

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
ESPE - SEDE SANTO DOMINGO  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de integración curricular  
**Caracterización molecular del  
papilomavirus bovino**  
En áreas de influencia de la UFA-ESPE

Alumno: Diego Joel Carvajal Reina  
Tutor: Armando Reyna Bello. PhD

# Índice de contenido

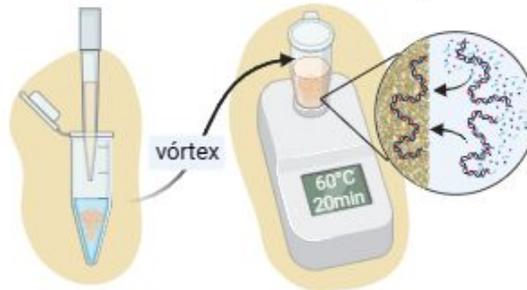
01

Introducción



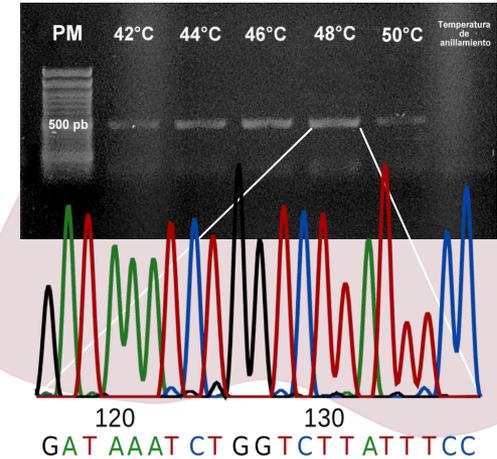
02

Metodología



03

Resultados



04

Conclusiones

# Introducción

## Papilomatosis

- Enfermedad ocasionada por el papilomavirus
  - Familia *Papillomaviridae*
- Afecta a la mayoría de vertebrados
  - Ocasiona “Verrugas” o “papilomas”

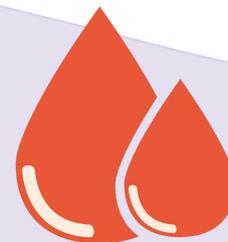
### Virus del papiloma bovino (BPV)

- Es el más estudiado por ocasionar enfermedades de relevancia veterinaria, arraigadas a problemas de higiene, infecciones, dolor, dificultad de ordeño y la muerte

**Importantes pérdidas económicas si no se tiene un control y manejo adecuado**



Mastitis



Hematuria

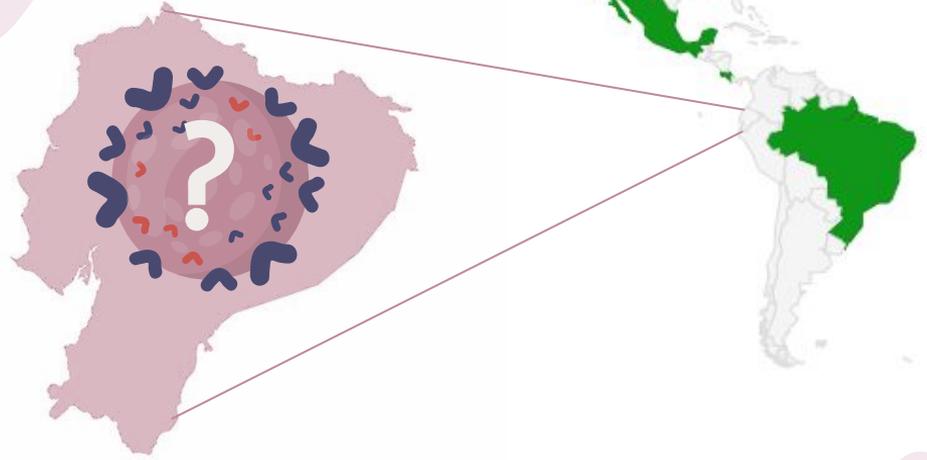


Cáncer

# Introducción

## Distribución

- Es cosmopolita
- Prevalente en Asia, Europa y África
- América → México, Costa Rica y Brasil
  - 60% estimado del ganado bovino
  - Infecciones asintomáticas
- Ausencia de estudios epidemiológicos sobre su distribución y prevalencia real del BPV → Dificulta la búsqueda de soluciones
- En Ecuador es un tema aún sin explorar



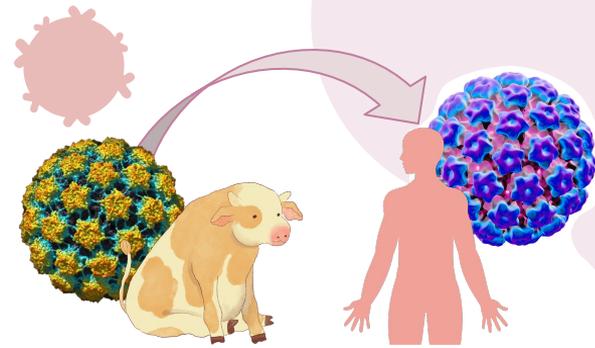
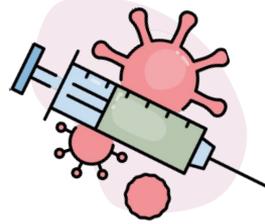
**Limitada información sobre la prevalencia y características genómicas en zonas de alta productividad**



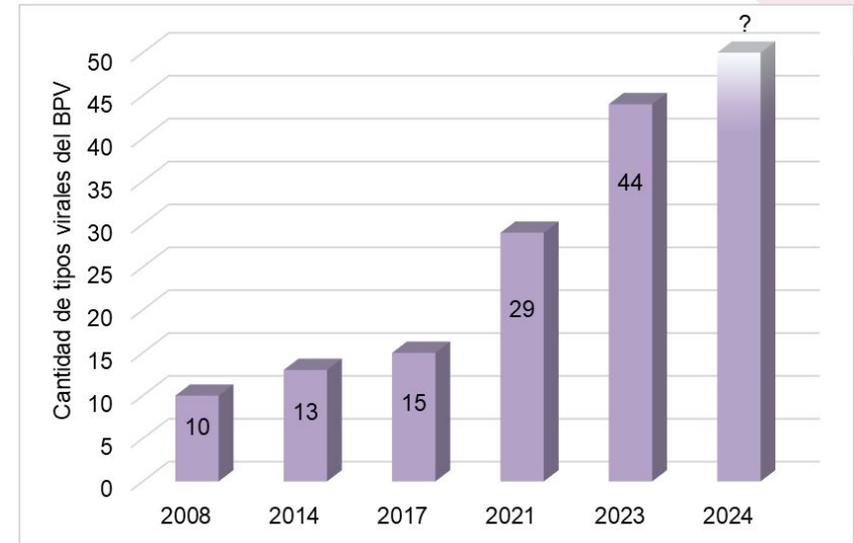
# Introducción

## Justificación

- Los tratamientos actuales no son eficientes y el mejor método de prevención es la inmunización
  - No existe una vacuna comercial
- BPV ayuda a entender el VPH
  - Comparten características morfológicas y patogénicas
  - Entendimiento de la biología y oncogénesis
- Posee alta diversidad taxonómica
  - 44 tipos virales del BPV hasta la actualidad



