (BPV) (Ugochukwu et al., 2019). Por su parte, el BPV representa a un grupo creciente de PVs que infectan al ganado bovino, tanto *Bos taurus* como *Bos indicus*, preferiblemente, ocasionando la papilomatosis bovina (Daudt et al., 2018).

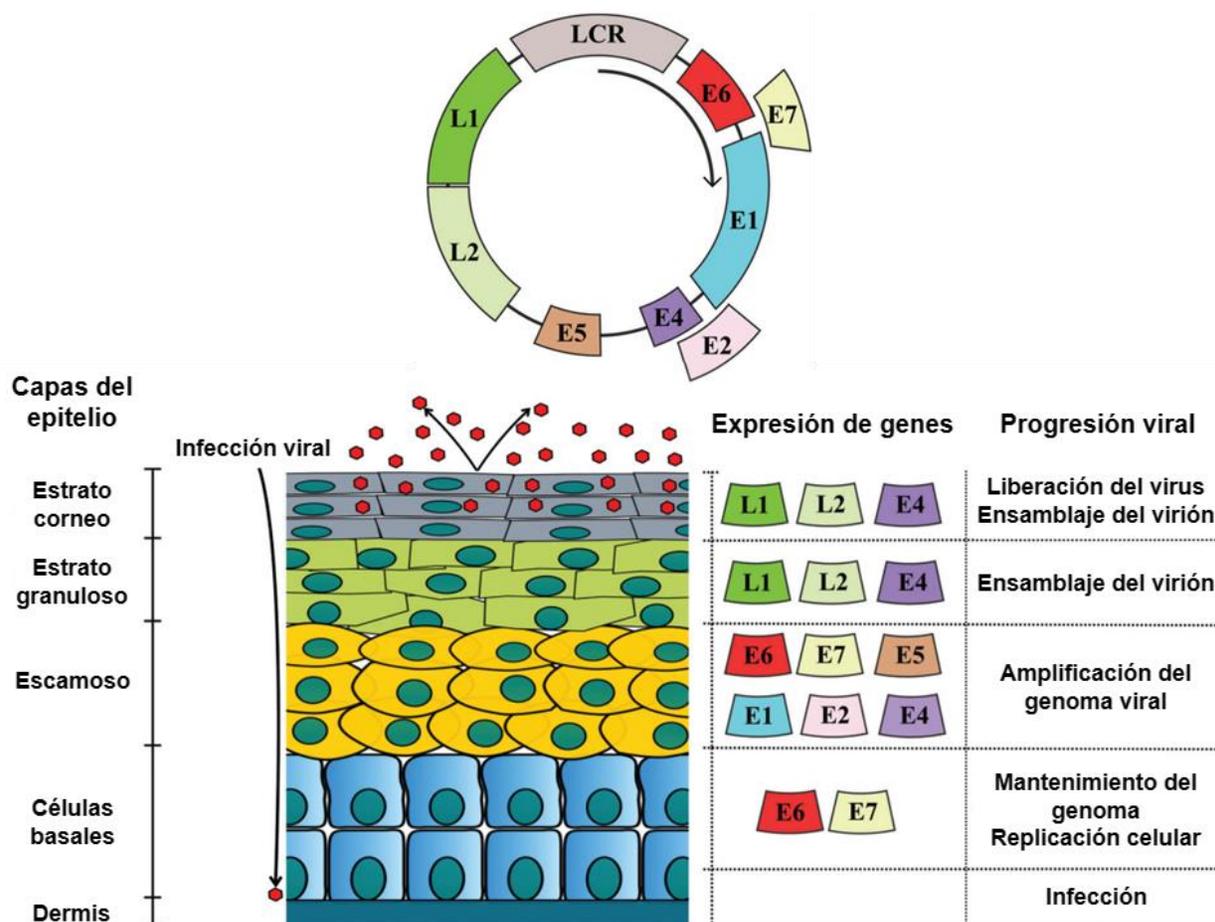
Estructura viral

Todos los PVs poseen ADN genómico con un tamaño de entre 6953 pb y 8607 pb, donde todos sus ORFs (Open Reading Frames; Marcos de lectura abierta) se encuentran en la misma cadena del ADN, por lo que sólo una de estas sirve como molde para la transcripción (Araldi et al., 2017; Lunardi et al., 2013). La cadena codificante se divide en 2 regiones (**Figura 1**) clasificadas según el estado de diferenciación de la célula hospedera durante su expresión; de modo que, posee una región con 6 genes de expresión temprana (E, del inglés Early) que codifica las proteínas E1, E2 y E4, y las oncoproteínas E5, E6 y E7; y una con 2 genes de expresión tardía (L, del inglés Late) que codifican proteínas de la cápside L1 y L2; siendo la primera región expresada en células basales en su estado temprano o intermedio de maduración y la última en queratinocitos diferenciados (Araldi et al., 2017; Lunardi et al., 2013). También poseen una región no codificante denominada Región Larga de Control o Región Reguladora Aguas arriba (LCR, del inglés Long Control Region; URR, Upstream Regulatory

Region) que no codifica ninguna proteína, pero posee el origen de replicación “ori” y elementos que controlan la transcripción (Araldi et al., 2017; Lunardi et al., 2013).

Figura 1.

Estructura genómica del BPV y expresión proteica diferencial



Nota: Se observa la expresión de las proteínas de replicación (E1 - E7) así como las de la cápside (L1 y L2). Es posible destacar que las proteínas de la región temprana se expresan desde las células basales y participan en la replicación y liberación del virus; mientras que, las proteínas de la cápside son estructurales, expresadas en el epitelio diferenciado y participan en el ensamblaje del virus. Modificado de Araldi et al. (2017)

La cubierta del virus o “cápside” se compone de las proteínas L1 (mayor) y L2 (menor) en una forma icosaédrica sin envoltura lipoproteica; esta cápside organiza la proteína L1 en 72

capsómeros (pentámeros) con un diámetro aproximado de 600 Å (Daudt et al., 2018). El carbono C-terminal de la proteína L1 está expuesta y juega un papel importante en la infección e inmunogenicidad; mientras que, L2 contribuye a la encapsulación y liberación del virus (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019). Por otro lado, las proteínas E1 y E2 están involucradas en la replicación, transcripción y en la estabilidad del genoma en su forma episomal; E5, E6 y E7 se relacionan con la transformación celular y E4 contribuye en la producción y liberación de viriones, esta última es la proteína de mayor expresión en los PVs y, aunque su gen está en la región temprana, se codifica luego del proceso de diferenciación de la célula hospedera (Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018; Lunardi et al., 2013)

Taxonomía

Los BPVs se distribuyen en 5 géneros: *Xipapillomavirus*, *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Dyoxipapillomavirus* y *Dyokappapapillomavirus*. Actualmente, existen 44 patotipos de BPVs descritos (BPV1-BPV44), organizados según se observa en la **Tabla 1**. Dentro del mismo género se pueden encontrar distintas especies y para cada especie pueden existir distintos tipos virales (viral types) o cepas (Lunardi et al., 2013). De estos, 6 tipos se han caracterizado con lesiones macro y microscópicas distintivas (BPV1-6), tanto en morfología como en lugar; además, 17 patotipos (tipos de virus patogénicos) aún no tienen un género identificado (National Institute of Allergy & Infectious Diseases, 2023; Ugochukwu et al., 2019). Aunque no existe un estudio robusto sobre la distribución total del BPV, los tipos BPV1 y 2 parecen ser los más comunes, ambos capaces de producir neoplasias benignas y malignas, y consideradas de alto riesgo por relacionarse con el cáncer de vejiga urinaria y otras afecciones (Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018).

Tabla 1.*Distribución taxonómica de los tipos de virus de papiloma bovino*

Género	Especie	Tipo
	<i>Xipapillomavirus 1</i>	BPV3, BPV4, BPV6, BPV9, BPV10, BPV11, BPV15
<i>Xipapillomavirus</i>	<i>Xipapillomavirus 2</i>	BPV12
	^a	BPV17, BPV20, BPV23, BPV24, BPV26, BPV28, BPV29
<i>Deltapapillomavirus</i>	<i>Deltapapillomavirus 4</i>	BPV1, BPV2, BPV13, BPV14
	<i>Epsilonpapillomavirus 1</i>	BPV5, BPV8
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	BPV25
<i>Dyoxipapillomavirus</i>	<i>Dyoxipapillomavirus 1</i>	BPV7
<i>Dyokappapapillomavirus</i>	<i>Dyokappapapillomavirus</i>	BPV16, BPV18, BPV22
^b	^b	BPV19, BPV21, BPV27, BPV30 – 44.

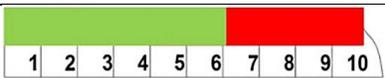
Nota: Datos obtenidos de PaVe (Papillomavirus Episteme) (National Institute of Allergy & Infectious Diseases, 2023). “^a” BPVs del género *Xipapillomavirus* sin especie identificada, “^b” BPVs sin especie ni género identificados.

El análisis taxonómico de estos tipos de BPV y los nuevos tipos que han surgido a lo largo del tiempo se logra a través de la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen L1 altamente conservado en los PVs, que, al compararse entre sí, exhibe un porcentaje de diferencia que determina la categoría (**Tabla 2.**) (Daudt et al., 2018). De este modo, la denominación tradicional de “tipo viral” representa a un papilomavirus con una diferencia de al

menos el 10% en su secuencia (L1) en comparación con la de cualquier otro tipo de PV previamente identificada (Lunardi et al., 2013).

Tabla 2.

Categorías taxonómicas basadas en la secuencia del gen L1

Categoría	Diferencia	Identidad	Esquema
<i>Género</i>	>40%	<60%	
<i>Especie</i>	11% - 29%	71% - 89%	
<i>Tipo</i>	>10%	< 90%	
<i>Subtipo</i>	2% - 10%	90% - 98%	
<i>Variante</i>	<2%	>98%	

Nota: Los colores indican: Verde, identidad; rojo, diferencia; amarillo, porcentaje de variación (Daudt et al., 2018; Munday, 2014)

Distribución geográfica y situación en Ecuador

El BPV es cosmopolita y se distribuye por todo el mundo, con alta prevalencia en países asiáticos como Iraq e India, y europeos como Turquía, Italia, Alemania y Nigeria; en América se ha reportado en países como Brasil y México; de igual forma, se han identificado casos de coinfecciones (infecciones de más de un tipo de PVs) en Japón, Brasil, India, Alemania y Nueva Zelanda; así como primeros reportes en países del nuevo mundo como Costa Rica (Alfaro-Mora et al., 2023; Ugochukwu et al., 2019). Daudt et al. (2018) proporciona un panorama general sobre la distribución global de los PVs; en la **Tabla 3** se presentan únicamente los relacionados al papilomavirus bovino (p. 3). Por otro lado, uno de los pocos estudios sobre el BPV en Ecuador reportó los tipos BPV 6, 7 y 9 en la provincia de Azuay, Cañar y El Oro (Lennin & Andrade, 2017).

Tabla 3.*Distribución geográfica global del virus del papiloma bovino*

Tipo de BPV	País reportado
BPV 1	Brasil, Japón, Reino Unido, Italia, India
BPV 2	Alemania, Brasil, Nueva Zelanda, Japón, India, Italia, Turquía, Corea del Sur
BPV 3	Alemania, Japón, Brasil, China
BPV 4	Reino Unido, Brasil
BPV 5	Japón, Brasil, India
BPV 6	Reino Unido, Japón, Brasil
BPV 7	Japón, Brasil, Italia
BPV 8	Japón, Brasil
BPV 9	Japón, Brasil
BPV 10	Japón, Brasil
BPV 11	Japón, Brasil
BPV 12	Suecia, Japón, Brasil
BPV 13	Brasil, China, Italia
BPV 14	Estados Unidos, Nueva Zelanda, Brasil
BPV15	China
BPV16	Brasil
BPV17	Brasil
BPV18	Brasil
BPV19	Brasil
BPV20	Brasil
BPV21	Brasil
BPV22	Estados Unidos

Tipo de BPV	País reportado
BPV23 - 26	Brasil
BPV27	China
BPV28 - 29	Japón
BPV30	Italia
BPV31 - 44	Brasil

Nota: Datos obtenidos de Daudt et al., (2018) y actualizados de acuerdo a la información del NCBI encontrada en el National Institute of Allergy & Infectious Diseases, (2023).

Patologías relacionadas

Papilomatosis bovina

El BPV está involucrado en una gran variedad de enfermedades de relevancia veterinaria que afectan a rumiantes domésticos y salvajes, las cuales ocasionan morbilidad considerable en el individuo afectado, de ahí que sea considerado el grupo de papilomavirus más estudiado (Daudt et al., 2018; Ugochukwu et al., 2019). La afección general es la papilomatosis bovina, una enfermedad infectocontagiosa neoplásica caracterizada por la presencia de las ya mencionadas verrugas que pueden desaparecer espontáneamente o evolucionar a neoplasmas malignos por la presencia de agentes medioambientales (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019). Esta es endémica en crías de ganado cárnico y lechero, con predilección en este último, que puede ocurrir en cualquier edad, pero mayoritariamente afecta a bovinos jóvenes (**Figura 2**) (Araldi et al., 2017).

Figura 2.

Bovino joven con papilomatosis



Nota: Se destaca una papilomatosis severa por todo el rostro extendiéndose hasta el cuello.

Algunas verrugas llegan a presentar hemorragia. Fuente propia.

La papilomatosis bovina es causada por la infección de PVs en células cutáneas y/o de la mucosa epitelial, que causan lesiones hiperproliferativas benignas, exofíticas y generalmente autolimitadas (Radostits et al., 2006; Ugochukwu et al., 2019). El BPV no puede atravesar por sí solo la piel, por lo que la papilomatosis normalmente ocurre por contacto de heridas o desgastes cutáneos a superficies contaminadas con este; aquí infecta los queratinocitos basales, lo que conduce a la replicación del virus en las distintas capas de la epidermis, como se describió en la **Figura 1**.Figura 1.; la neoplasia resultante contiene tejido epitelial y conectivo

que, de acuerdo a su proporción, puede clasificarse histológicamente en papiloma y fibropapiloma; de este modo, un papiloma contiene poco tejido conectivo y resultan de la hiperplasia de células basales sin la producción de antígenos virales; mientras que, un fibropapiloma se compone en su mayoría de tejido fibroso (conectivo) con poco tejido epitelial (Radostits et al., 2006; Ugochukwu et al., 2019).

En cuanto a la morfología, los papilomas se clasifican en: Típicos, masa exofítica en forma de coliflor; pedunculados, conectados por una base estrecha en forma de pedúnculo; filamentosos, altamente queratinizados con base delgada y presentes en las glándulas mamarias; atípicos o planos y con forma de arroz (Araldi et al., 2017). Varios autores asocian el tipo de papilomatosis con el género del virus que lo ocasiona; de modo general, los *Xipapillomavirus* son epiteliotrópicos y causan papilomas escamosos, *Delta* y *Epsilonpapillomavirus* se asocian tanto a papilomas cutáneos como fibropapilomas y *Dyoxipapillomavirus* sólo a papilomas cutáneos (Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018; Ugochukwu et al., 2019).

Por otro lado, 6 patotipos del BPV descritos inicialmente han sido caracterizados micro y macromolecularmente junto con sitios predilectos de infección; en tanto que: el PVB1 causa fibropapilomas en el pezón, piel y pene; PVB-1 y 2 causa fibropapilomas en la piel anterior y ventral del cuerpo, incluyendo frente, cuello y espalda; PVB-2 causa la verruga de coliflor común en piel de la zona anal, genital y abdominal ventral; PVB-3 causa papilomas cutáneos; PVB-4 está asociado al tracto alimentario superior, desarrollando papilomas en el esófago, estómago delantero e intestino delgado; PVB-5 causa fibropapilomas con forma de grano de arroz en la ubre y PVB-6 causa papilomas en ubre y pezones (Ugochukwu et al., 2019).

Patologías graves

La papilomatosis bovina puede ocasionar otros problemas graves relacionados con neoplasias malignas por dos razones principales: El tipo de virus y la presencia de factores inmunosupresivos. El primero resulta por la relación ya establecida entre el BPV-4 y la

neoplasia del tracto gastrointestinal superior que supone obstrucción de las vías respiratorias, conduciendo a disfagia y problemas para respirar; también, los BPV-1, 5, 6, 9 y 10 relacionados con la papilomatosis en tetas y ubres que pueden ocasionar mastitis y obstrucción de las glándulas mamarias; por último los BPV-1 y 2 vinculados con la neoplasia maligna en la vejiga urinaria y el BPV-13 con carcinomas uroteliales, a la larga conducen a cáncer de vejiga y hematuria consecuente con predisposición a anemia y pérdida de peso (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019). Por último, como se ha venido mencionando con anterioridad, la papilomatosis suele ser autolimitada y desaparece por sí sola, pero este no es el caso en animales crónicamente inmunosuprimidos, lo cual se ha relacionado a su vez con la ingesta de químicos inmunosupresivos y cancerígenos presentes en especies de helechos (Ugochukwu et al., 2019).