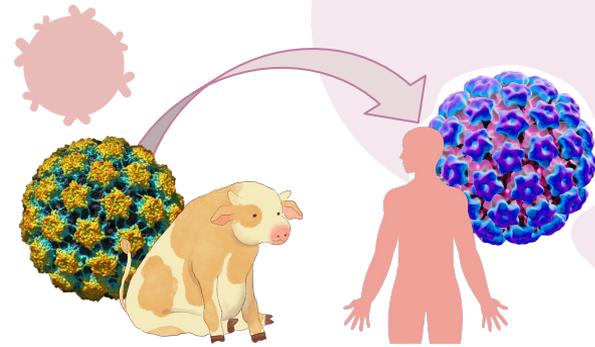
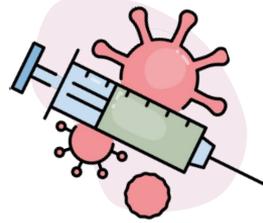
**Figura 1.** Tipos de BPVs en el tiempo



Nota: Datos de Borzacchiello & Roperto (2008); Munday (2014); Araldi et al. (2017); Sauthier et a. (2021)

# Introducción

## Justificación



- Los tratamientos actuales no son eficientes y el mejor método de prevención es la inmunización
  - No existe una vacuna comercial
- BPV ayuda a entender el VPH
  - Comparten características morfológicas y patogénicas
  - Entendimiento de la biología y oncogénesis
- Posee alta diversidad taxonómica
  - 44 tipos virales del BPV hasta la actualidad

- Estudios de la diversidad y prevalencia del BPV son necesarios para nuevos métodos terapéuticos
  - Inmunidad es especie-específica
- Caracterizar molecularmente los tipos de BPV en Ecuador sentaría las bases para la investigación de vacunas

# Objetivos

## Objetivo general

- Caracterizar molecularmente el virus del papiloma bovino en áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo

## Objetivos específicos

- Identificar en la zona fincas con bovinos con papilomatosis, para realizar muestreos y registro fotográfico
- Realizar la extracción de ADN de las muestras para su análisis mediante PCR-secuenciación
- Elaborar árboles filogenéticos para la identificación y caracterización molecular del virus

# Fundamento teórico

## Estructura viral

- ADN genómico de 8000 pb
- Cadena codificante:

### Expresión temprana (E)

E1, E2, E3 y E4  
Oncoproteínas E5, E6 y E7

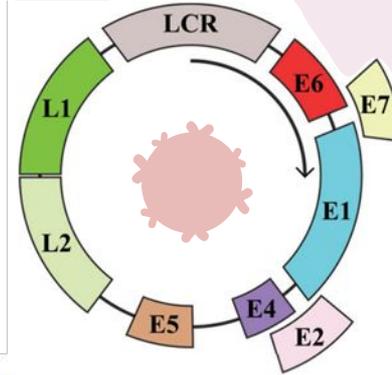
### Expresión tardía (L)

L1 y L2

- Región Larga de Control (LCR):

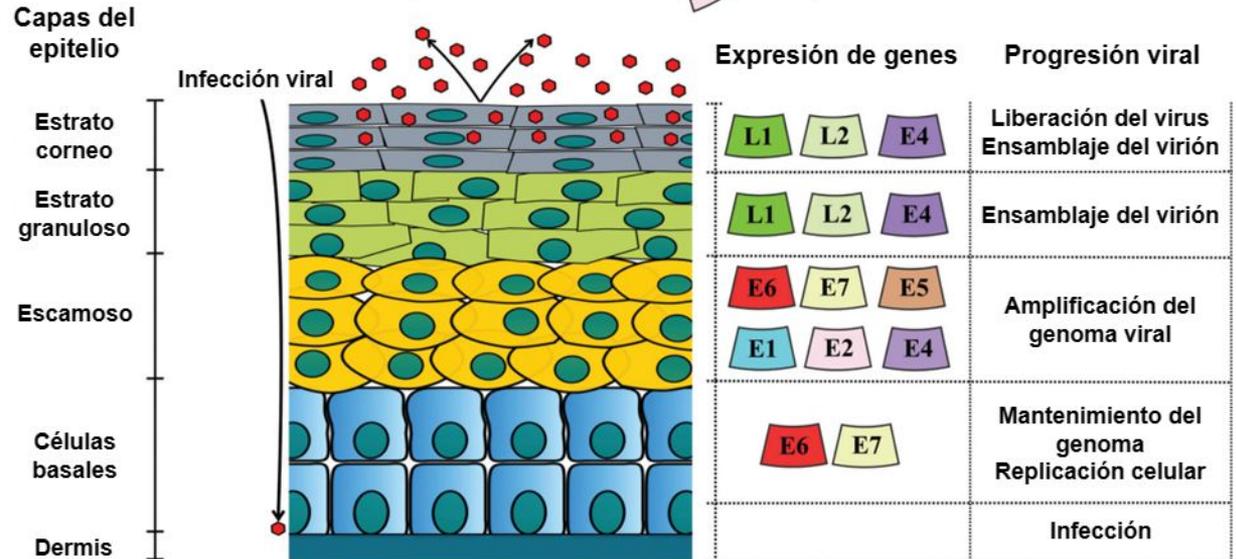
Ori y elementos de transcripción

**Figura 2.**  
*Estructura viral de los papilomavirus*



### Nota:

Modificado de Araldi et al., (2017)



# Fundamento teórico

## Taxonomía

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

Género	Especie	Tipo
<i>Xipapillomavirus</i>	<i>Xipapillomavirus 1</i>	BPV3, BPV4, BPV6, BPV9, BPV10, BPV11, BPV15
	<i>Xipapillomavirus 2</i>	BPV12
	No identificado	BPV17, BPV20, BPV23, BPV24, BPV26, BPV28, BPV29
<i>Deltapapillomavirus</i>	<i>Deltapapillomavirus 4</i>	BPV1, BPV2, BPV13, BPV14
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	<i>Epsilonpapillomavirus 1</i>	BPV5, BPV8
	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	BPV25
<i>Dyoxipapillomavirus</i>	<i>Dyoxipapillomavirus 1</i>	BPV7
<i>Dyokappapapillomavirus</i>	<i>Dyokappapapillomavirus</i>	BPV16, BPV18, BPV22
No identificado	No identificado	BPV19, BPV21, BPV27, BPV30 – 44.

**Nota:** Nota: Datos obtenidos de PaVe (Papillomavirus Episteme) (National Institute of Allergy & Infectious Diseases, 2023).

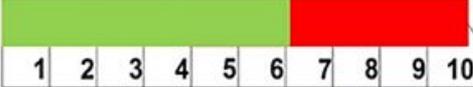
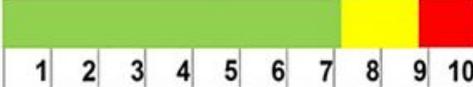
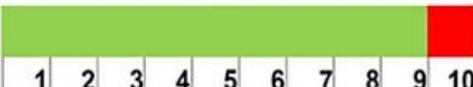
# Fundamento teórico

## Taxonomía

El análisis de los tipos de BPV se logra por amplificación y secuenciación del gen L1 altamente conservado

Al compararse entre sí, exhibe un porcentaje de diferencia que determina la categoría

**Tabla 2.** Categorías taxonómicas basadas en la secuencia del gen L1

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

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

# Fundamento teórico

## Transmisión

Directa o indirecta por contacto con superficies contaminadas

## Diagnóstico

Examinación clínica

## Identificación

Técnicas moleculares

Southern blot, Inmunohistoquímica, Hibridación cromogénica in situ (CISH), microscopía electrónica y PCR

PCR con primers degenerados o específicos seguida de secuenciación es la más utilizada (**PCR-secuenciación**)

Primers degenerados FAP59/64 para el gen L1



# Metodología

Identificación y caracterización molecular del BPV a través de la técnica de PCR-secuenciación con los primers FAP59/64

1

**Muestreo** aleatorio en diferentes fincas de las áreas de influencia de la ESPE

2

**Extracción de ADN** por unión a una matriz de dióxido de silicio

3

Estandarización de una **PCR** para el gen L1, mediante un gradiente en la temperatura de hibridación

4

Productos fueron **secuenciados** por Sanger



GAT AAAT CT GGTCCTATTTC

5

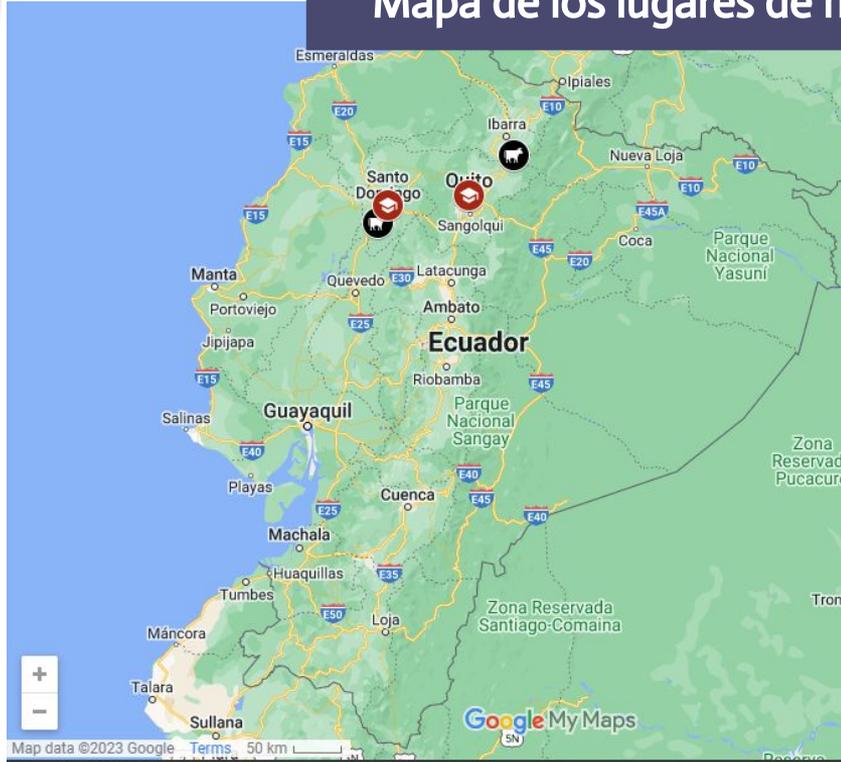
Elaboración de un árbol filogenético por **Bioinformática**