Transmisión

El principal medio de transmisión se da por contacto directo con mucosa o piel infectada; sin embargo, existe la posibilidad de que fluidos corporales también participen en la diseminación del virus. Por un lado, Araldi et al., (2017) indica que el BPV puede transmitirse de manera directa o indirecta por contacto con superficies contaminadas; además, menciona que existen estudios que muestran transmisión por moscas. Este autor destaca a su vez que la infección requiere de heridas en el tejido, ya que esto expone receptores necesarios para el anclaje de la proteína de cápside L1 del virus (p. 8). Por otro lado, ADN de BPVs ha sido detectado en muestras de orina, semen, leche y sangre de bovinos infectados; aunque no han existido reportes de transmisión a humanos, estudios muestran que el ADN del BPV podría sobrevivir al proceso de pasteurización, característica dada por la resistencia térmica de la cápside, lo que vuelve necesaria la realización de más estudios respecto a una posible coinfección (Araldi et al., 2017; Lunardi et al., 2013).

Métodos de diagnóstico

Aunque el principal método de diagnóstico del BPV es por simple examinación clínica, esta también puede llevarse a cabo por diversas técnicas moleculares e inmunológicas para obtener características complementarias, como el tipo viral causante o la ubicación celular; dentro de estas, la más utilizada por su sensibilidad es la PCR. Araldi et al. (2017) menciona diferentes métodos para la identificación de PVs, entre ellos: Southern blot, inmunohistoquímica, hibridación cromogénica in situ (CISH), microscopía electrónica y PCR. De todos ellos, sostiene que la PCR con primers degenerados o específicos seguida de la secuenciación (PCR-secuenciación) es la más utilizada por su sensibilidad; además, se indica que la PCR en tiempo real demuestra ser poco reproducible a pesar de ayudar a determinar el número de copias virales. No obstante, también menciona que, hasta la fecha, no existen primers “gold standard” para la técnica y los que se emplean habitualmente son de dos tipos: tipo-específicos y degenerados; los primeros son específicos para el tipo de virus y no permiten identificar todos los BPV de forma simultánea; por otro lado, los cebadores degenerados, en específico el par FAP59/64 para el gen L1, han sido por mucho los más utilizados y descritos en la literatura por permitir la identificación de nuevos tipos (p. 7). Los métodos, como CISH, inmunodetección y técnicas histopatológicas, se presentan como alternativas para investigación, pues a través de PCR no se puede determinar características como la localización del virus (Araldi et al., 2017).

Existe también un método basado en el corte con enzimas de restricción de los ampliaciones obtenidos por PCR (PCR-RFLP) el cual ha sido capaz de identificar varios patotipos a través de la comparación visual entre los patrones generados luego de la digestión con estas enzimas, mostrando importantes ventajas frente a la PCR-Secuenciación considerada gold standard, en especial por su facilidad de ejecución en laboratorios con recursos limitados para realizar una secuenciación; además, mostró ser un método confiable en muestras con coinfecciones (Kawauchi et al., 2015). Otras técnicas incluyen examinación

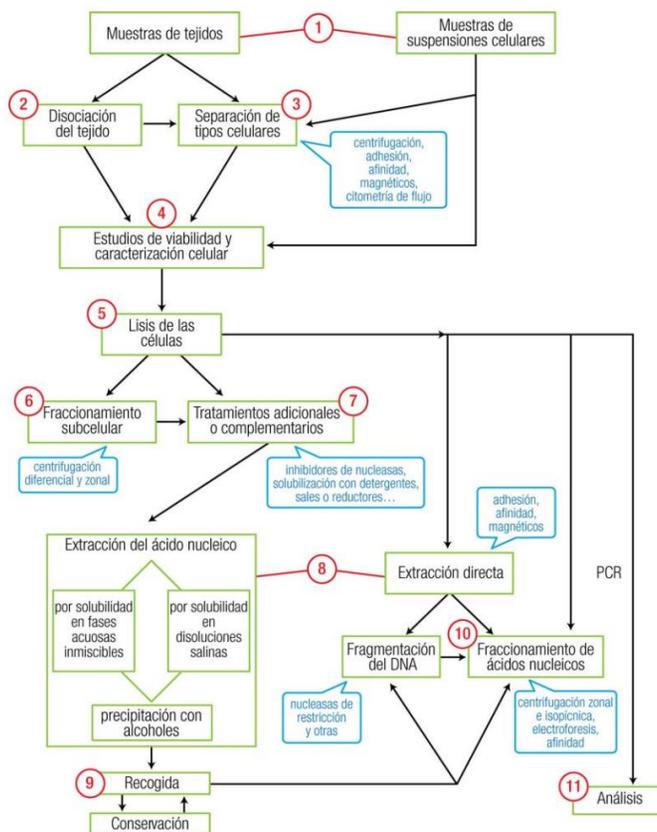
clínica, biopsias quirúrgicas, southern blot, dot blot, reverse blot y LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) (Ugochukwu et al., 2019).

Métodos de análisis

En el análisis de muestras encaminadas al diagnóstico clínico, se utilizan diversas técnicas derivadas de la biología molecular e ingeniería genética. Estas se desarrollan en 3 fases principales: Preanalítica, que va desde la obtención y preparación de la muestra hasta su transporte al laboratorio; analítica, donde se aplican los procesos de extracción de ácidos nucleicos, análisis bioquímicos-genéticos, toma de datos y presentación de resultados; y postanalítica, caracterizada por la validación del informe analítico. Estas etapas pueden conectarse entre sí de acuerdo a la **Figura 3** (Herráez, 2012, pp. 119, 120).

Figura 3.

Esquema metódico para el análisis de una muestra en biología molecular



Nota: Por Herráez, (2012, p. 120).

Extracción de ADN

Existe una diversidad de métodos para la extracción de ácidos nucleicos, con innumerables variaciones basadas en criterios semiempíricos con principios generales que sí tienen un fundamento en función de las propiedades físico-químicas de las muestras. Sin embargo, existen consideraciones clave durante la extracción: el empleo de enzimas para la degradación de moléculas específicas o inhibir un proceso determinado (proteinasas, DNasas, RNasas); el uso de agentes tensioactivos para desnaturalizar proteínas y mejorar la solubilidad (urea, cloruro de guanidinio y tiocianato de guanidinio); la acción de un medio alcalino para desnaturalizar, pero no degradar, ADN e hidrolizar ARN; ajuste de la fuerza iónica de la solución mediante la concentración de sales y, por último, el uso de alcoholes para precipitar los ácidos nucleicos (Herráez, 2012, p. 135).

Por otro lado, la elección del método de extracción de ADN va a depender del tipo de muestra y la finalidad del estudio. Los métodos clásicos basados en solubilidad son recurrentes cuando se desea una alta concentración de ADN con una elevada pureza, pero suelen resultar laboriosos y emplean reactivos tóxicos; en contraparte, si se tiene un tamaño de muestra pequeño y la cantidad y pureza de ADN no es un requisito en el experimento, se pueden emplear métodos más rápidos y simples para cumplir con la extracción. Estos son conocidos como métodos de extracción directa y en su mayoría se basan en la adsorción selectiva del ácido nucleico sobre soportes de membranas porosas o derivados de sílice. Las etapas que caracterizan a los métodos de extracción directa son: Lisis de la muestra, por la acción de un tampón de lisis que contiene proteasas, detergentes o agentes desnaturalizantes; adsorción, donde existe la unión y fijación del ácido nucleico al material adsorbente separándolo de las demás impurezas; lavado, por acción de soluciones tampón que desplazan todo aquello no fijado; y elución, para desestabilizar la unión del ácido al soporte y liberarlo (Herráez, 2012, p. 138).

Por otra parte, los métodos de extracción de ADN de muestras de papilomas por lo general se llevan a cabo mediante kits de extracción comerciales, como High Pure PCR template preparation kit de Roche Diagnostics (Ogawa et al., 2004) o DNeasy Blood and Tissue Kit de Qiagen (Alfaro-Mora et al., 2023; C. C. R. Carvalho et al., 2012; Özmen & Kale, 2023) con condiciones experimentales definidas para una muestra de tipo tejido o a través de una combinación de los métodos fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y sílica/isotiocianato de guanidina (Crespo et al., 2019; Wosiacki et al., 2005). Para este último, cabe mencionar que el papel de las sales de guanidina, como el isocianato de guanidina o el cloruro de guanidina (GuHCl) es el de fungir como un agente caotrópico que a altas concentraciones inactiva y desnaturaliza la estructura de las proteínas, mientras que los ácidos nucleicos se mantienen intactos, aún a temperaturas superiores a los 70°C (Cox, 1968), a estas condiciones, los grupos fosfatos del ADN forman interacciones con los grupos silanol de la superficie de sílica, permitiendo su adherencia durante la extracción (Shi et al., 2015).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es un método basado en el proceso de replicación de ADN de la célula, ampliamente utilizado en biología molecular para la identificación de especies a través de la amplificación de un fragmento específico y propio de su ADN. Este es un proceso bioquímico *in vitro*, que emplea la enzima ADN-Polimerasa para sintetizar ADN a partir de desoxinucleótidos como sustrato y según una cadena molde de ADN simple. La ADN-polimerasa añade nucleótidos complementarios a la secuencia de una cadena molde la cual posee un oligonucleótido sujeto, también por complementariedad, en cuyo extremo 3' se inicia la reacción. Estos oligonucleótidos sintéticos de cadena simple se conocen como "primers" o "cebadores" (Watson et al., 2016, p. 158).

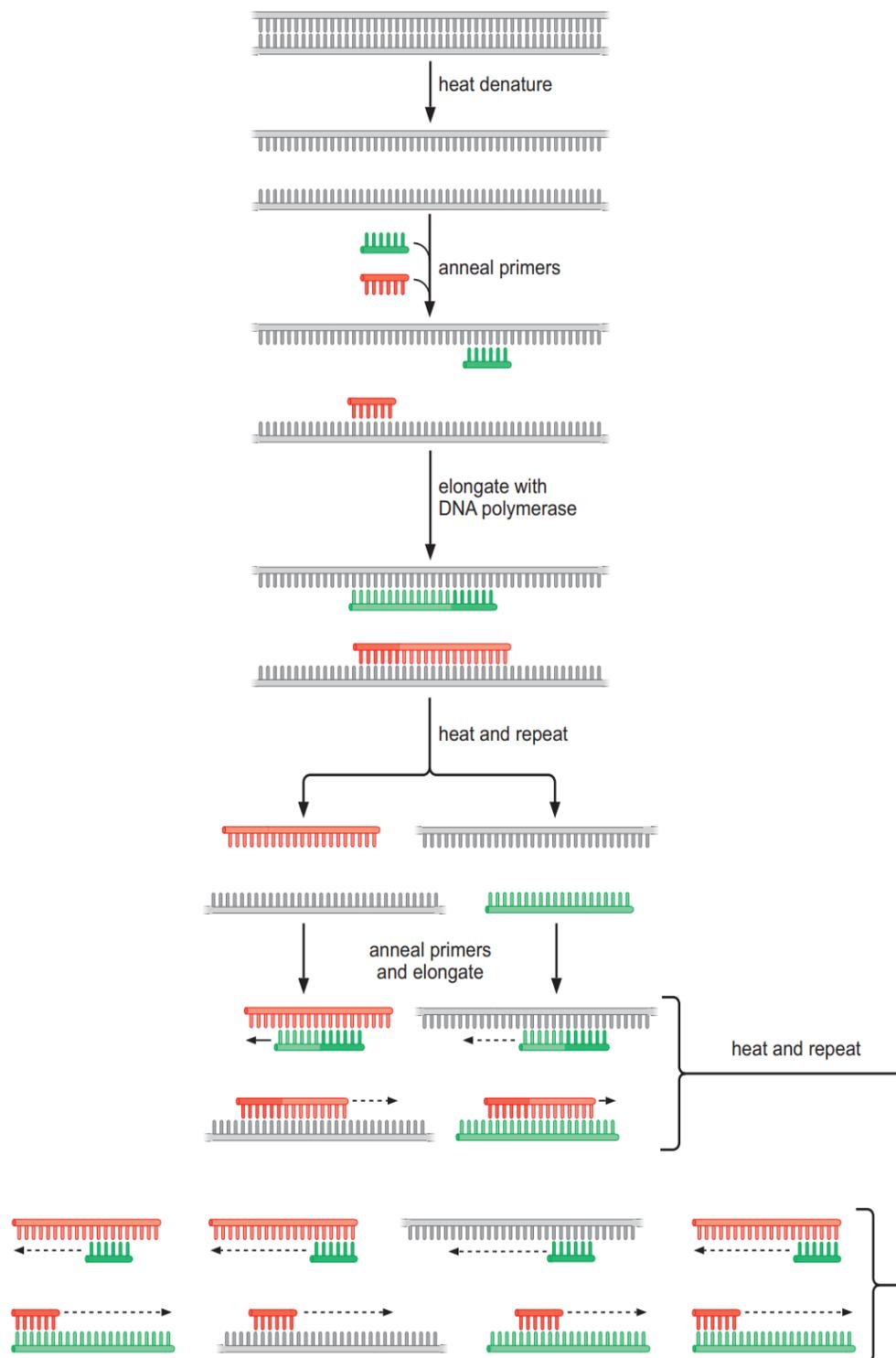
Para lograr amplificar una región determinada, se sintetizan 2 primers. Uno de ellos complementario al extremo 5' de una de las cadenas de ADN y el otro al extremo 5' de la otra

cadena, delimitando así la región a ser amplificada. El ADN es desnaturalizado por calentamiento a 95°C y luego los primers se hibridan a la cadena molde objetivo a una determinada temperatura (generalmente de 50 – 60°C). Posteriormente, una ADN-polimerasa especializada para resistir altas temperaturas (Taq-polimerasa) comienza a añadir desoxinucleótidos (dNTPs) a una temperatura de 72°C, extendiendo la secuencia iniciada por los primers. De este modo, se generan 2 copias de cadena doble del ADN de interés, culminando así el primer ciclo de la PCR (**Figura 4.**). El proceso de desnaturalización, hibridación y extensión se repite varias veces hasta obtener millones de copias del ADN que originalmente existía en pocas concentraciones. Como resultado, se tiene un fragmento de ADN, inicialmente indetectable frente a otras regiones, capaz de identificarse visualmente como una banda en un gel de agarosa (Watson et al., 2016, p. 158).

Para el caso del ADN del BPV, para la amplificación parcial del gen L1 con los primers degenerados FAP59/64 se suelen emplear las siguientes condiciones: Pre-calentamiento de 5 - 10 min a 94 - 95°C; 35 - 40 ciclos de: 90 segundos a 94 - 95°C para la desnaturalización, 30 - 120 segundos a 50 - 55°C para el anillamiento, y 30 - 60 segundos a 72°C para la extensión, con una extensión final de 5 min a 72°C (R. F. Carvalho et al., 2013; Figueirêdo et al., 2020; Ogawa et al., 2004).

Figura 4.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



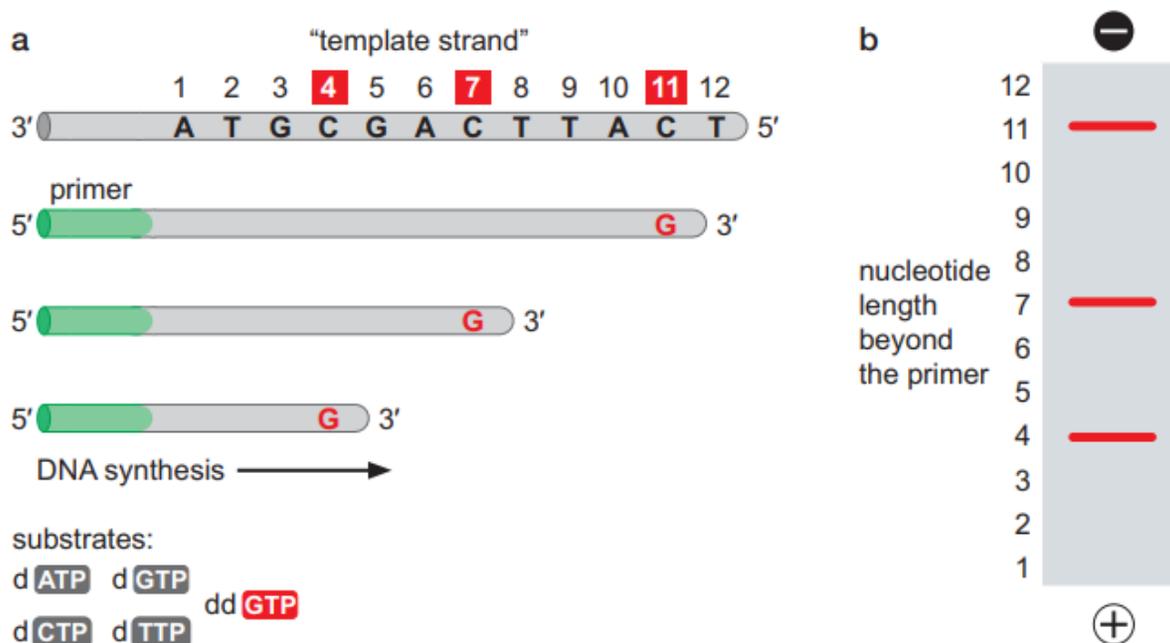
Nota: Esquema de los ciclos que ocurren durante una PCR. Por Watson et al. (2016).