## Procedimiento

# Procedimiento

## Mapa de los lugares de muestreo y experimentación



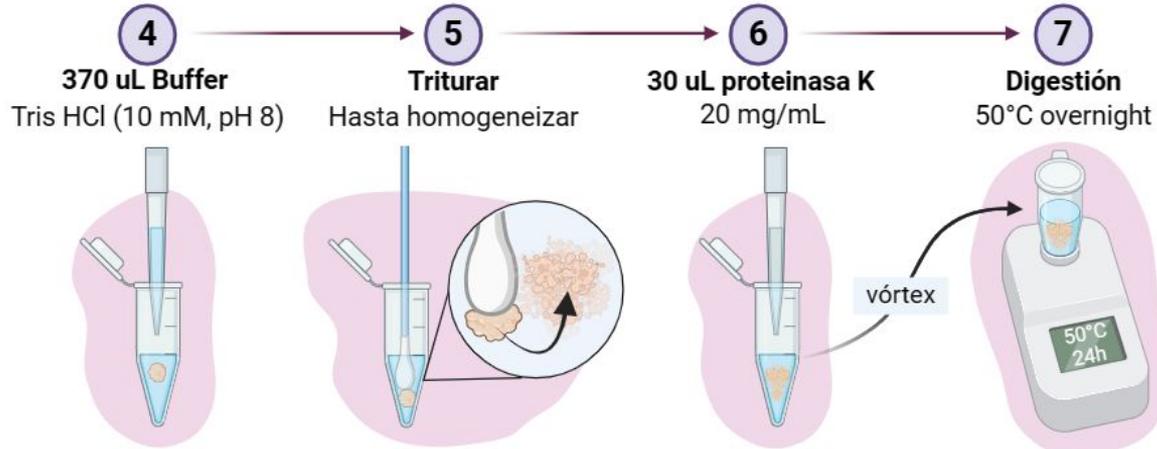


# Extracción de ADN

## Pretratamiento

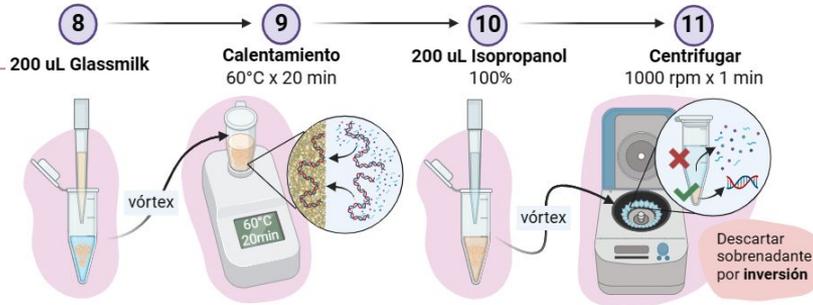


## Digestión

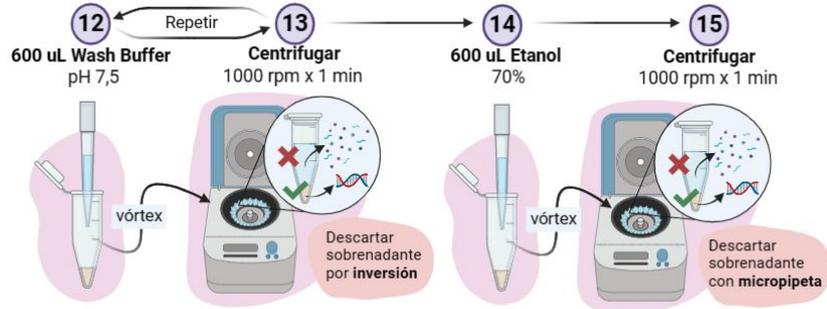


## Extracción de ADN

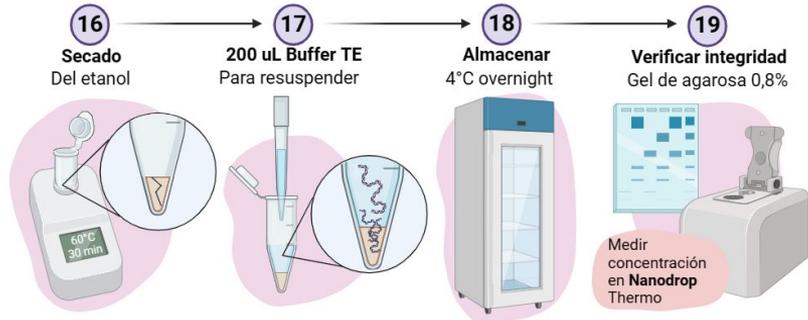
### Extracción



### Lavado



### Resuspensión



Glassmilk

Guanidina - HCl 6M

Urea 10 mM

Tris-HCl 10 mM

Triton X-100 20%

Dióxido de silicio

# Procedimiento

## Estandarización de la PCR

Se estandarizó una PCR mediante gradientes de temperatura en el proceso de hibridación

**Tabla 3.** Reactivos empleados para la PCR de BPV

Reactivos	Unidad	Stock	Volumen	Volumen mezcla
Agua libre de nucleasas	uL	N/A	14,75	Volumen * número de muestras
Buffer	10x	10	2,50	
Mg <sup>2+</sup>	mM	25	3,00	
FAP 59 (Forward)	uM	10	1,00	
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 4.** Condiciones de reacción para la PCR de BPV

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 ®.

# Procedimiento

## Secuenciación y análisis filogenético

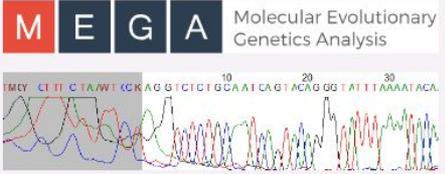
Se secuenciaron en **un sentido** todos los productos de PCR obtenidos y en **doble sentido** las secuencias que representaron el mismo tipo viral

*ucla*

Análisis filogenético

**MEGAX**  
Limpieza de secuencias

**M E G A** Molecular Evolutionary Genetics Analysis



10 20 30  
T M C Y C I T T C T A W W T C K R A G G T C T C T G G A A T C A G T A C A G G G T A T T T A A A A T A C A L

**BLAST**  
NCBI | PaVe

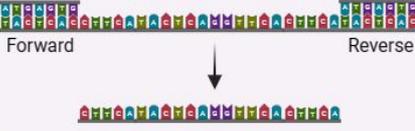


**Nucleotide BLAST**  
nucleotide → nucleotide



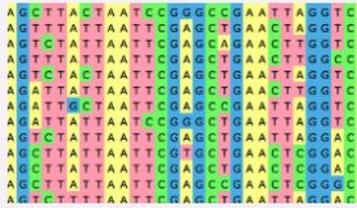
**PaVE**

**Alineamiento de Primers en MEGAX**



Forward Reverse

**Alineamiento con secuencias de la base de datos**



**MUSCLE NJ method**

**Curado en Gblocks**



Alineamiento.phy

**CIPRES**  
Análisis filogenético



**RAxML-BlackBox**  
Métodos:  
Maxima verosimilitud  
Rapid Bootstrapping

# Resultados y discusiones

## Muestreo

- Se recolectaron 57 muestras de 30 bovinos en 8 fincas
  - Papilomas: 1 de 9, 2 de 15 y 3 de 6

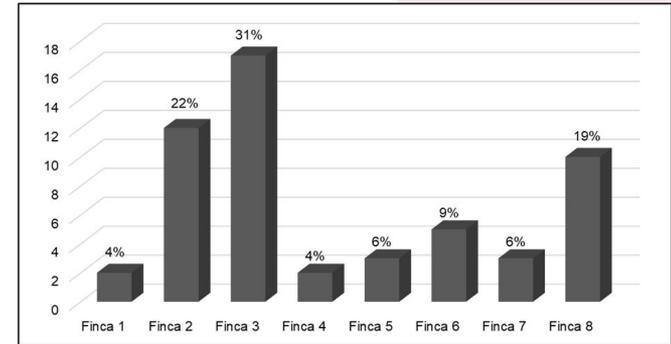
Práctica común para la caracterización genética y hallar coinfecciones (Alfaro-Mora et al., 2023; Crespo et al., 2019; Figueirêdo et al., 2020)

- Tamaño promedio de 0,8 cm con morfología típica de coliflor (35,1%)

El aspecto pedunculado y seco, parecido al de una coliflor, es la forma característica de verrugas en bovinos (Daudt et al., 2018; Radostits et al., 2006)

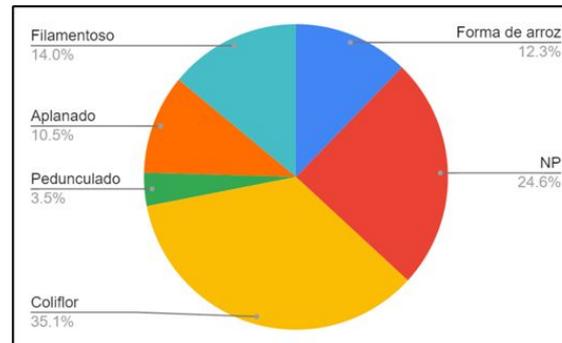
Figura 3.

Recuento del número de muestras recolectadas por finca



**Nota:** Gráfico realizado en Excel. Fuente propia.

Figura 4. Diagramas de pastel de la morfología observada y registro fotográfico.

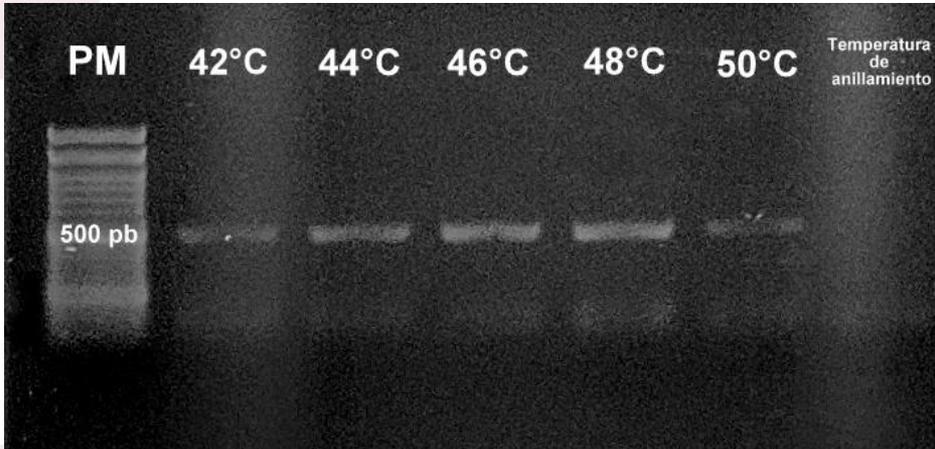


**Nota:** NP = No Proporcionado. Registro de la muestra: F205\_310823 (Forma de coliflor, extraído del cuello)

# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

**Figura 5**  
*PCR de VPB 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 de 100 pb.

Se estandarizó exitosamente una prueba de PCR para la detección del BPV, con una eficiencia del **91,22%**

Se obtuvo una temperatura de hibridación óptima de **48°C**

Comúnmente es de **50°C** para primers FAP59/64 (Alfaro Mora et al., 2023; C. C. R. Carvalho et al., 2012; Figueirêdo et al., 2020)

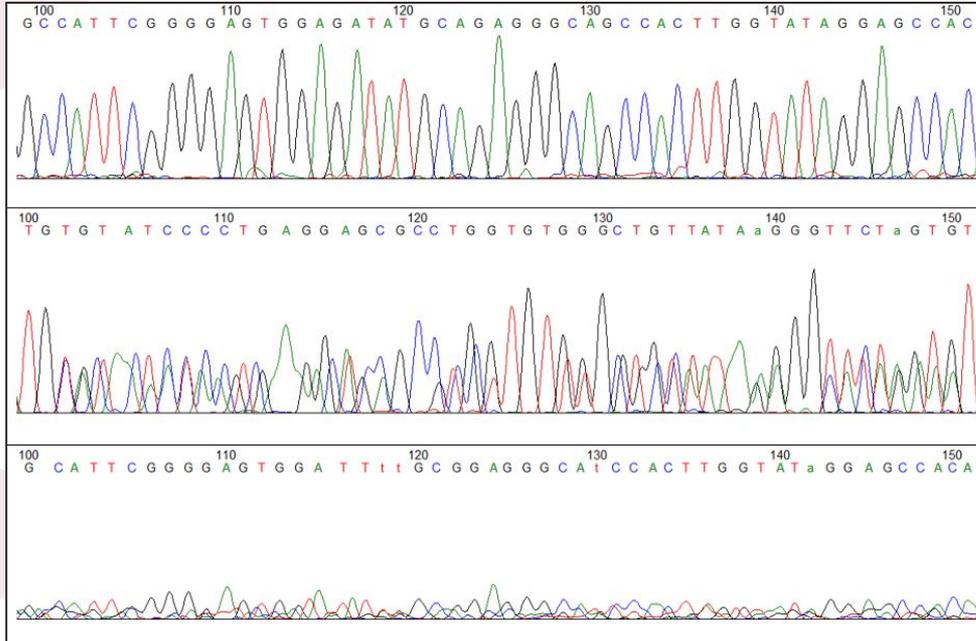
<b>Temperatura</b>	48°C	47°C	52°C
<b>Eficiencia</b>	91,22%	37,6%	35%
<b>Fuente</b>	Presente estudio	Pyrek et al. (2023)	Lennin & Andrade. (2017)

# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

Figura 6.

*Electroferogramas de algunos amplicones obtenidos*



Tras la secuenciación en sentido hacia adelante de los amplicones de cada muestra positiva, se obtuvieron **47 electroferogramas limpios** y **2 con ruido**

Luego del análisis en BLAST, se encontraron 13 tipos de BPVs diferentes.

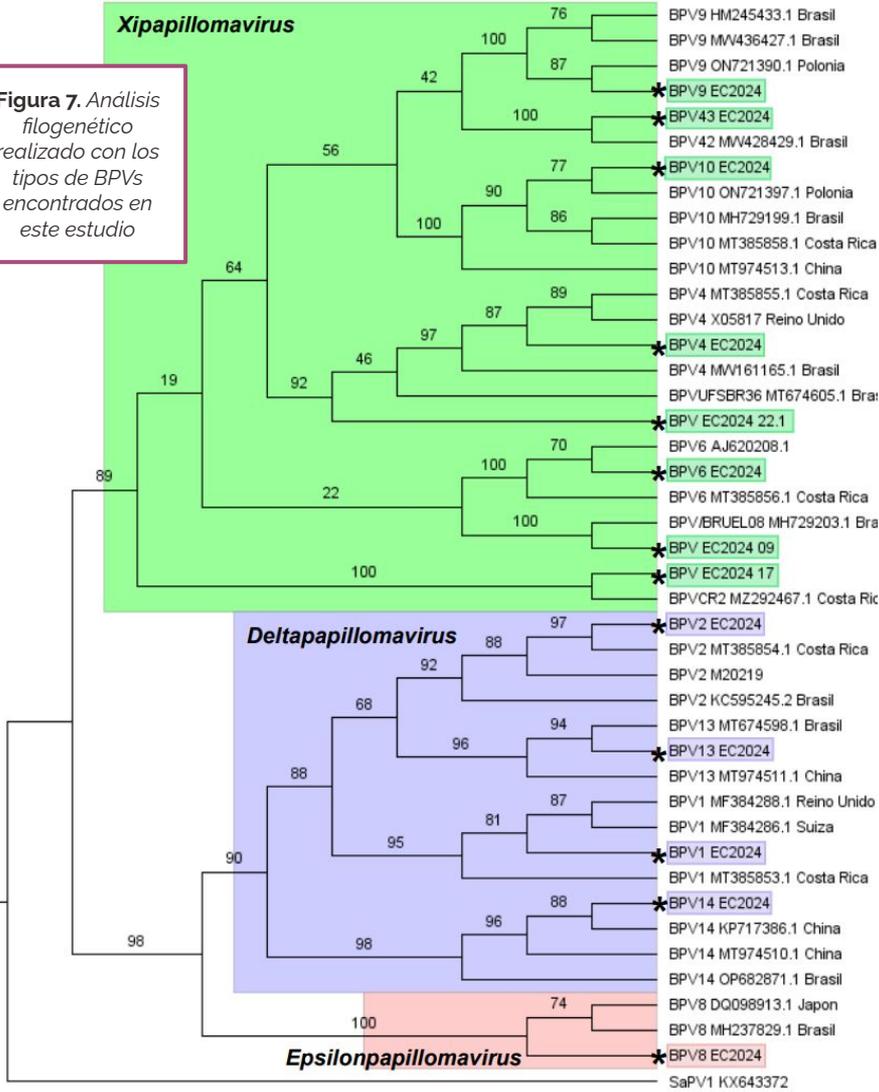
**Nota:** De arriba hacia abajo, se muestran los electroferogramas de las muestras F311.2\_061023 sin ruido y F312.1\_061023, F308\_061023, con ruido. Secuencias observadas en MEGAX. Fuente propia.