Secuenciación

La secuenciación del ADN es un proceso que permite dilucidar la secuencia de los nucleótidos que conforman un fragmento determinado de ADN. A lo largo del tiempo, se han desarrollado múltiples metodologías que han posibilitado la secuenciación de genomas completos de diferentes especies, todas basadas en el mismo principio de una PCR. Inicialmente, el método fue desarrollado por F. Sanger en 1970, conocido como proceso de terminación de cadena (chain-termination process) el cual sirvió como base para métodos posteriores y los que se emplean actualmente. La idea principal es la síntesis de cadenas de ADN hermanas de un fragmento determinado. Estas cadenas hermanas se sintetizan como en una PCR, pero la reacción se detiene en determinados nucleótidos (ddNTPs; didesoxinucleótidos trifosfato, cuya estructura evita la adición de más nucleótidos por parte de la polimerasa) que se encuentran marcados. Esto permite obtener fragmentos que difieren su longitud en 1 nucleótido, los cuales, al separarse en gel de electroforesis, revelan la secuencia del fragmento de ADN original. Esta metodología recibió el nombre de Sanger y ha sido modificada de tal modo que actualmente es totalmente automática y, gracias al desarrollo de la tecnología, permite realizar millones de reacciones de secuenciación en un mismo instrumento a través de la unión de los fragmentos en una superficie sólida con oligos incrustados. A estas nuevas plataformas se las conoce como secuenciadores de siguiente generación (next-generation sequencers) (Lodish et al., 2016, p. 243).

Figura 5.

Esquema de la secuenciación por el método de terminación de cadena



Nota: Se observa un esquema del proceso de secuenciación de un fragmento (a) a través de la síntesis de cadenas hermanas de diferentes longitudes. En este ejemplo, en la reacción están presentes todas las bases como desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, y dGTP) pero también está presente G en la forma de didesoxinucleótido. De este modo, la reacción al llegar a una base C de la cadena molde, en ciertas moléculas insertará ddGTP en vez del dGTP, deteniendo la elongación. (b) Fragmentos separados en un gel de poliacrilamida. La longitud de estos fragmentos determina la posición de las citosinas de la cadena molde (Watson et al., 2016).

Metodología

Métodos y materiales

Método

En el presente estudio, se realizó la identificación y caracterización molecular del virus del papiloma bovino a través de la técnica basada en la PCR-secuenciación, empleando los primers degenerados FAP59/FAP64. Para ello, se realizó un muestreo aleatorio por conveniencia, no probabilístico y por el método “bola de nieve” en diferentes fincas de las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. Las muestras obtenidas se sometieron a un proceso de extracción directa de ADN a través de su unión a una matriz de dióxido de silicio. Luego, se estandarizó una PCR para la amplificación parcial del gen L1 del BPV mediante un gradiente de temperatura en el proceso de anillamiento; los resultados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados mediante Sanger. Finalmente, las secuencias resultantes se analizaron por bioinformática para la elaboración de un árbol filogenético, además, mediante una prueba de chi cuadrado (X^2), se determinó la relación existente entre el tipo de virus encontrado y la zona del cuerpo infectada.

Materiales, insumos, equipos, reactivos y muestras

Los materiales, insumos y equipos empleados para el muestreo, extracción y amplificación de ADN se resumen en la **Tabla 4**; mientras que, los reactivos y muestras utilizadas se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 4.

Materiales, insumos y equipos

Detalle		Característica
Muestreo		
M	Pinzas	Metálicas
M	Tijeras	Metálicas
M	Pipetas Pasteur	5 mL
I	Tubos eppendorf	1.5 mL

Detalle		Característica
Extracción de ADN		
M	Pipetas Pasteur	5 mL
M	Pisetas	500 mL
M	Vasos de precipitación	500 mL
M	Pisetas	500 mL
M	Tijeras	Metálicas
M	Pinzas	Metálicas
I	Tubos eppendorf	1.5 mL
I	Pistilos para tubos eppendorf	Estándar
I	Papel	Estándar
I	Puntas para micropipeta	20 – 200 uL; 100 – 1000 uL
E	Cámara de flujo laminar	Thermo Fisher modelo 1849
E	Incubadora	Binder
E	Micropipeta	20 – 200 uL; 100 – 1000 uL
E	Baño maría	Memmert
E	Refrigeradora	4°C
E	Congelador	-20°C
E	Vórtex	Scientific Industries Genie 2
E	Centrífuga	Mikro 200R Hettich
E	Plancha de agitación	MS7-H550
E	Microondas	Estándar
E	Cámara y fuente de electroforesis	Thermo EC 10000-90
E	Transiluminador	Cleaver scientific modelo CSLUVTSDUOL
E	Nanodrop	Thermo scientific Nanodrop Lite
PCR		
M	Matraz Erlenmeyer	100 mL
M	Agitador	Magnético
M	Gradilla refrigerada	Estándar
I	Tubos eppendorf	100 uL
I	Puntas para micropipeta	0.1 – 2 uL; 2 – 20 uL; 100 – 1000 uL
E	Cámara de flujo laminar	BIOAIR Aura mini
E	Micropipetas	0.1 – 2 uL; 2 – 20 uL; 20 – 200 uL; 100 – 1000 uL
E	Vórtex	Scientific Industries Genie 2
E	Mini centrífuga	Thermo scientific MiniMouse II Mini
E	Termociclador	Thermo P X 2 Thermal Cycler
E	Plancha de agitación	MS7-H550
E	Microondas	Estándar
E	Cámara y fuente de electroforesis	Thermo EC 10000-90
E	Transiluminador	Cleaver scientific modelo CSLUVTSDUOL

Nota: Se identifican los materiales, insumos y equipos, con las letras: “M”, “I”, “E”, respectivamente

Tabla 5.

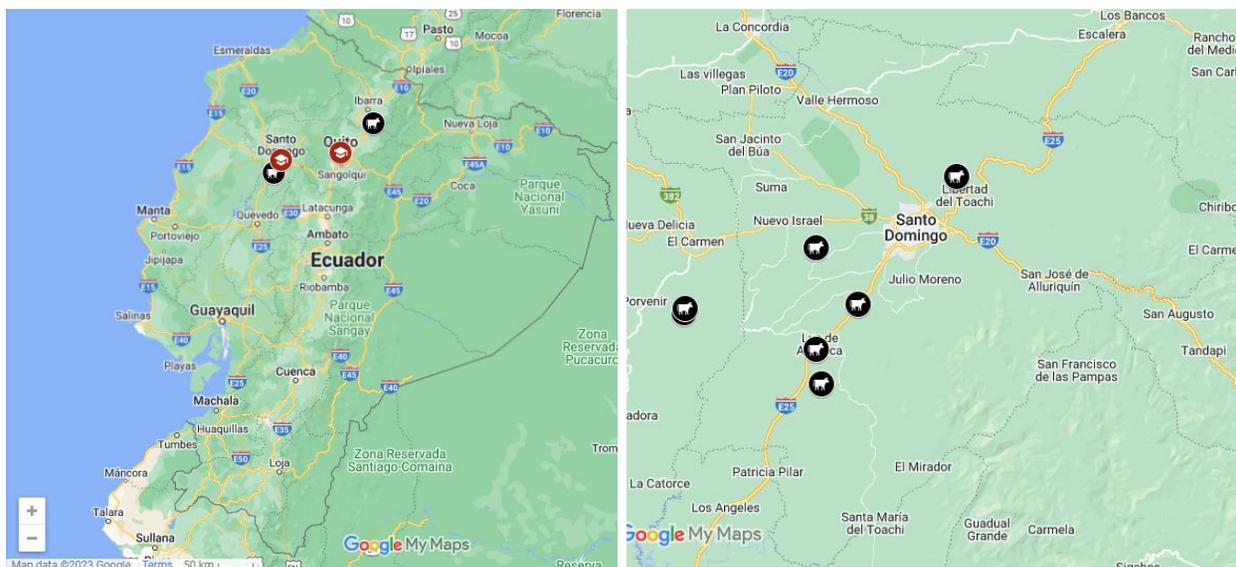
Reactivos y muestras

Detalle		Característica
Muestreo		
R	Metanol	99%
R	Etanol	70%
M	Papilomas/Verrugas	-
Extracción de ADN		
R	Agua destilada	Autoclavada
R	Hipoclorito de sodio	1%
R	Proteinasa K	Promega 100 mg
R	Tris-HCl	10 mM pH=8
R	Glassmilk	-
R	Isopropanol	100%
R	Wash buffer (Tris HCl, NaCl, Etanol)	pH 7.5
R	Etanol	70%
R	TE	1:10
M	Papilomas	±10 mg
PCR		
R	Agua	Libre de nucleasas
R	Buffer	ABM
R	MgSO ₄	ABM
R	FAP59	forward; 5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'
R	FAP64	reverse; 5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3'
R	dNTPs	ABM
R	Taq	ABM
R	Buffer de carga	Thermo
R	Marcador de peso molecular	Thermo 100 pb
R	Agarosa	ABM
R	TAE	1X
R	Bromuro de etidio	5 uL
M	ADN Papilomavirus	-

Nota: Se identifican los reactivos y muestras, con las letras: “R” y “M”, respectivamente

Ubicación geográfica

Las muestras fueron obtenidas en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador (**Figura 6.**). La extracción de ADN y el análisis molecular se realizaron en la misma institución. El proceso de secuenciación se ejecutó en la Universidad de las Américas, Quito.

Figura 6.**Mapa de los lugares de muestreo y experimentación**

Nota: Izquierda: Mapa del Ecuador con las ciudades de Santo Domingo de los Tsáchilas, Ibarra y Quito. Se destacan en rojo las instituciones donde se realizó el estudio y en negro los lugares de muestreo. Derecha: Mapa de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas que destaca las fincas muestreadas.

Procedimiento**Recolección de las muestras**

Se realizó un muestreo por conveniencia no probabilístico para lograr caracterizar e identificar los diferentes BPVs presentes en la zona. Similar a lo realizado por Alfaro-Mora et al., (2023) se empleó el método de muestreo de “bola de nieve”, que consistió en la búsqueda de ganado vacuno con papilomatosis en fincas aledañas, a la vez que se solicitaba información de otros casos conocidos (p. 2).

En cada caso, luego de una breve entrevista informal con las personas encargadas de la finca, se procedió al reclutamiento del ganado en corrales de retención donde se realizó la inspección de individuos infectados. Una vez identificados, se anotaron datos informativos como: Nombre del animal, lugar de la papilomatosis, tamaño y morfología de la verruga.

Posteriormente, se tomaron fotos del papiloma a extraer y se procedió con el corte. Para ello, con instrumentación previamente esterilizada en autoclave, se tomó con una pinza el papiloma y se lo recortó con tijeras quirúrgicas. La verruga obtenida se introdujo inmediatamente dentro de un tubo eppendorf estéril, rotulado según la nomenclatura: F#M#_ddmmaa (F=Número de finca, M= número de muestra, fecha) y se introdujo a su vez en una hielera a temperatura ambiente. En algunos casos, se tomaron de 2 a 3 verrugas de diferentes partes del cuerpo del mismo individuo. La herida del animal luego del corte se roció con un antiséptico en aerosol para evitar futuras infecciones o miasis; mientras que, los utensilios fueron desinfectados con etanol al 70% antes de cada corte.

Una vez obtenidas todas las muestras, estas fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la UFA-ESPE, donde se realizó un proceso de lavado que consistió en la adición de metanol al tubo con la muestra y posterior agitación constante. Finalmente, las verrugas se dejaron sumergidas en metanol y almacenadas a -20°C en tubos eppendorf.

En total, se muestrearon 8 fincas: 7 en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, de las cuales, 3 se encontraba en el sector Vía a “El Carmen”, 3 en la parroquia “Luz de América” y 1 en la parroquia “Libertad del Toachi”; además, un último muestreo se realizó en la provincia de Imbabura. Las muestras obtenidas se organizaron junto con datos como: Coordenadas de ubicación, número de finca, parte del cuerpo del cual se extrajo el papiloma, tamaño de la verruga y fotografía correspondiente.

Análisis molecular

Extracción de ADN

Pretratamiento

Con ayuda de pinzas y tijeras previamente esterilizadas, se recortó un trozo del papiloma (aproximadamente 10 mg) y se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1,5 mL. Esto se realizó con todas las muestras, enjuagando las pinzas y tijeras con: 1) Agua destilada, 2)

Hipoclorito de sodio 1% y 3) Agua destilada; antes de cada recorte. Luego, los tubos se introdujeron en una incubadora a 37°C por 30 min hasta evaporar todo el metanol.

Digestión

Se agregaron 370 uL de buffer Tris HCl (10 mM, pH = 8) en cada tubo, luego, con ayuda de un pistilo para tubos eppendorf, se trituraron las muestras hasta homogeneizar lo mejor posible. Posteriormente, se agregaron 30 uL de proteinasa K (20 mg/mL) y los tubos se agitaron en el vórtex. Por último, se colocaron en baño maría a 50 °C por 24h (overnight). Transcurrido ese tiempo, en caso de que la muestra no se hubiese degradado completamente, se volvía a triturar con un pistilo.

Extracción

Se agregaron 200 uL de Glassmilk (Magic Blue) en cada tubo y llevó al vórtex. Luego, las muestras se incubaron a 60°C por 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 200 uL de isopropanol y se llevó al vórtex nuevamente; se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto y descartó el sobrenadante de cada tubo.

Lavado

El pellet obtenido en cada tubo se resuspendió con 600 uL de Wash Buffer pH 7,5 y llevó al vórtex, se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto y nuevamente se descartó el sobrenadante. Estos pasos se repitieron hasta obtener un pellet blanquecino. Finalmente, en el último lavado, se resuspendió el pellet resultante de cada tubo con 600 uL de etanol 70%, se llevó al vórtex y luego se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto.