**Tabla 5.***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-UELo8 (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 7.** Análisis filogenético realizado con los tipos de BPVs encontrados en este estudio



# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

Se reportaron 13 genotipos de BPV en 2 provincias del Ecuador

10 con identidad del 99 - 100% (Tabla 5)

*Xipapillomavirus* (BPV4, 6, 9, 10 y 43)

*Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, 13 y 14)

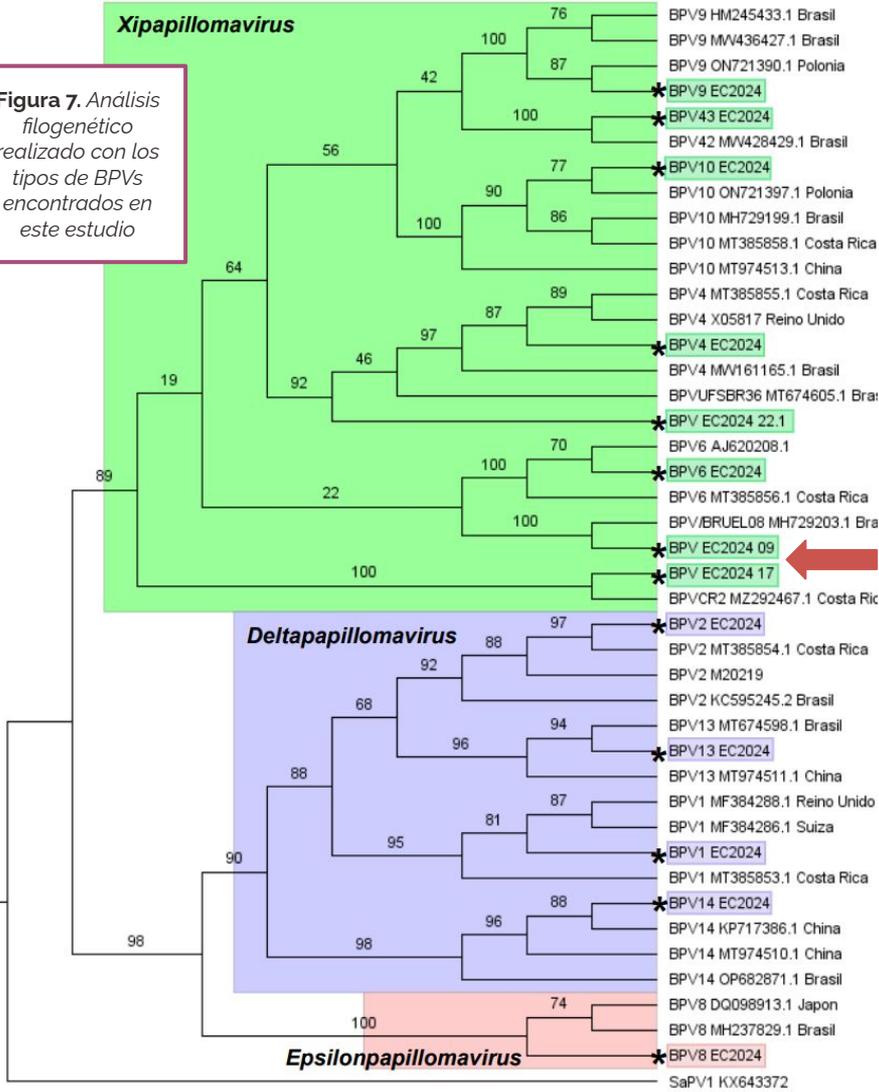
*Epsilonpapillomavirus* (BPV8)

BPV3, BPV6 y BPVg en El Oro y BPV7 en Azuay por PCR-RFLP (Lennin & Andrade, 2017)

¿*Xipapillomavirus* el género de mayor prevalencia?

Los *Deltapapillomavirus* son los más prevalentes y con alta distribución (Vásquez Díaz et al., 2012)

**Figura 7.** Análisis filogenético realizado con los tipos de BPVs encontrados en este estudio



# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

Se reportaron 13 genotipos de BPV en 2 provincias del Ecuador

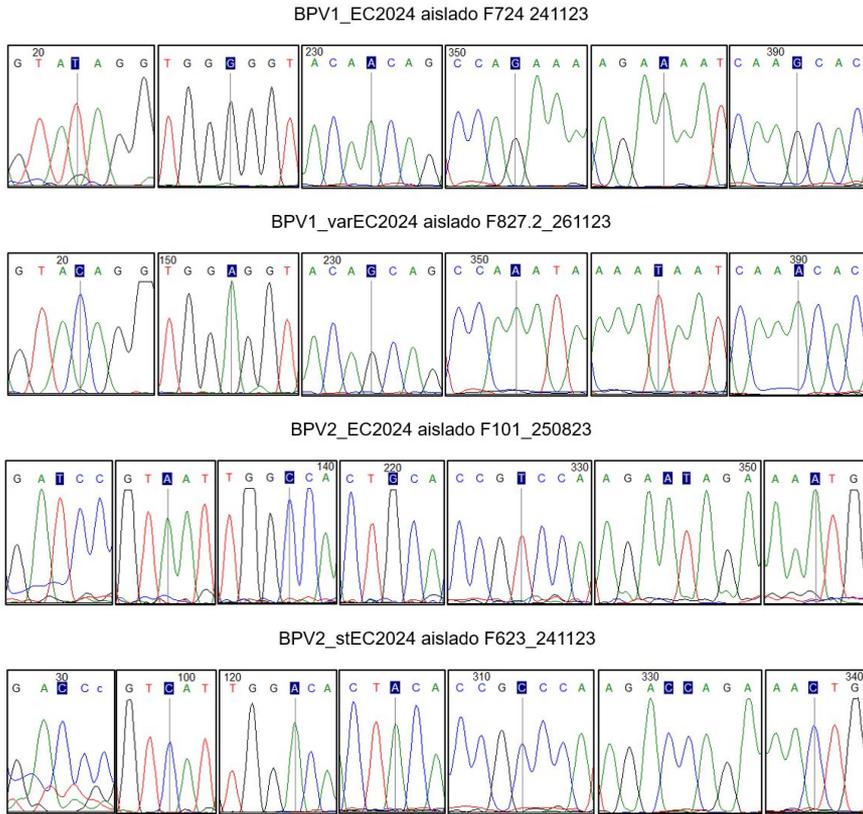
10 con identidad del 99 - 100% (Tabla 5)

2 Nuevos tipos virales

Nombre	Tipo viral de referencia			
	NCBI	Id(%)	PaVe	Id(%)
BPVEC2024_09	BPV-BR-UEL08 (MH729203.1)	99,77	BPV40 (MW428425.1)	78,27
BPVEC2024_17	BPV-CR2 (MZ292467.1)	100	BVP12 (JF834523)	86,4

BPV-BR-UEL08 en Brasil (Crespo et al., 2019)  
BPV-CR2 en Costa Rica (Alfaro-Mora et al., 2023)