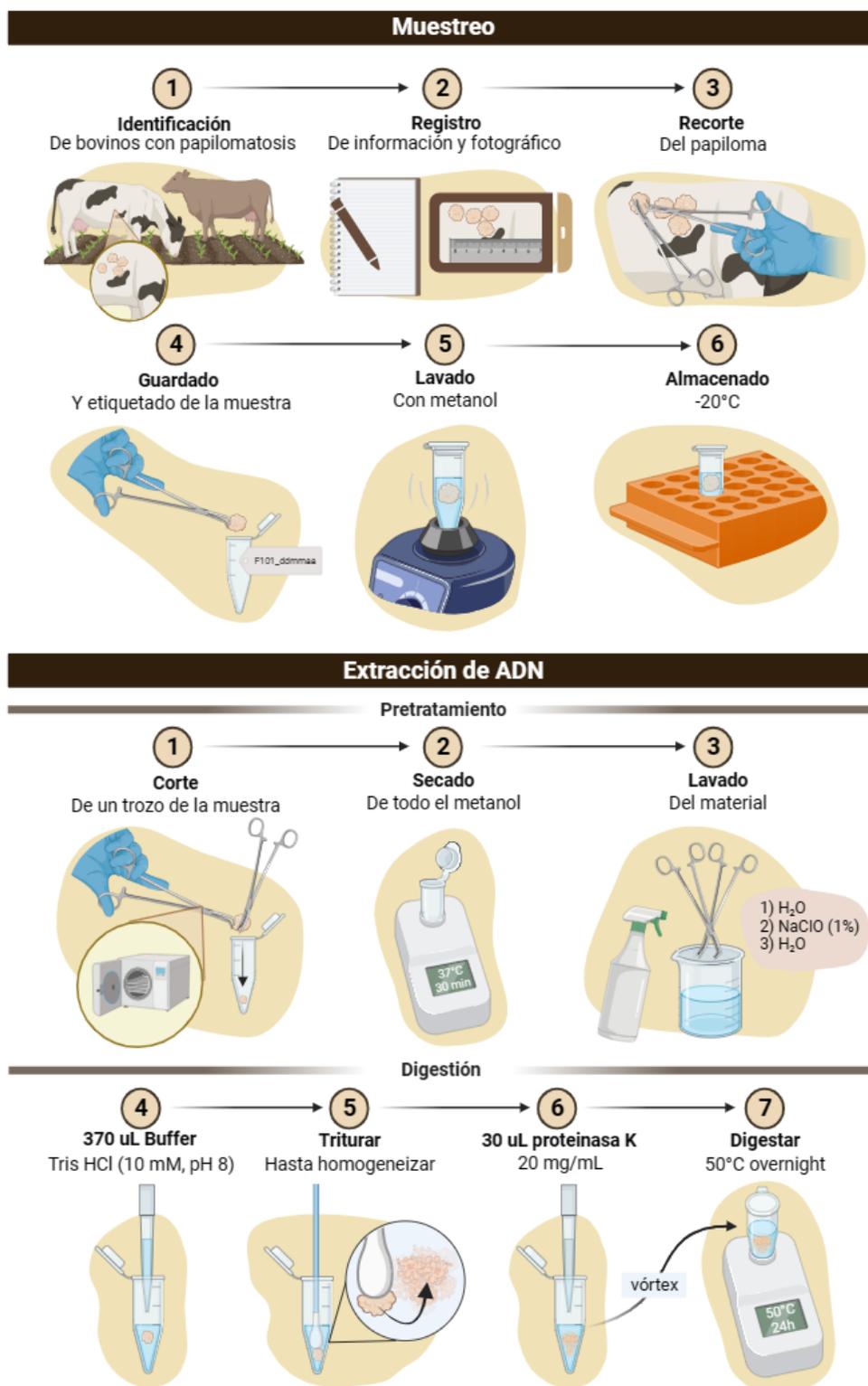
Resuspensión

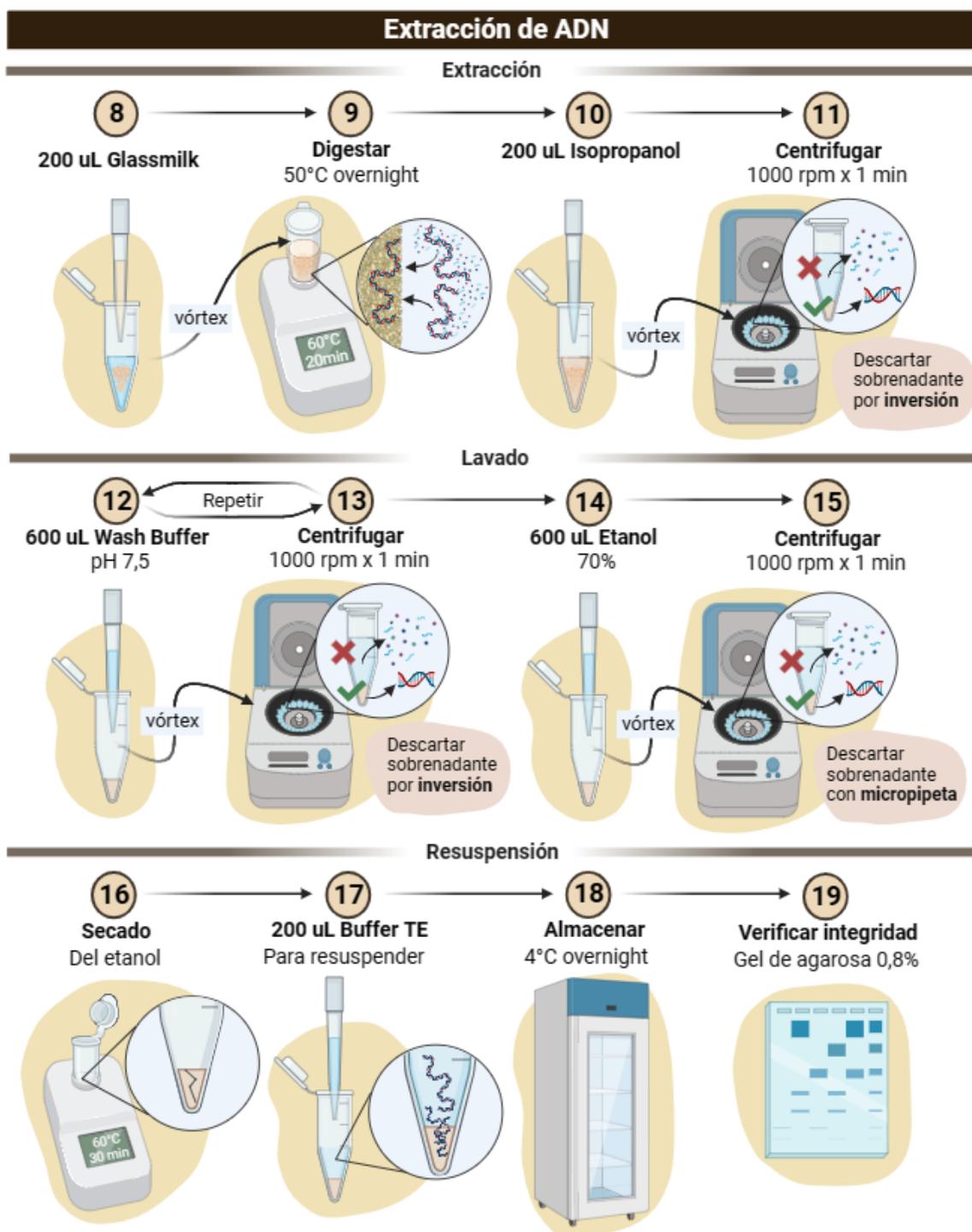
Del proceso anterior, se retiró el sobrenadante, primero por inversión y luego con ayuda de una micropipeta. Posteriormente, los tubos se destaparon e introdujeron en una incubadora a 60°C por 30 min hasta evaporar por completo el etanol. En este proceso, se aseguró que el pellet de cada tubo se haya fisurado, pues esto indicaba un secado completo. Finalmente, cada

pellet se resuspendió en 200 uL de buffer TE y los tubos se almacenaron a 4°C por 24h (Overnight). A partir de ese tiempo, se mantuvieron a -20°C para los análisis posteriores. La integridad del ADN obtenido se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% revelado con bromuro de etidio; así mismo, la cantidad de ADN se estimó por espectrometría en un Nanodrop (Thermo).

Figura 7.

Protocolo de muestreo





Nota: Flujograma del protocolo de muestreo y extracción de ADN realizado en este estudio.

Elaborado en BioRender. Fuente propia.

Estandarización de la PCR y amplificación

Se estandarizó una PCR mediante gradientes de temperatura en el proceso de hibridación. Para tal efecto, se usaron las concentraciones de reactivos descritos en la **Tabla 6** para un volumen de reacción final de 25 uL. El gradiente aplicado fue de 42°C a 50°C, programado en un termociclador Thermo®, junto con las condiciones establecidas en la **Tabla 7**. La preparación de la master mix se realizó en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada con: (1) hipoclorito de sodio 1%, (2) agua destilada y (3) alcohol 70%. Finalmente, luego de determinar la temperatura óptima de hibridación, esta se utilizó para amplificar el ADN de todas las muestras y los productos obtenidos se observaron en un gel de agarosa al 1,5% revelado con bromuro de etidio a 10.000X.

Tabla 6.

Reactivos empleados para la PCR del papilomavirus bovino

Reactivos	Unidad	Stock	Volumen	Volumen mezcla
Agua libre de nucleasas	uL	N/A	14,75	
Buffer	10x	10	2,50	
Mg ²⁺	mM	25	3,00	
FAP 59 (Forward)	uM	10	1,00	Volumen * número de muestras
FAP 64 (Reverse)	uM	10	1,00	
dNTPs	mM	40	0,50	
Taq	U/uL	5	0,25	
ADN	ng	-	2	

Nota: Reacción estimada para un volumen final de 25 uL

Tabla 7.

Condiciones de reacción para la PCR de papilomavirus bovino con gradiente de temperatura

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	10'	1
Desnaturalización	95	30"	
Hibridación	42 - 50	45"	32
Extensión	72	80"	
Extensión final	72	10'	1
Mantenimiento	4	∞	N/A

Nota: Condiciones de reacción programadas en termociclador Thermo ®.

Secuenciación

Se realizó la secuenciación en un sentido (Hacia adelante) de todos los productos de PCR obtenidos y en doble sentido (Hacia adelante y atrás) de aquellas que representaron, tentativamente, el mismo patotipo, el cual se determinó por BLAST de las secuencias en un solo sentido. El proceso se llevó a cabo en los laboratorios de Vinculación e investigación de la Universidad de las Américas, por la metodología de Sanger.

Análisis de datos

Filogenia

Para el análisis de datos, se limpiaron las secuencias en un solo sentido en MEGA X, eliminándose aquellas regiones con ruido ubicadas en los extremos. Luego, se realizó el BLAST de estas en la base de datos NCBI y PaVe (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y https://pave.niaid.nih.gov/search/pv_specific_blast) para determinar su identidad con secuencias de BPV de referencia. Una vez determinado el tipo de BPV, se alinearon las secuencias hacia adelante y atrás junto con los primers en MEGAX para obtener los fragmentos completos de cada tipo. Posteriormente, luego de una nueva búsqueda en BLAST

con las secuencias completas, se recolectaron diferentes secuencias referencia de la base de datos NCBI con mayor identidad para cada tipo, junto con una secuencia de papilomavirus de una especie diferente (outgroup). Posteriormente, estas se alinearon en MEGAX empleando el algoritmo MUSCLE con el método Neighbor Joining. El alineamiento obtenido se curó en la herramienta online GBLOCKS 0.91b ([Phylogeny.fr: Gblocks \(lirmm.fr\)](http://Phylogeny.fr:Gblocks(lirmm.fr))) con los parámetros para un curado menos estricto activados. Los resultados se guardaron en formato PHYLIP (.phy) y se cargaron a una carpeta de trabajo en CIPRES v3.3. En esta misma plataforma, se utilizó la herramienta RAXML-HPV BlackBox para elaborar un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud y rapid bootstrapping. Dentro de los parámetros se ingresó un número máximo de horas de corrida de 2 y el nombre del outgroup correspondiente. Finalmente, el árbol obtenido con la extensión "RAXML_bipartitions.result" se observó y editó en el software FigTree v1.4.4.

Diseño experimental

Con los datos obtenidos del tipo de virus encontrado en cada animal, se realizó una tabla de contingencia en el programa estadístico INFOSTAT que relacionó las variables: Género del tipo de papilomavirus bovino encontrado y lugar del cuerpo del bovino objeto de estudio. Así mismo, se aplicó una prueba de Chi cuadrado (X^2) para datos no paramétricos para identificar relaciones de dependencia entre estas variables, de acuerdo a un valor de probabilidad de $p = 0,05$. Las hipótesis planteadas en este estudio se resumen a continuación:

- **Hipótesis nula (H0):** El lugar del cuerpo del bovino en el que infecta el papilomavirus es independiente del género del papilomavirus que causa la infección.
- **Hipótesis alternativa (H1):** El lugar del cuerpo del bovino en el que infecta el papilomavirus es dependiente del género del papilomavirus que causa la infección.

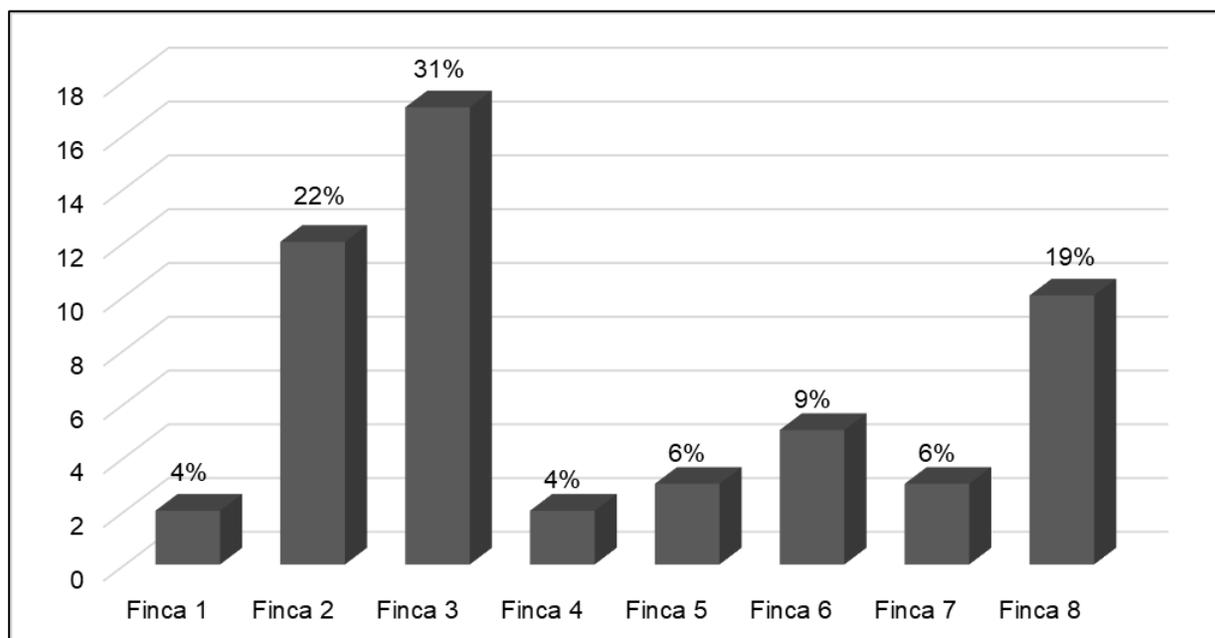
Resultados

Muestreo

Se recolectaron 57 muestras de papilomas de 30 bovinos en 8 fincas distintas (**Figura 8**). De estas, 1 sólo tipo de papiloma se extrajo de 9 bovinos, 2 de 15 y 3 de 6. La tabla con los datos obtenidos se presenta en el **Anexo 1**. La mayoría de las muestras se extrajeron del cuello (23,6%), seguido de la ubre y oreja (12,7% cada uno), pierna (10,9%), ombligo (7,3%), cabeza, cara y espalda (5,5% cada uno), boca (3,6%), cola y nariz (1,8%) (**Figura 9**); con un tamaño promedio de 0,8 cm. En cuanto a su morfología, las verrugas en su mayoría tenían forma típica de coliflor (35,1%), seguida de una forma de arroz y filamentosa (12,3% cada uno), aplanada (10,5%) y pedunculada (3,5%).

Figura 8.

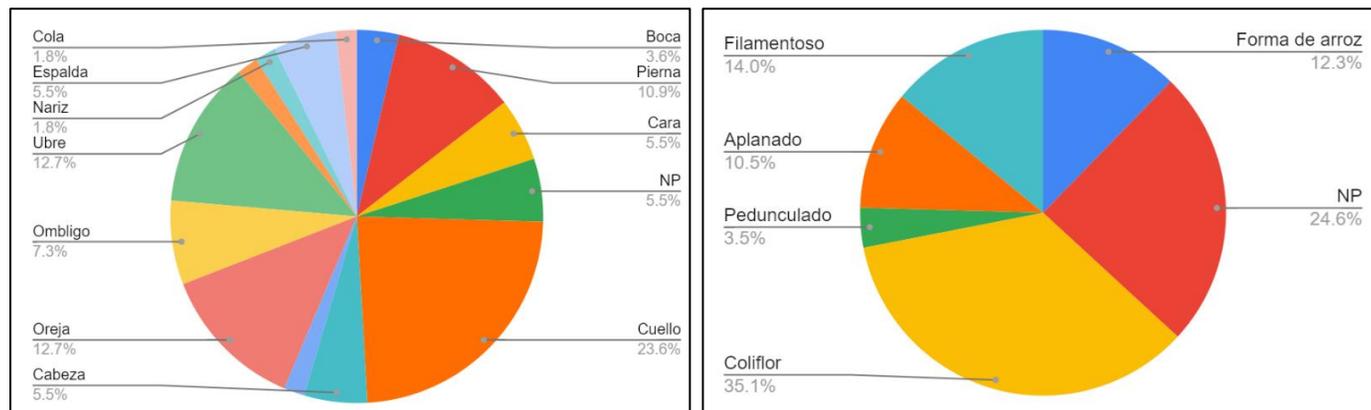
Recuento del número de muestras recolectadas por finca



Nota: Gráfico realizado en Excel. Fuente propia.

Figura 9.

Diagramas de pastel de la zona del cuerpo objeto de muestreo, morfología observada y registro fotográfico.



Nota: (Arriba) Diagramas elaborados en Excel con los datos del **Anexo 1**. Izquierda: Diagrama de pastel de la parte del cuerpo de donde se extrajeron las verrugas; Derecha: Diagrama de pastel de la morfología de las verrugas. NP = No Proporcionado. (Abajo) Registro de las muestras: 1) F205_310823 (Forma de coliflor, extraído del cuello), 2) F315_061023 (Forma de arroz, extraído del cuello), 3) F314_061023 (Filamentoso, extraído de la ubre), 4) F316_061023 (Pedunculado, extraído de la ubre), 5) F829_091223 (Aplanado, extraído de la cola). Fuente propia.

Extracción de ADN

Luego del método de extracción, no se observaron bandas claras en los geles de agarosa, sin embargo, la medición por espectrometría mostró concentraciones de ADN entre

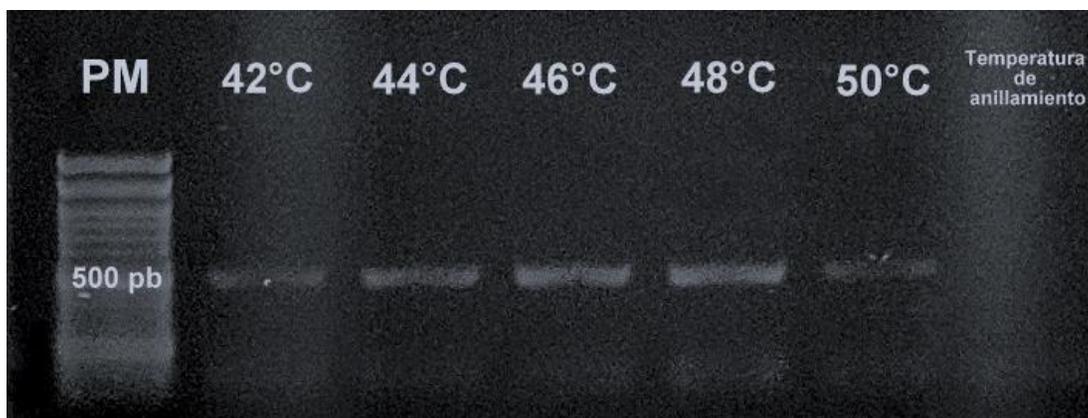
6,2 y 246,7 ng/uL, con un promedio de 43,8 ng/uL. Estos datos de concentración de ADN en cada muestra obtenida se presentan en la tabla de datos del **Anexo 1**.

Estandarización de la PCR y amplificación

Se determinó que la temperatura de hibridación óptima para la amplificación parcial del gen L1 con los primers FAP59/64 fue de 48°C (**Figura 10**). A esta condición se lograron detectar 48 muestras positivas para papilomavirus, exhibiendo bandas en el gel de agarosa de un tamaño aproximado de 500pb, junto con 9 negativas inicialmente (84,21% de efectividad). Luego de distintos tratamientos (Re-extracción de ADN, y PCR del producto de PCR), para estas últimas se logró la amplificación parcial del gen L1 en 4 muestras, aumentando el número de positivos a 52/57 (91,22% de efectividad). Sin embargo, de los resultados positivos, únicamente 49 productos de PCR mostraron bandas claras en el gel para su secuenciación. Estos resultados se ilustran en el **Anexo 2**.

Figura 10.

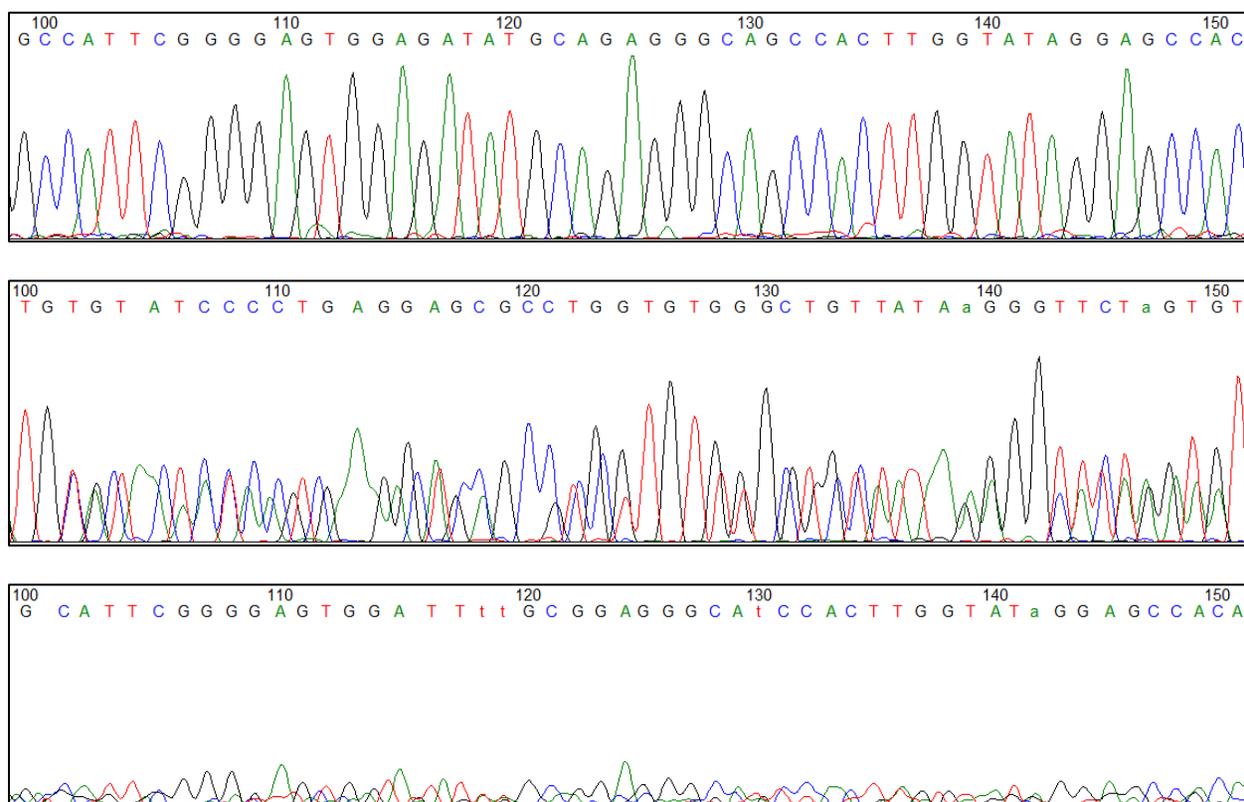
PCR de BPV con gradiente de temperatura



Nota: Electroforesis en gel de productos de PCR de BPV con gradiente de temperatura de 42, 44, 46, 48, 50 °C. Muestra F204_310823. Se observa una banda de 500 pb en cada caso, aumentando su intensidad a 48°C. PM=Marcador de peso molecular (100bp Opti-DNA Marker Cat\$ G016, ABM).

Secuenciación e identificación

Tras la secuenciación en sentido hacia adelante de los amplicones de las 49 muestras positivas, se obtuvieron 47 electroferogramas limpios y 2 con ruido (**Figura 11**). Luego del análisis en BLAST, se encontraron 13 tipos de BPVs diferentes. Con las secuencias en sentido hacia atrás de muestras representativas de cada tipo y a través del alineamiento con los primers FAP59/64, se determinaron las secuencias parciales del gen L1 de las muestras F827.2_261123, F101_250823, F521.1_211123, F310_061023, F829_091223, F308.1_061023, F311.2_061023, F206.1_310823, F826_261123, F622_241123, F309_061023, F317_061023 y F622.1_241123, con una longitud de 425 – 433 pb. Diez de estas poseen un alto porcentaje de identidad (99-100%) con los tipos virales BPV1, BPV2, BPV4, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV13, BPV14 y BPV42; dos muestran alta identidad con nuevos tipos de BPVs recientemente caracterizados (nombrados BPVEC2024-09 y BPVEC2024-17) y se halló un nuevo tipo putativo de papilomavirus bovino (BPV-EC2024-22.1) dado un porcentaje de identidad inferior al 90% (81,71%) con otras secuencias de referencia. Del mismo modo, las secuencias en sentido hacia adelante de todas las muestras revelaron la existencia de una variante putativa del BPV1 (BPV1_varEC2024) junto con un subtipo putativo del BPV2 (BPV2_stEC2024) (**Figura 12**) con porcentajes de identidad <2% y entre 2–10% (98,4% y 97,6%, respectivamente) (**Tabla 8**).

Figura 11.*Electroferogramas de algunos amplicones obtenidos***Nota:** De arriba hacia abajo, se muestran los electroferogramas de las muestras

F311.2_061023 sin ruido y F312.1_061023, F308_061023, con ruido. Secuencias observadas en MEGAX. Fuente propia.

Tabla 8.*Tipos y variantes del papilomavirus bovino identificados en este estudio*

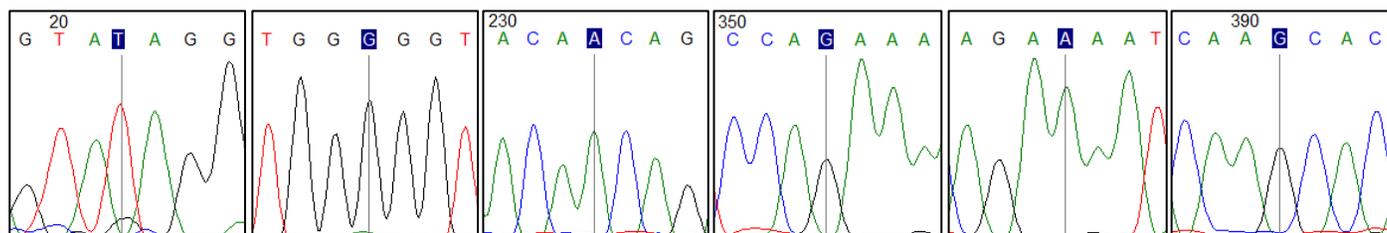
Nombre	Tipo viral de referencia			
	NCBI	Id (%)	PaVe	Id(%)
BPV1_EC2024 aislado F724_241123	BPV1 (MT385853.1)	100	BPV1 (X02346)	99,3
BPV1_varEC2024 aislado F827.2_261123	BPV1 (MF384288.1)	99,77	BPV1 (X02346)	98,4
BPV2_EC2024 aislado F101_250823	BPV2 (LC426022.1)	100	BPV2 (M20219)	99,3
BPV2_stEC2024 aislado F623_241123	BPV2 (MH187961.1)	100	BPV2 (M20219)	97,6
BPV4_EC2024 aislado F521.1_211123	BPV4 (OP682875.1)	99,29	BPV4 (X05817)	99,3
BPV6_EC2024 aislado F310_061023	BPV6 (MH729201.1)	100	BPV6 (AB331651)	100
BPV8_EC2024 aislado F829_091223	BPV-8 MH237829.1	99,75	BPV-8 DQ098913	99,8
BPV9_EC2024 aislado F308.1_061023	BPV9 (ON721390.1)	100	BPV9 (AB331650)	99,1
BPV10_EC2024 aislado F311.2_061023	BPV10 (ON721397.1)	100	BPV10 (AB331651)	99,8
BPV13_EC2024 aislado F206.1_310823	BPV13 (MG818475.1)	100	BPV13 (JQ798171)	100
BPV14_DC2024 aislado F826_261123	BPV14 (KR868228.1)	99,77	BPV14 (KP276343)	99,8
BPV43_DC2024 aislado F622_241123	BPV42 (MW428429.1)	99,54	BPV43 (MW428429.1)	99,5
BPVEC2024_09 aislado F309_061023	BPV-BR-UEL08 (MH729203.1)	99,77	BPV40 (MW428425.1)	78,27
BPVEC2024_17 aislado F317_061023	BPV-CR2 (MZ292467.1)	100	BVP12 (JF834523)	86,4
BPVEC2024_22.1 aislado F622.1_241123	BPV-UFSBR36 (MT674605.1)	81,71	BPV4 (X05817.1)	77,88

Nota: Se muestran los números de acceso de los tipos virales obtenidos por BLAST en NCBI y PaVe que mostraron mayor identidad con las secuencias encontradas en este estudio. Fuente propia.