**Figura 8.** Electroferogramas de la variante y subtipo de papilomavirus bovino encontrados



# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

Se reportaron 13 genotipos de BPV en 2 provincias del Ecuador

1 Variante y 1 subtipo

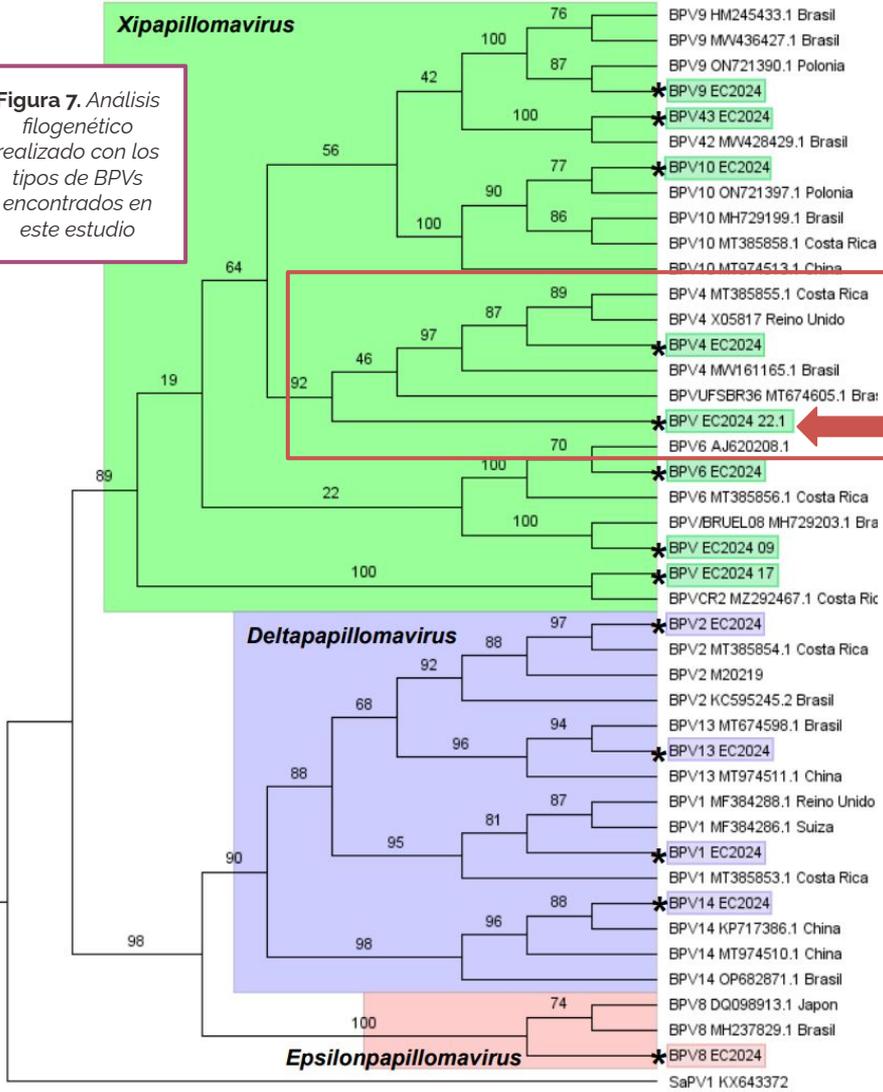
Variante del BPV1 y subtipo del BPV2 por las diferencias claras en sus secuencias

Nombre	Tipo viral de referencia			
	NCBI	Id (%)	PaVe	Id(%)
BPV1_EC2024	BPV1 (MT385853.1)	100	BPV1 (X02346)	99.3
BPV1_varEC2024	BPV1 (MF384288.1)	99,77	BPV1 (X02346)	98,4
BPV2_EC2024	BPV2 (LC426022.1)	100	BPV2 (M20219)	99.3
BPV2_stEC2024	BPV2 (MH187961.1)	100	BPV2 (M20219)	97,6

**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.

## Xipapillomavirus

Figura 7. Análisis filogenético realizado con los tipos de BPVs encontrados en este estudio



## Deltapapillomavirus

## Epsilonpapillomavirus

# Resultados y discusiones

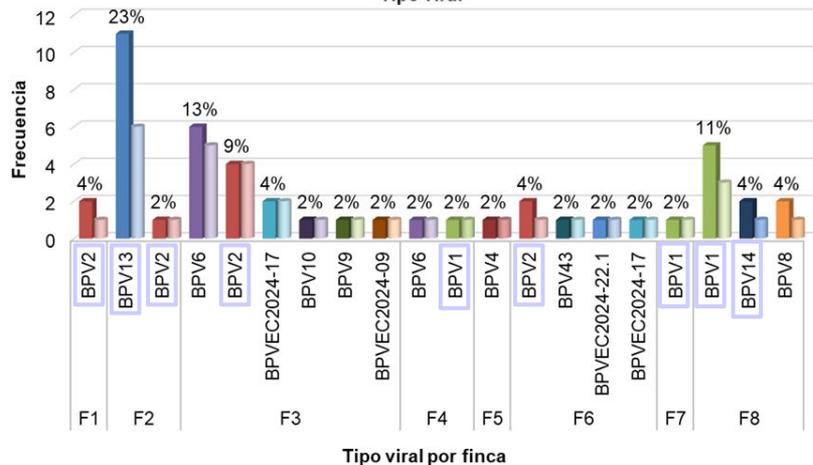
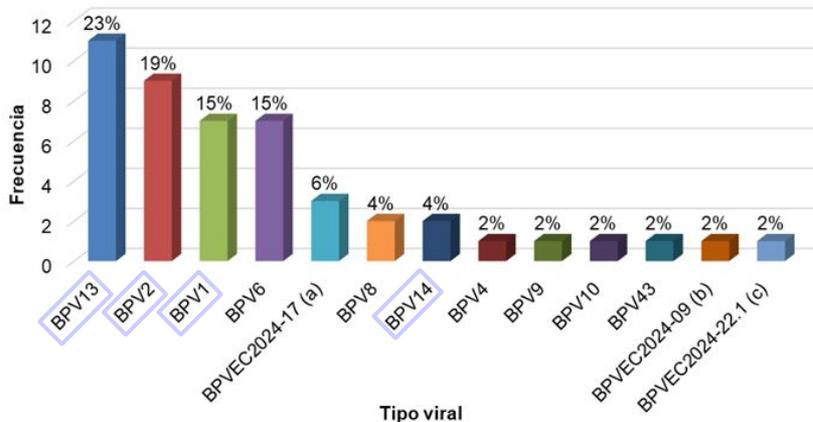
## Análisis molecular

Nueva especie putativa

Nombre	Tipo viral de referencia			
	NCBI	Id(%)	PaVe	Id(%)
BPVEC2024_22.1 aislado F622.1_241123	BPV-UFSBR36 (MT674605.1)	81,71	BPV4 (X05817.1)	77,88