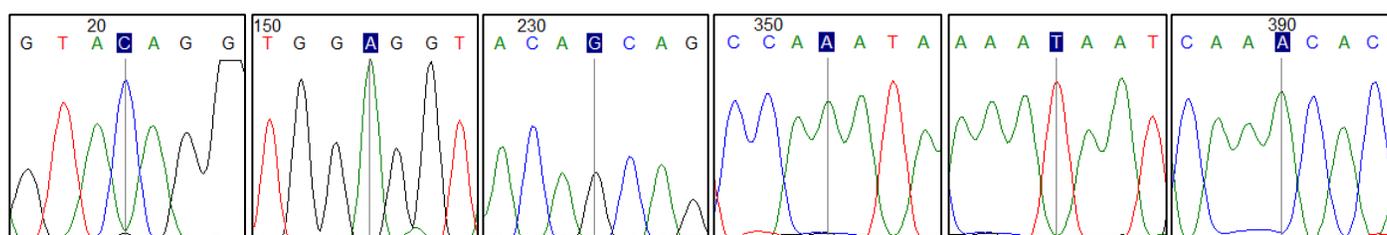
Figura 12

Electroferogramas de la variante y subtipo de papilomavirus bovino encontrados

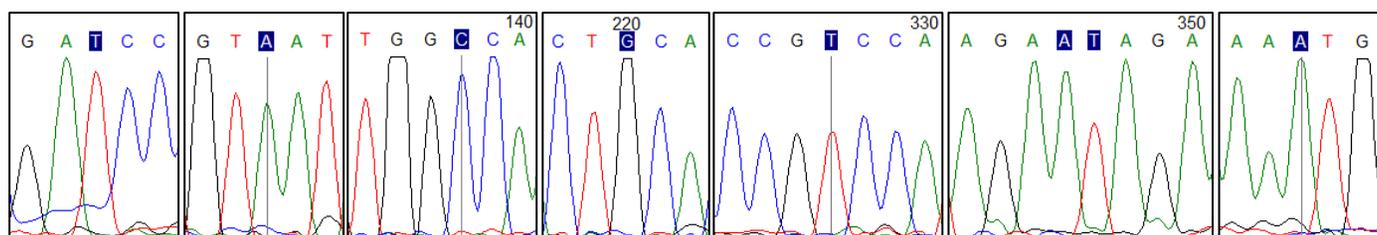
BPV1_EC2024 aislado F724_241123



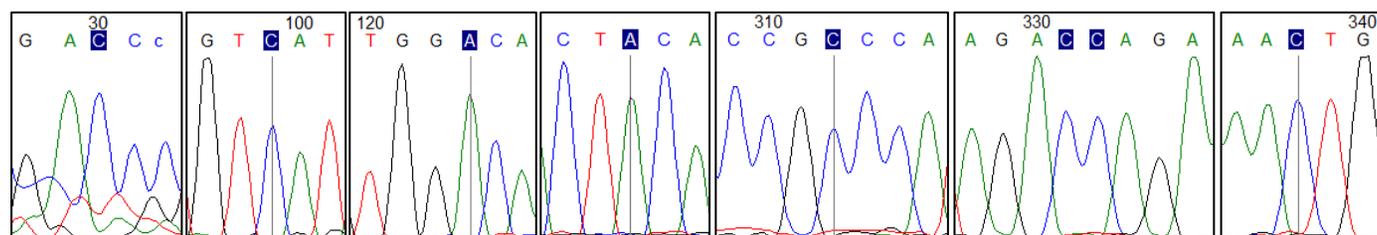
BPV1_varEC2024 aislado F827.2_261123



BPV2_EC2024 aislado F101_250823



BPV2_stEC2024 aislado F623_241123



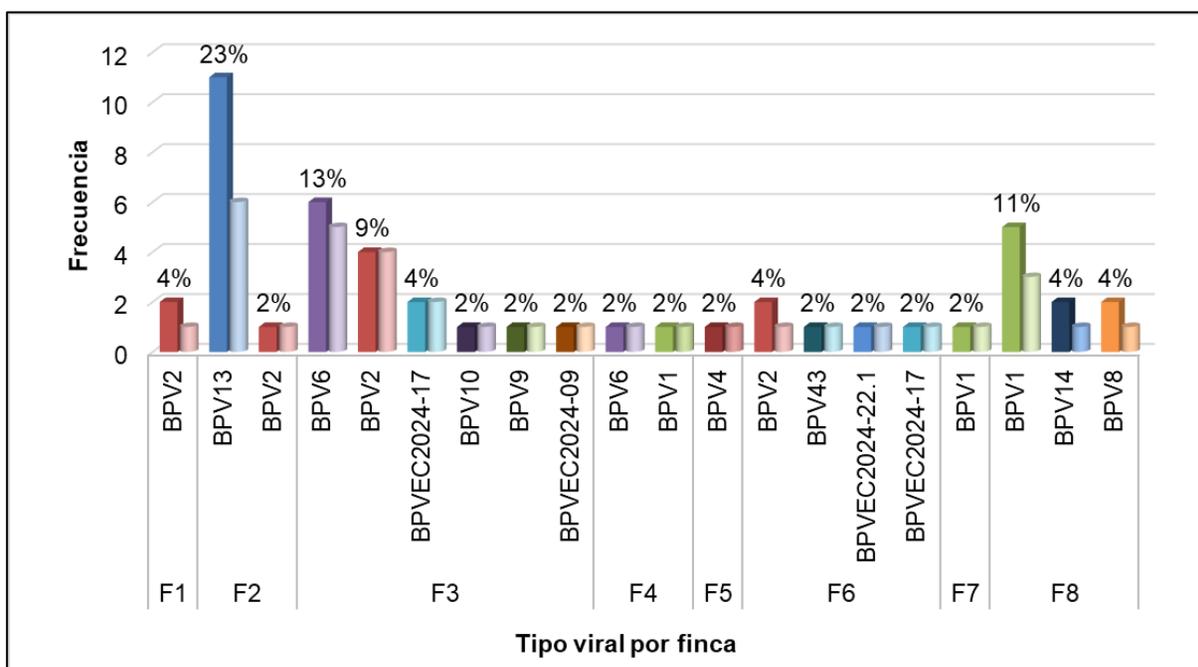
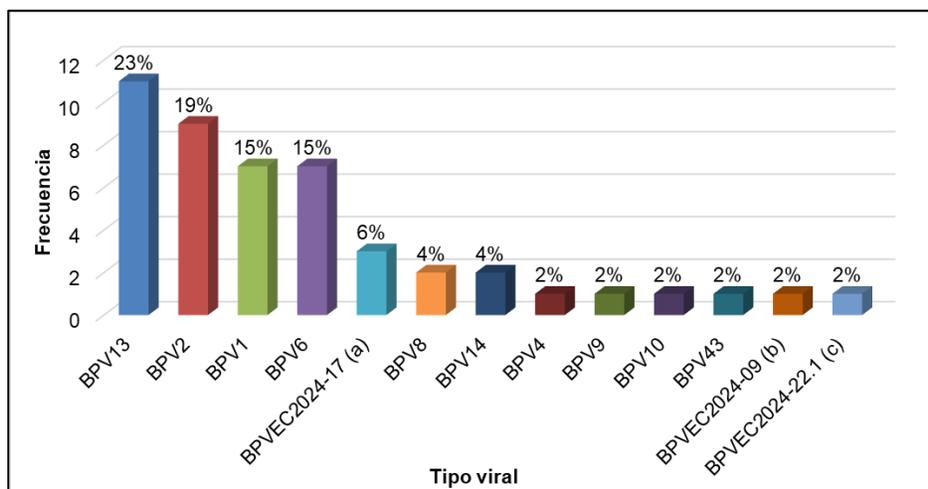
Nota: (Par superior) Electroferogramas comparados que destacan las bases nitrogenadas que difieren entre el BPV1 y la variante BPV1-var, encontradas en este estudio. (Par inferior) Electroferogramas de las bases que difieren entre el BPV2 y el subtipo BPV2-st. Secuencias observadas en MEGAX. Fuente propia.

Respecto a la distribución del BPV en las distintas zonas objeto de estudio (**Figura 13**) se observó que el genotipo más abundante fue el BPV2, hallado en 4 de las 8 fincas y representando un 19% de todas las muestras. A pesar de que el BPV13 presentó el porcentaje más alto de ocurrencia (23%) este se encontró limitado geográficamente sólo en la finca 2. Los siguientes genotipos más abundantes fueron el BPV1 y BPV6, distribuidos en las fincas 4, 7, 8 y 3, 4, respectivamente. Por otro lado, la finca 3, ubicada en las afueras de la parroquia Luz de América, fue aquella con mayor diversidad genotípica con 6 diferentes tipos identificados (BPV6, BPV2, BPV10, BPV9, BPVEC2024-17 y BPVEC2024-09), seguida de la finca 6 con 3 tipos diferentes (BPV2, BPV43, BPVEC2024-17) y el nuevo tipo putativo de BPV (BPVEC2024-22.1). Finalmente, los patotipos con menor ocurrencia (BPV8, BPV14, BPV4, BPV9, BPV10 y BPV43) se distribuyeron en las fincas 3, 5, 6 y 8.

Por otro lado, se lograron observar coinfecciones en 7 bovinos. El BPV13 y la variante putativa encontrada (BPV2_varEC2024) coinfectaron al mismo bovino en el cuello en diferentes papilomas. Los tipos BPV43, BPVEC2024_22.1 y BPVEC2024_09 coinfectaron un mismo bovino en la nariz, cuello y espalda, respectivamente; así también, el BPV14, BPV1 y BPV2 se halló en un mismo bovino en papilomas de la espalda y cuello. En la finca 3 se observaron múltiples coinfecciones, de modo que: el BPV2 y BPV9 se encontraron en un mismo individuo, infectando la boca y ombligo respectivamente; así mismo el BPV2, BPV6 y BPV10 infectaron al mismo bovino en el pecho, oreja y ubre, respectivamente; finalmente, también se encontraron los nuevos tipos BPVEC2024_09 y BPVEC2024_17 coinfectando en la oreja y ubre del mismo bovino. Cabe destacar que, en la misma finca, se evidenciaron 2 posibles coinfecciones de más de un patotipo en un mismo papiloma, presentes en la oreja de un bovino y la ubre de otro. Estos resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Figura 13.

Diversidad de patotipos del papilomavirus bovino identificados



Nota: (Superior) Frecuencia de los tipos de BPVs encontrados. (a) y (b) con identidad alta con nuevos tipos reportados y (c) nuevo tipo putativo encontrado en este estudio. (Inferior)

Frecuencia de los tipos de BPVs encontrados agrupados por finca. F = Finca y con recuento del número de animales muestreados (cilindros). Fuente propia.

Tabla 9.*Coinfecciones de diferentes tipos de papilomavirus bovino*

Identificación del animal	Finca	Código de muestra	Tipo viral	Parte del cuerpo
Remedios	2	F204_310823	BPV2_var	Cuello
		F204.1_310823	BPV13	Cuello
Dura	3	F308_061023	ND	Oreja
		F308.1_061023	BPV9	Boca
		F308.2_061023	BPV2	Ombbligo
Chela	3	F309_061023	BPVEC2024_09	Oreja
		F309.1_061023	BPVEC2024_17	Ubre
Viky	3	F311_061023	BPV2	Pecho
		F311.1_061023	BPV6	Oreja
		F311.2_061023	BPV10	Ubre
Tamy	3	F312_061023	BPV2	Ubre
		F312.1_061023	ND	Ubre
14921	6	F622_241123	BPV43	Nariz
		F622.1_241123	BPVEC2024_22.1	Cuello
		F622.2_241123	BPVEC2024_17	Espalda
Cachuqui	8	F826_261123	BPV14	Espalda
		F826.1_261123	BPV1	Cuello
		F826.2_261123	BPV2	Cuello

Nota: Se presentan los 8 bovinos que presentaron coinfecciones en papilomas de diferentes partes del cuerpo y en el mismo papiloma. ND=No determinado. Fuente propia.

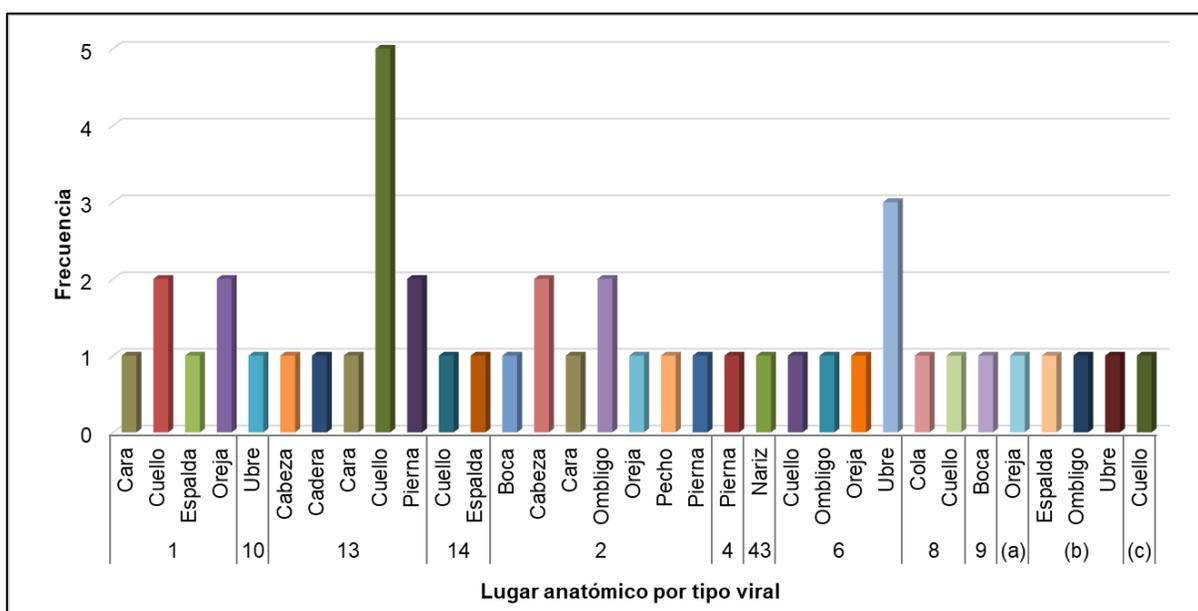
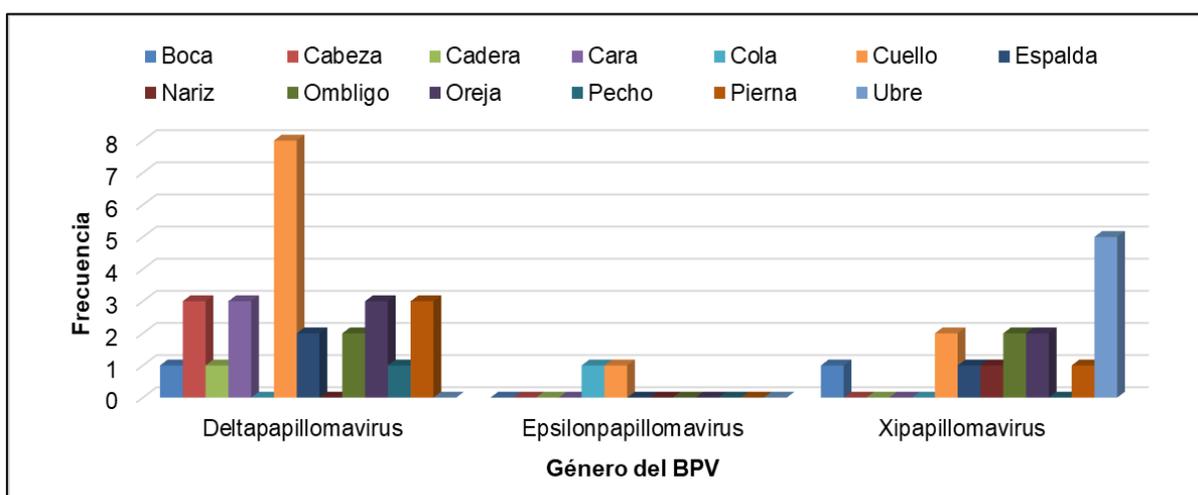
Resultados estadísticos

Con respecto a la relación existente entre el genotipo del papilomavirus bovino y el lugar de la infección, se obtuvo la tabla de contingencia del **Anexo 3**. Los resultados de la prueba de Chi-cuadrado (X^2) mostraron un valor de $p = 0,0173$ inferior a 0,05; por lo que, existe evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula planteada y aceptar la hipótesis alternativa, indicando que el lugar donde ocurre la papilomatosis posee relación con el género

del papilomavirus bovino que causa la infección. La relación encontrada en este estudio se ilustra en la **Figura 14.**, donde se observa que el género *Deltapapillomavirus* infecta en diversas partes del cuerpo, con preferencia en el cuello; por otro lado, los papilomavirus del género *Xipapillomavirus* parecen tener predilección en la ubre; finalmente, los patotipos del género *Epsilonpapillomavirus* en este estudio parecen infectar únicamente la cola y cuello del animal.

Figura 14.

Gráfico de barras del género del papilomavirus bovino y el lugar donde ocurrió la infección.



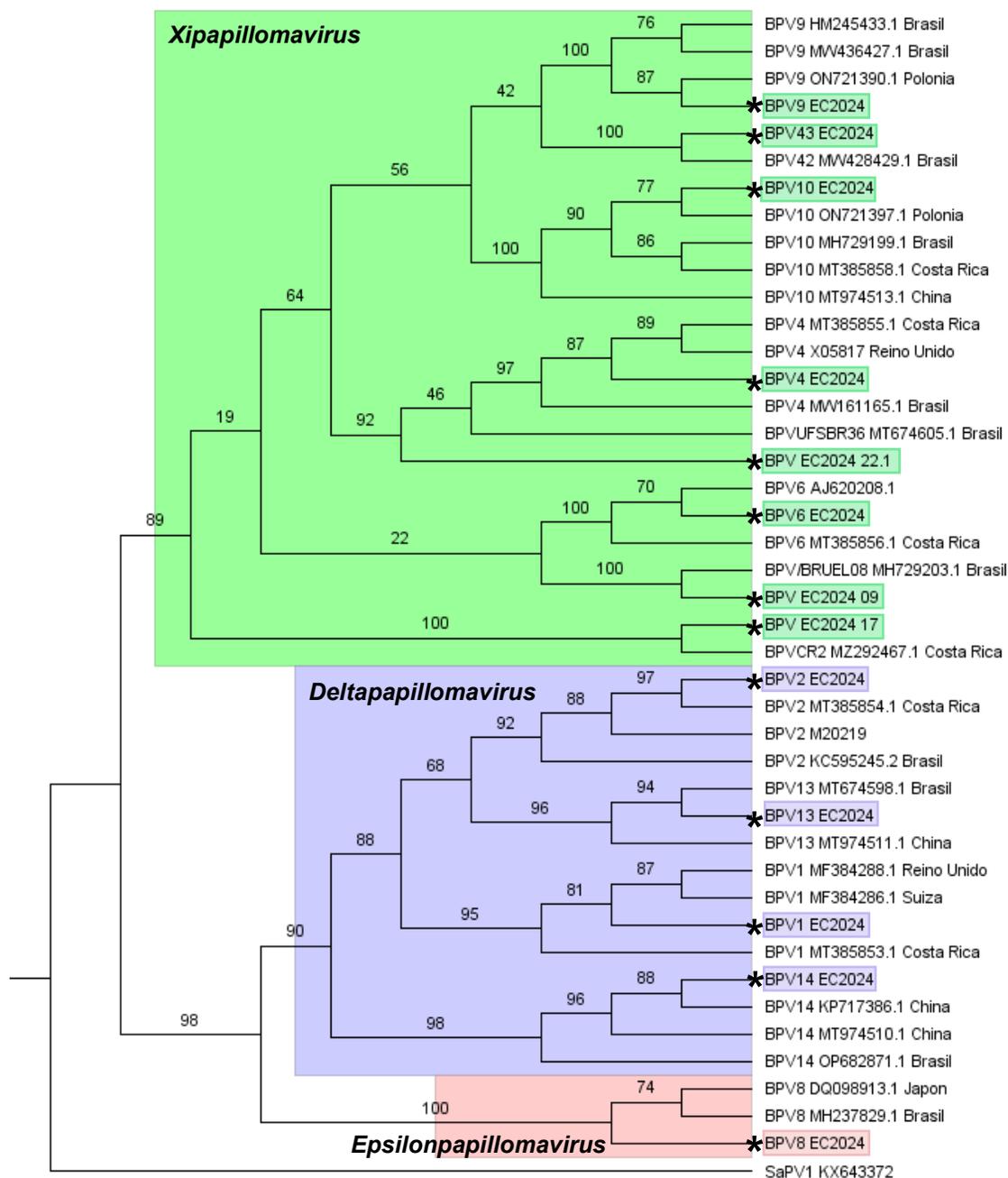
Nota: Gráfico elaborado en Excel. Fuente propia.

Análisis filogenético

El diagrama obtenido para el análisis filogenético se muestra en la **Figura 15**. Se observó la distribución de los nodos en 3 géneros: *Xipapillomavirus*, *Deltapapillomavirus* y *Epsilonpapillomavirus*. Dentro de cada género a su vez se observó la distribución por patotipos, a los cuales se presentaron valores de bootstrap altos para cada tipo encontrado en el presente estudio. Del mismo modo, cabe destacar que el nuevo tipo putativo de BPV encontrado (BPVEC2024_22.1) se agrupa dentro del género *Xipapillomavirus*, compartiendo un ancestro en común con el BPV4.

Figura 15.

Análisis filogenético realizado con los tipos de BPVs encontrados en este estudio



Nota: Árbol filogenético realizado en CIPRES v3.3 con RAxML-HPV Blackbox a través del método de máxima verosimilitud y rapid bootstrapping. (*) Se destacan los tipos virales encontrados en este estudio.

Discusiones

En el presente estudio se adquirieron diversas muestras de verrugas de bovinos en diferentes áreas de influencia de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. Los papilomas se extrajeron de diversas partes del cuerpo del bovino infectado y en algunos casos se obtuvieron varias verrugas del mismo animal (**Figura 9**). Esta parece ser una práctica común durante el muestreo para el hallazgo de los tipos de papilomavirus bovino presentes en una determinada zona, más aún si se quiere encontrar coinfecciones de distintos patotipos, pues estudios realizados por Alfaro-Mora et al., (2023), Crespo et al., (2019) y Figueirêdo et al., (2020) enfocadas en la caracterización genética de este virus, siguen procedimientos de muestreo similares. Por otro lado, se determinó que en esta zona las verrugas con forma típica de coliflor son las más comunes (**Figura 9**), lo cual es congruente con la literatura, donde se menciona que el aspecto pedunculado, seco y verrugoso, parecido al de una coliflor, es la forma característica de las verrugas en bovinos (Daudt et al., 2018; Radostits et al., 2006).

Por otra parte, respecto al análisis molecular, en este estudio se estandarizó de manera exitosa una prueba de PCR para detectar la presencia del papilomavirus en bovinos con verrugas, con una eficiencia del 91,22%. Las concentraciones de reactivos óptimas para esta reacción fueron las presentadas en la **Tabla 6**, junto con las condiciones de temperatura de la **Tabla 7**, destacando como principal resultado una temperatura de hibridación óptima de 48°C (**Figura 10**), condición que difiere de la comúnmente utilizada y reportada en otros estudios que utilizan los primers FAP59/64 para la detección del BPV, que es de 50°C (Alfaro-Mora et al., 2023; C. C. R. Carvalho et al., 2012; Figueirêdo et al., 2020). Esto se debe a que, durante una reacción de PCR, luego del paso de desnaturalización a temperaturas elevadas (95°C en este caso), la reacción debe someterse a un enfriamiento a temperaturas por debajo de la temperatura de fusión de los cebadores, por lo general de entre 50-60 °C, para lograr su hibridación a la cadena de ADN molde (Herráez, 2012, p. 203; Lodish et al., 2016, p. 241). Dado que la temperatura de fusión de los cebadores FAP59/64 está entre 60 y 66 °C (Obtenido

por la herramienta OlygoAnalyzer ® <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>), una temperatura de 48°C sería suficiente para su hibridación; además, Pyrek et al. (2023) empleó una temperatura de hibridación de 47°C para los mismos cebadores, con un porcentaje de efectividad de 37,6% del total de animales muestreados; mientras que, Lennin & Andrade (2017) emplearon una temperatura de 52°C, obteniendo 18/51 resultados positivos (35% de efectividad). Con los resultados obtenidos en el presente trabajo y en comparación con los mencionados anteriormente, se evidencia la importancia de estandarizar la técnica de PCR aun cuando las condiciones de reacción ya han sido reportadas con anterioridad. Adicionalmente, este comportamiento variable de la efectividad utilizando los cebadores FAP59/64 puede explicarse por su naturaleza degenerada, ya que, de acuerdo a la secuencia del genotipo al cual se hibrida, pueden existir variaciones en las uniones por puentes de hidrógeno, afectando a la temperatura de fusión o, en su defecto, evitando su hibridación a la secuencia molde, ocasionando baja sensibilidad; esto sumado a que fueron diseñados inicialmente para la detección del papilomavirus en humanos, podría explicar la presencia de falsos negativos en los resultados; sin embargo, es esta característica degenerada la cual permite su uso para la detección del papilomavirus en casi todas las especies infectadas (Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018; Forslund et al., 1999). Por otra parte, los resultados negativos obtenidos en la prueba de PCR, a pesar de haber medido una alta concentración de ADN mediante espectrofotometría, plantean interrogantes sobre la calidad y la funcionalidad del ADN extraído. Esta discrepancia podría sugerir la presencia de inhibidores en la muestra, así como compuestos que no se lograron eliminar completamente durante el proceso de extracción de ADN y que interfieren con la amplificación por PCR, o que el ADN se degradó durante el proceso de extracción; de igual forma, otra posibilidad es que en estas muestras no se encontraba el virus presente, debido a que posiblemente eran lesiones ya en remisión. Estas observaciones subrayan la necesidad de optimizar los protocolos de extracción del ADN para

garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos e incrementar el conocimiento sobre el ciclo que cumple el virus en las lesiones.

Por otro lado, respecto a la diversidad genotípica encontrada, en el presente trabajo se reportaron en total 13 genotipos del papilomavirus bovino presentes en 3 provincias del Ecuador (**Tabla 8**). 10 de ellos con identidad del 99 al 100% con tipos ya caracterizados, pertenecientes al género *Xipapillomavirus* (BPV4, BPV6, BPV9, BPV10 y BPV43), *Deltapapillomavirus* (BPV1, BPV2, BPV13 y BPV14) y *Epsilonpapillomavirus* (BPV8). Este hallazgo representaría el primer reporte con caracterización genotípica en el país mediante PCR-secuenciación. Anteriormente, se habían documentado los tipos BPV3, BPV6 y BPV9 en la provincia de El Oro y BPV7 en la provincia de Azuay, también en Ecuador (Lennin & Andrade, 2017), coincidiendo con este estudio en los tipos BPV6 y 9; sin embargo, la metodología empleada fue PCR-RFLP, la cual pudo haber limitado a una caracterización molecular robusta del total de muestras recolectadas. Dada la coincidencia respecto a los tipos encontrados, pertenecientes al género *Xipapillomavirus* (**Figura 15**), se sugiere que la diversidad genotípica del papilomavirus bovino en Ecuador se concentra en especies de este género; no obstante, es necesario el análisis de muestras en más provincias para confirmar esta suposición, pues está reportado que especies del género *Deltapapillomavirus* son las más prevalentes a nivel mundial y con alta distribución (Vázquez Díaz et al., 2012) lo cual coincide con la relativamente alta distribución observada del BPV2 en este estudio. Por otra parte, los 2 nuevos tipos del papilomavirus bovino aquí encontrados: BPVEC2024-09 y BPVEC2024-17, también agrupados en el género *Xipapillomavirus*, fueron recientemente caracterizados en Brasil y Costa Rica, con los nombres BPV-BR-UEL08 (MH729203.1) y BPV-CR2 (MZ292467.1), respectivamente (Alfaro-Mora et al., 2023; Crespo et al., 2019). De forma similar ocurrió con los virus BPV1_varEC2024 y BPV2_stEC2024 aquí reportados y considerados como variante del BPV1 y subtipo del BPV2 por sus claras diferencias en cuanto a su secuencia (**Figura 12**), poseen a su vez alta identidad (100%) con otros documentados en Costa Rica y Brasil (BPV1:

MT385853.1 y BPV2: MH187961.1) (Alfaro-Mora et al., 2023; Daudt et al., 2019). Estos resultados permiten dilucidar de cierto modo el fenómeno de dispersión del virus en América, posiblemente debido al movimiento de ganado bovino entre países, así como la diversidad genotípica del papilomavirus bovino relacionada a la ubicación geográfica, pues el hecho de que existan variantes y subtipos de virus reportados en países de América, evidencian cómo el virus ha evolucionado y se ha diversificado a lo largo del tiempo y espacio. En cuanto al tipo BPV-EC2024-22.1 encontrado, este no tuvo identidad mayor al 90% con otras secuencias de la base de datos NCBI; por lo que, es posible que se trate de un nuevo tipo putativo de papilomavirus bovino perteneciente al género *Xipapillomavirus*, e incluso se podría estar hablando de una nueva especie putativa, dada una identidad entre el 71 y el 89% con otras ya reportadas (77,88% con el BPV4: X05817.1; y 81,71% con el BPV-UFSBR36: MT674605.1 reportado en Brasil), cercanas a su vez a la especie *Xipapillomavirus 1* del cual pertenece el BPV4, que se agrupa en un mismo clado con esta nueva especie putativa encontrada (Figueirêdo et al., 2020; Patel et al., 1987). Dados estos descubrimientos, la secuenciación del genoma completo de los tipos reportados en este estudio es necesaria para poder establecer análisis taxonómicos más robustos que involucren distancias evolutivas, mutaciones, comparaciones entre productos génicos y patogenicidad.

La distribución de los tipos encontrados en las distintas fincas, revelaron que los PVs del género *Deltapapillomavirus* fueron los más frecuentes en este estudio (**Figura 13**). Particularmente, el BPV2 fue el más concurrente al presentarse en casi todas las zonas de muestreo, similar a los estudios realizados por Alfaro-Mora et al. (2023) y Figueirêdo et al. (2020). Este fue encontrado en varias partes del cuerpo del animal infectado, incluyendo: boca, cabeza, cara, ombligo, oreja, pecho y pierna (**Figura 14**). Según Ugochukwu et al. (2019), el BPV2 puede encontrarse en la piel de bovinos en la parte anterior y ventral del cuerpo, incluyendo la frente, lo cual concuerda con lo observado. Por otro lado, el BPV1 fue el segundo tipo con mayor distribución (**Figura 13**), encontrándose en el cuello, oreja, espalda y cara de 5

bovinos (**Figura 14**). Este es generalmente relacionado con la presencia de fibropapilomas en pene y pezones, aunque también está asociado a los papilomas cutáneos comunes (Borzacchiello & Roperto, 2008; Daudt et al., 2019). El BPV13 aquí reportado, fue el de mayor ocurrencia, pero únicamente presente en la finca 2 (**Figura 13**), en varias partes del cuerpo de 6 animales, predominando el cuello; mientras que, el BPV14 también del género *Deltapapillomavirus* (**Figura 15**), se encontró en menor proporción (4% del total de las muestras) en el cuello y espalda de un ejemplar (**Figura 13** y **Figura 14**). Al igual que los otros miembros del género *Deltapapillomavirus* los BPV13 y BPV14 son responsables de la generación de fibropapilomas cutáneos, aunque también han sido relacionados con carcinomas en el tejido urotelial (Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018). En particular, los BPV1 y BPV2 son mencionados como los tipos de PVs que se identifican con mayor frecuencia, asociados principalmente a neoplasias benignas y malignas en la vejiga urinaria, que a su vez son las causantes del cáncer en esta zona (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019) y por su lado los BPV13 y BPV14 también han sido encontrados en tumores de la vejiga urinaria de bovinos (Roperto, Munday, et al., 2016; Roperto, Russo, et al., 2016). Este hallazgo subraya la importancia de la vigilancia continua en las fincas con estos patotipos, siendo necesaria la búsqueda en estas zonas de papilomatosis en genitales, más aún en el caso particular de la muestra F420_181023 tomada de la finca 4 en Ibarra, pues algunos animales de la zona presentaban hematuria. Ante esto, es recomendable la aplicación de medidas preventivas para impedir este tipo de afecciones, como el evitar la presencia de helechos en la zona de pastoreo, pues está bien reportada la relación de su consumo con la evolución de las verrugas a neoplasias malignas en la vejiga, esto por contener químicos mutagénicos e inmunosupresores (Araldi et al., 2017; Campo, 2002; Daudt et al., 2018; Ugochukwu et al., 2019).

A pesar de que el género *Deltapapillomavirus* fue el que tuvo mayor distribución, la mayoría de los tipos virales encontrados pertenecieron al género *Xipapillomavirus*: BPV4,

BPV6, BPV9, BPV10, BPV43, los nuevos tipos BPV/BR-UJEL08, BPV-CR2 y el nuevo tipo putativo BPVEC2024_22.1 (**Figura 15**). El BPV4 en este estudio se halló en el miembro posterior derecho de un animal (**Figura 14**), contrario a lo reportado en la literatura, pues este tipo viral es caracterizado por ocasionar papilomas en la mucosa del esófago, estómago, intestino delgado e incluso la vejiga urinaria, lesiones que a su vez pueden empeorarse por la ingesta de helechos, generando cáncer (Araldi et al., 2017; Ugochukwu et al., 2019). Cercano en la escala evolutiva se encontró al nuevo tipo putativo BPVEC2024_22.1 (**Figura 15**) el cual se halló en el cuello de un animal formando una neoplasia cutánea (**Figura 14**); esto podría sugerir que posee relación con las mismas patologías del BPV4, sin embargo, más investigaciones respecto al genoma de este virus son necesarias para analizar su patogenicidad. Los BPV6 y 10 se hallaron en la ubre (**Figura 14**) conforme a la literatura (Ugochukwu et al., 2019), igual que el nuevo tipo putativo BPV-CR2 descrito en Costa Rica (Alfaro-Mora et al., 2023) relacionado en el mismo clado con el BPV6; no obstante, los BPV9 y 43 también asociados a esta ubicación anatómica, se encontraron en lugares diferentes (boca y nariz, respectivamente, **Figura 14**) (Hatama et al., 2008). Curiosamente el tipo BPV/BR-UJEL08 descrito en Brasil (Crespo et al., 2019) se halló en la piel del muslo de un animal, mientras que en el presente estudio se localizó en la oreja (**Figura 14**), sugiriendo que este nuevo tipo putativo es común del epitelio sin predisposición a un lugar en específico. Cabe señalar la inherente preocupación de encontrar el BPV6 y otros representantes del género *Xipapillomavirus* en las distintas fincas objetos de estudio, pues, aunque sea considerado un género de bajo riesgo (Daudt et al., 2018), su estrecha relación con la papilomatosis en ubres y pezones puede resultar un problema al volver susceptible al animal de contraer una infección bacteriana y, por ende, adquirir mastitis.

Por último, el único representante del género *Epsilonpapillomavirus* encontrado en este estudio fue el BPV8, localizado en la finca 8 (**Figura 13**). Curiosamente, en este lugar también se hallaron patotipos representantes del género *Deltapapillomavirus*, siendo interesante por su

relación evolutiva, ya que el análisis filogenético realizado sugiere que ambos géneros provienen de un mismo ancestro en común. El BPV8 ha sido relacionado con papilomas cutáneos benignos, de ahí que se haya encontrado en la cola y cuello de un animal (Daudt et al., 2018). Aunque su hallazgo no es de relevancia en cuanto a su patogenicidad, debido a que no se relaciona con papilomas malignos, su presencia revela la relación geográfica existente entre los tipos de PVs.

Las coinfecciones de diferentes BPVs es un hecho ampliamente reportado en diferentes investigaciones (Daudt et al., 2018). En este estudio se reportaron 6 coinfecciones de varios tipos virales del BPV en un mismo bovino y una posible coinfección de más de un virus en el mismo papiloma, dada la presencia de bandas claras en el gel de agarosa, pero con ruido excesivo en el electroferograma (**Figura 11.**) hecho que Pyrek et al., (2023) atribuye a una posible coinfección. Para este caso particular, la técnica PCR-secuenciación utilizada en este estudio se ve limitada para poder confirmar estos hallazgos; sin embargo, metodologías como PCR-RFLP han demostrado ser eficientes cuando se necesita identificar los tipos virales presentes en la coinfección (Kawauchi et al., 2015); así mismo, la clonación dentro de un plásmido del ADN obtenido seguido de la secuenciación de los clones obtenidos, funciona como una alternativa (Grindatto et al., 2015). A pesar de que una muestra también exhibió ruido en el electroferograma, a juzgar por la banda en el gel de agarosa y la altura de los picos observados (**Figura 11** y **Anexo 2**), se podría atribuir el ruido a una baja concentración en el producto de PCR, lo cual pudo ocurrir a su vez por una baja concentración de ADN luego de la extracción (<10 ng/uL **Anexo 1.**) Por otro lado, respecto a las coinfecciones en el mismo bovino, en este estudio se reportaron los casos: (1) BPV2+BPV13, (2) BPV9+BPV2, (3) BPV/BR-UJEL08+BPV-CR2, (4) BPV2+BPV6+BPV10, (5) BPV43+BPVEC2024_22.1+BPV-CR2 y (6) BPV14+BPV1+BPV2 (**Tabla 9**). De estos, los casos (1), (2) y (4) han sido previamente reportados (C. C. R. Carvalho et al., 2012; Daudt et al., 2018); mientras que los casos (3), (5) y (6) son nuevos reportes de coinfecciones en bovinos. Respecto a estos, es importante recalcar

que en todos los casos las coinfecciones ocurren con tipos virales agrupados en el mismo género, lo cual resulta preocupante en aquellos donde se encuentran los tipos asociados a patologías graves, como el caso (6) que contiene los tipos virales considerados de alto riesgo en el ganado bovino (Daudt et al., 2018). A pesar de que las coinfecciones encontradas en este estudio no se observaron en casos de neoplasias malignas, los resultados de Sauthier et al., (2021) sugieren que las coinfecciones deben considerarse en las transformaciones neoplásicas y papilomatosis, más cuando está bien conocido que coinfecciones en el HPV pueden ser un factor para el aumento de la carcinogénesis (Carrillo-García et al., 2014; Chaturvedi et al., 2011; Senapati et al., 2017), lo que refuerza los estudios en el BPV para tener un panorama más amplio del HPV y su oncogénesis.

El análisis respecto a la apariencia macroscópica de la verruga obtenida y el tipo viral presente, reveló que, dependiendo del lugar en el que se extraiga la muestra es posible encontrar un tipo determinado de BPV (**Figura 14**). No obstante, parece ser que la predisposición del BPV viene dada por el tipo de tejido epitelial (mucoso o cutáneo). Inicialmente, los BPVs 1 – 6 habían estado bien caracterizados de forma micro y macroscópica, de modo que se asociaba al BPV1 con fibropapilomas en pezones y pene, así como las verrugas comunes en la parte frontal, cuello y lomo junto con el BPV2; a este último también se lo asociaba con fibropapilomas con forma de coliflor común en zonas anogenital, abdominal ventral y, por supuesto, vejiga urinaria (Radostits et al., 2006). Lo anterior concuerda de cierto modo con lo observado, pues el BPV1 y BPV2 se hallaron en varias partes del cuerpo del animal, en su mayoría cuello y cabeza; sin embargo, debido a que la verruga de coliflor común puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, sería difícil determinar el tipo viral únicamente por una observación macroscópica, por lo que se cree que sería necesario obtener el mismo número de muestras de cada parte del cuerpo para un análisis más robusto. Del mismo modo, el BPV4 que es fuertemente relacionado a papilomas del tracto gastrointestinal superior y respiratorio (Radostits et al., 2006), en este estudio se lo halló en la el miembro posterior de un

ejemplar, por lo que sería necesario obtener más muestras y de esas zonas anatómicas mencionadas, para así corroborar lo reportado. En el caso del BPV6, este es asociado a papilomas en ubre y pezones, algo que sí se observó en este estudio, aunque también se lo halló en el cuello, ombligo y oreja (Radostits et al., 2006). Daudt et al., (2018) menciona que a pesar de los esfuerzos por obtener un mapeo general de la hipotética predisposición del BPV por infectar una parte específica del cuerpo del bovino, los estudios parecen demostrar que la infección más bien está guiada por su tropismo a los epitelios cutáneos o mucosos, aumentando su posibilidad cuando existe mayor abrasión en el sitio sin restricción a alguna zona anatómica del cuerpo del bovino (p.10).

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Este estudio representa la primera identificación y caracterización molecular del virus del papiloma bovino (BPV) en Ecuador. Se reportaron por primera vez las secuencias parciales del gen L1 de 13 tipos virales del BPV en el país, obtenidos de fincas ubicadas en áreas de influencia de la UFA-ESPE. En estas zonas, los tipos virales con mayor distribución pertenecieron al género *Deltapapillomavirus* y los *Xipapillomavirus* presentaron mayor diversidad genotípica. Adicionalmente, en esta investigación se reportaron 2 nuevos tipos virales y 2 variantes del BPV provenientes de Brasil y Costa Rica, así como una nueva especie putativa del BPV (BPVEC2024_22.1) perteneciente al género *Xipapillomavirus*. Aunque la mayor parte de los papilomas recolectados se trataban de neoplasias benignas, se hallaron tipos virales considerados de alto riesgo por estar relacionados con patologías graves, como el cáncer de vejiga urinaria, mastitis o carcinoma del tracto gastrointestinal; así mismo, se hallaron coinfecciones que involucraron tanto tipos virales nuevos como ya reportados, así como una posible coinfección presente en una misma lesión.

Se identificaron 8 fincas con bovinos con papilomatosis, de las cuales se recolectaron verrugas de varias partes del cuerpo. La observación y registro fotográfico mostraron que, en su mayoría, las lesiones consistieron en neoplasias con forma de coliflor con un tamaño aproximado de 0,8 cm. La diversidad genotípica encontrada se reportó en la finca ubicada a las afueras de la parroquia "Luz de América", mientras que el nuevo tipo putativo encontrado se recolectó de un bovino proveniente de una finca ubicada en el cantón "El Carmen".

A lo largo de esta investigación, se aplicó la técnica de extracción directa de ADN basada en la lisis celular y adhesión del ácido nucleico a una matriz de dióxido de silicio, la cual fue suficiente para realizar los análisis moleculares posteriores. En particular, se estandarizó con alta eficiencia una prueba de PCR para la amplificación parcial del gen L1 del BPV, que permitió la posterior secuenciación de los productos mediante la tecnología Sanger.

Finalmente, los análisis bioinformáticos realizados, permitieron identificar y caracterizar los tipos virales: BPV1, BPV2, BPV4, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV13, BPV14, BPV43, BPV/BR-UJEL08 (Brasil), BPV-CR2 (Costa Rica) y BPVEC2024_22.1 (Ecuador). El árbol filogenético obtenido a su vez logró dilucidar la relación taxonómica existente entre todos los tipos virales encontrados, mostrando que, en Ecuador, existen los géneros *Xipapillomavirus*, *Deltapapillomavirus* y *Epsilonpapillomavirus* del BPV.

Recomendaciones

Respecto al muestreo, para un análisis más robusto en investigaciones posteriores, se recomienda la recolección de más factores que contribuyan al estudio sobre la caracterización del virus y las lesiones que genera. Por ejemplo, el tomar datos sobre la raza, edad o alimentación de los animales objeto de estudio, suman variables estadísticas para determinar posibles factores de riesgo asociados a la papilomatosis bovina. Del mismo modo, el conteo del número de lesiones encontradas por cada animal o establecer un número constante de lesiones por región anatómica del cuerpo, ayudaría a una mejor caracterización macroscópica de la enfermedad. Por último, también es recomendable ampliar el muestreo a otras zonas geográficas del país, lo que ayudaría a descubrir la diversidad genotípica a nivel nacional.

Por otro lado, respecto a las técnicas moleculares utilizadas, en estudios posteriores se recomienda probar técnicas de diagnóstico que permitan descubrir los tipos virales presentes en un mismo papiloma, como la técnica de PCR-RFLP, así como métodos que brinden características adicionales sobre la infección, como análisis histológicos para determinar la histopatología de los virus encontrados, y así determinar una descripción tanto micro como macroscópica.

El estudio presentado brinda la secuencia parcial del gen L1 de una nueva especie putativa del papilomavirus bovino, así como 2 variantes y tipos previamente caracterizados. En lo posterior, se recomienda continuar con el análisis molecular de estos tipos virales, enfocados tanto en la secuenciación completa del gen L1 como la secuenciación del genoma completo o parte de él,

para así corroborar que se trate de una especie de BPV nueva, determinar los productos génicos que intervienen en el proceso de infección y también para estudiar las relaciones filogenéticas con los demás tipos de BPV y descubrir el proceso evolutivo involucrado.

Referencias

- Alfaro-Mora, R., Castro-Vásquez, R., Zobba, R., Antuofermo, E., Burrari, G. Pietro, Alberti, A., & Dolz, G. (2023). Molecular typing of bovine papillomaviruses in Costa Rica. *Veterinary Research Communications*, 47(1), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09918-3>
- Araldi, R. P., Assaf, S. M. R., Carvalho, R. F. de, Carvalho, M. A. C. R. de, Souza, J. M. de, Magnelli, R. F., Módolo, D. G., Roperto, F. P., Stocco, R. de C., & Beçak, W. (2017). Papillomaviruses: a systematic review. *Genetics and Molecular Biology*, 40(1), 1–21. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0128>
- Borzacchiello, G., & Roperto, F. (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research*, 39(5), 45. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008022>
- Campo, M. S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research*, 89(2), 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00193-4)
- Carrillo-García, A., Ponce-de-León-Rosales, S., Cantú-de-León, D., Fragoso-Ontiveros, V., Martínez-Ramírez, I., Orozco-Colín, A., Mohar, A., & Lizano, M. (2014). Impact of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 134(3), 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.06.018>
- Carvalho, C. C. R., Batista, M. V. A., Silva, M. A. R., Balbino, V. Q., & Freitas, A. C. (2012). Detection of Bovine Papillomavirus Types, Co-Infection and a Putative New BPV11 Subtype in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(5), 441–447. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01296.x>
- Carvalho, R. F., Sakata, S. T., Giovanni, D. N. S., Mori, E., Brandão, P. E., Richtzenhain, L. J., Pozzi, C. R., Arcaro, J. R. P., Miranda, M. S., Mazzuchelli-De-Souza, J., Melo, T. C., Comenale, G., Assaf, S. L. M. R., Beçak, W., & Stocco, R. C. (2013). Bovine Papillomavirus in Brazil: Detection of Coinfection of Unusual Types by a PCR-RFLP Method. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/270898>

- Chaturvedi, A. K., Katki, H. A., Hildesheim, A., Rodríguez, A. C., Quint, W., Schiffman, M., Van Doorn, L.-J., Porras, C., Wacholder, S., Gonzalez, P., Sherman, M. E., & Herrero, R. (2011). Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(7), 910–920. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq139>
- Cox, R. A. (1968). [103a] *The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids* (pp. 120–129). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)12123-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)12123-X)
- Crespo, S. E. I., Lunardi, M., Otonel, R. A. A., Headley, S. A., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2019). Genetic characterization of a putative new type of bovine papillomavirus in the Xipapillomavirus 1 species in a Brazilian dairy herd. *Virus Genes*, 55(5), 682–687. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01694-8>
- Daudt, C., da Silva, F. R. C., Cibulski, S. P., Streck, A. F., Laurie, R. E., Munday, J. S., & Canal, C. W. (2019). Bovine papillomavirus 24: a novel member of the genus Xipapillomavirus detected in the Amazon region. *Archives of Virology*, 164(2), 637–641. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4092-3>
- Daudt, C., Da Silva, F. R. C., Lunardi, M., Alves, C. B. D. T., Weber, M. N., Cibulski, S. P., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., & Canal, C. W. (2018). Papillomaviruses in ruminants: An update. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5), 1381–1395. <https://doi.org/10.1111/tbed.12868>
- Figueirêdo, R. P., Santos, G. F., Oliveira, L. B., Santos, L. A. B. O., Barreto, D. M., Cândido, A. L., Campos, A. C., Azevedo, E. O., & Batista, M. V. A. (2020). High Genotypic Diversity, Putative New Types and Intra-Genotype Variants of Bovine Papillomavirus in Northeast Brazil. *Pathogens*, 9(9), 748. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090748>
- Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Stenquist, B., & Göran Hansson, B. (1999). A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for

- analysis of cutaneous tumours and normal skin. *Journal of General Virology*, 80(9), 2437–2443. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2437>
- Grindatto, A., Ferraro, G., Varello, K., Crescio, M. I., Miceli, I., Bozzetta, E., Gorla, M., & Nappi, R. (2015). Molecular and histological characterization of bovine papillomavirus in North West Italy. *Veterinary Microbiology*, 180(1–2), 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.001>
- Hatama, S., Nobumoto, K., & Kanno, T. (2008). Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology*, 89(1), 158–163. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83334-0>
- Herráez, A. (2012). *Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. (2nd ed.). Elsevier.
- Kawauchi, K., Takahashi, C., Ishihara, R., & Hatama, S. (2015). Development of a novel PCR-RFLP assay for improved detection and typing of bovine papillomaviruses. *Journal of Virological Methods*, 218, 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.005>
- Lennin, S., & Andrade, O. (2017, marzo 12). Detección Y genotipificación molecular del virus de papiloma bovino en lesiones de animales afectados por papilomatosis cutánea. *Centrosur*.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. (2016). *Molecular cell biology* (8th ed.). W.H. Freeman.
- Lunardi, M., Alcindo, A., Alejandro, R., & Fernandes, A. (2013). Bovine Papillomaviruses — Taxonomy and Genetic Features. En *Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56195>
- Munday, J. S. (2014). Bovine and Human Papillomaviruses. *Veterinary Pathology*, 51(6), 1063–1075. <https://doi.org/10.1177/0300985814537837>
- National Institute of Allergy & Infectious Diseases. (2023, noviembre 21). *The papillomavirus episteme*. Reference genomes for Animal papillomavirus - BPV. https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/animal_genomes

- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I., & Shirasawa, H. (2004). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *Journal of General Virology*, *85*(8), 2191–2197.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.80086-0>
- Özmen, G., & Kale, M. (2023). Searching bovine papillomavirus presence in lesions seen on teats of cows. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *43*. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-7150>
- Patel, K. R., Smith, K. T., & Campo, M. S. (1987). The Nucleotide Sequence and Genome Organization of Bovine Papillomavirus Type 4. *Journal of General Virology*, *68*(8), 2117–2128. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-8-2117>
- Pyrek, P., Bednarski, M., Popiel, J., Siedlecka, M., & Karwańska, M. (2023). Genetic Evaluation of Bovine Papillomavirus Types Associated with Teat Papillomatosis in Polish Dairy Cattle with the Report of a New Putative Type. *Pathogens*, *12*(11), 1278.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12111278>
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses*. (10th ed.). Elsevier.
- Roperto, S., Munday, J. S., Corrado, F., Gorla, M., & Roperto, F. (2016). Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Veterinary Microbiology*, *190*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.007>
- Roperto, S., Russo, V., Leonardi, L., Martano, M., Corrado, F., Riccardi, M. G., & Roperto, F. (2016). Bovine Papillomavirus Type 13 Expression in the Urothelial Bladder Tumours of Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, *63*(6), 628–634.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12322>
- Sauthier, J. T., Daudt, C., da Silva, F. R. C., Alves, C. D. B. T., Mayer, F. Q., Bianchi, R. M., Driemeier, D., Streit, R. S. A., Staats, C. C., Canal, C. W., & Weber, M. N. (2021). The

- genetic diversity of “papillomavirome” in bovine teat papilloma lesions. *Animal Microbiome*, 3(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00114-3>
- Senapati, R., Nayak, B., Kar, S. K., & Dwibedi, B. (2017). HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes. *PLOS ONE*, 12(11), e0187844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187844>
- Shi, B., Shin, Y. K., Hassanali, A. A., & Singer, S. J. (2015). DNA Binding to the Silica Surface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(34), 11030–11040. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01983>
- Ugochukwu, I. C. I., Aneke, C. I., Idoko, I. S., Sani, N. A., Amoche, A. J., Mshiela, W. P., Ede, R. E., Ibrahim, N. D. G., Njoku, C. I. O., & Sackey, A. K. B. (2019). Bovine papilloma: aetiology, pathology, immunology, disease status, diagnosis, control, prevention and treatment: a review. *Comparative Clinical Pathology*, 28(3), 737–745. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2785-3>
- Vázquez Díaz, R., Escudero Duch, C., Doménech Gómez, A., Gómez-Lucía Duato, E., & Benítez Rico, L. (2012). Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2). https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2012.v6.n2.41086
- Villagómez, M. (2020). *ELABORACIÓN Y APLICACIÓN DE AUTO-HISTOVACUNA CONTRA PAPILOMATOSIS EN BOVINOS*. [Medicina Veterinaria]. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2016). *Molecular biology of the gen* (B. Wilbur, Ed.; 7th ed.). Pearson.
- Wosiacki, S. R., Barreiro, M. A. B., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2005). 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*, 126(1–2), 215–219.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.021>