- Id 71% - 89%
- Cercana a la especie *Xipapillomavirus 1*
  - BPV4
  - Agrupados en un mismo clado
- Es necesaria la secuenciación completa
  - Distancias evolutivas, mutaciones, comparaciones entre productos génicos y patogenicidad

**Figura 9.** Diversidad de patotipos del papilomavirus bovino identificados



**Nota:** Frecuencia de los tipos de BPVs encontrados.

# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

*Deltapapillomavirus* fueron los más frecuentes en todas las fincas

BPV2 fue el más concurrente

(Alfaro-Mora et al., 2023; Figueirêdo et al., 2020)

BPV1 el segundo con mayor distribución

BPV13 tuvo alta concurrencia en la Finca 2

BPV14 se encontró en menor proporción

Se identifican con mayor frecuencia

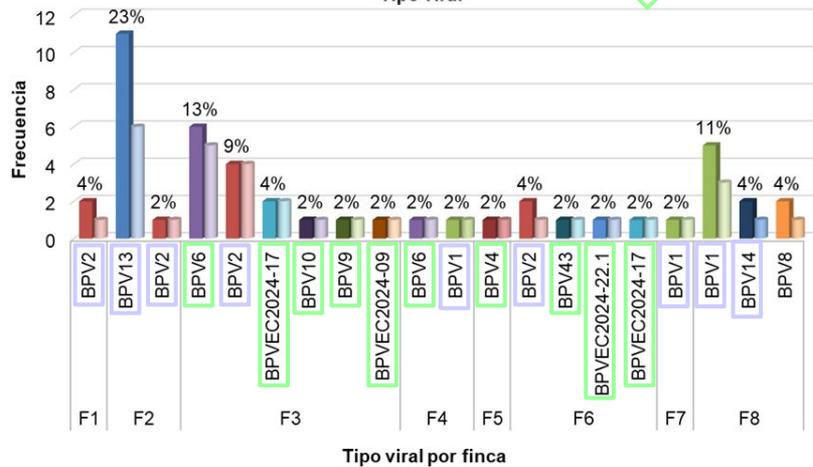
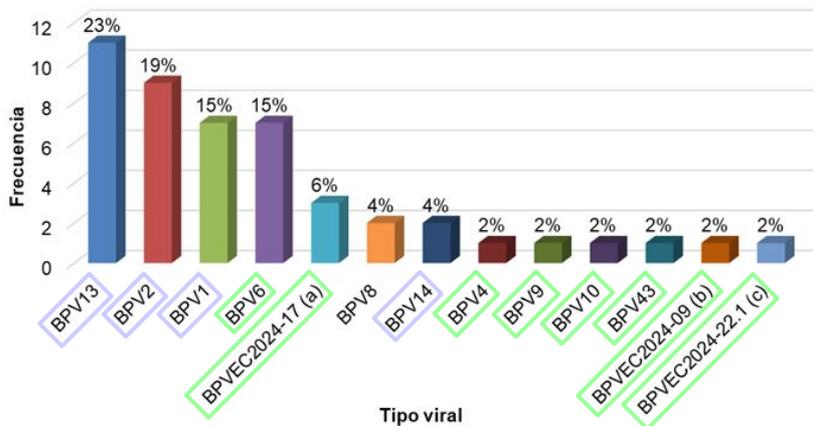
Son tipos virales asociados a neoplasias benignas y malignas de la vejiga urinaria

Es necesaria la vigilancia continua en fincas con estos patotipos e implementar medidas preventivas

Evitar la presencia de helechos → Químicos mutagénicos que empeoran las lesiones

(Araldi et al., 2017; Campo, 2002; Daudt et al., 2018; Ugochukwu et al., 2019; Roberto, Munday, et al., 2016; Roberto, Russo, et al., 2016)

**Figura 9.** Diversidad de patotipos del papilomavirus bovino identificados



**Nota:** Frecuencia de los tipos de BPVs encontrados.

# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

*Xipapillomavirus* tuvieron mayor diversidad genotípica

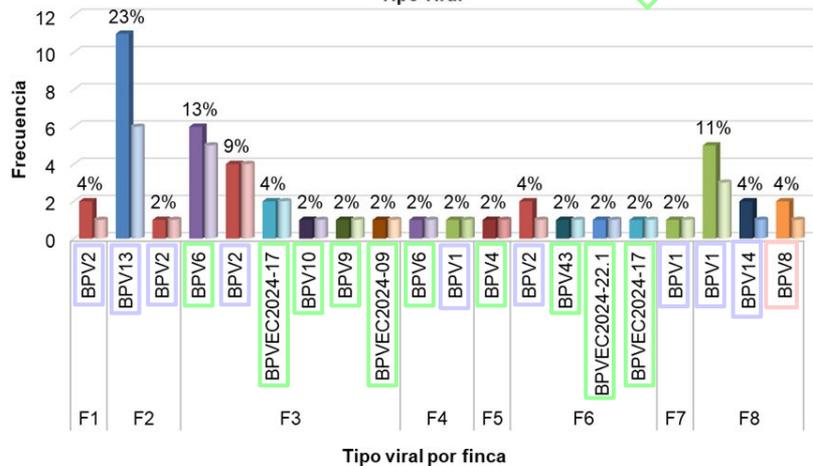
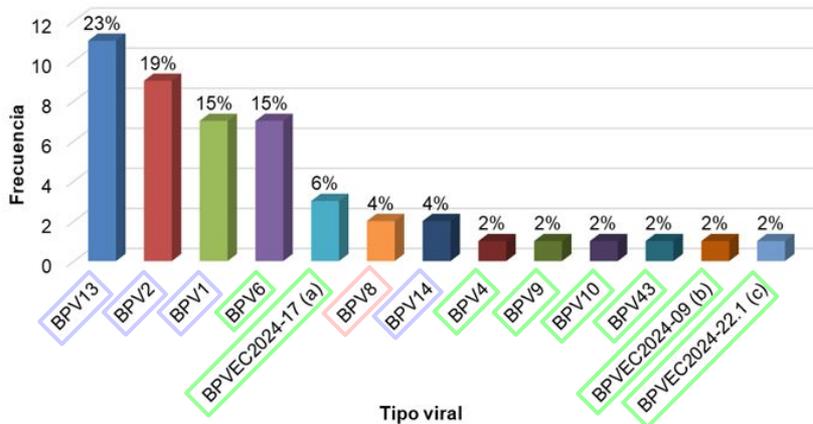
- BPV4, BPV6, BPV9, BPV10, BPV43
- Nuevos tipos BPV/BR-UeLo8 y BPC-CR2
- Nuevo tipo putativo BPVEC2024\_22.1

Aunque son considerados de bajo riesgo (Daudt et al., 2018) están relacionados con papilomatosis en ubres y pezones

BPV4 genera papilomatosis en el tracto gastrointestinal

(Araldi et al., 2017; Daudt et al., 2018; Ugochukwu et al., 2019)

**Figura 9.** Diversidad de patotipos del papilomavirus bovino identificados

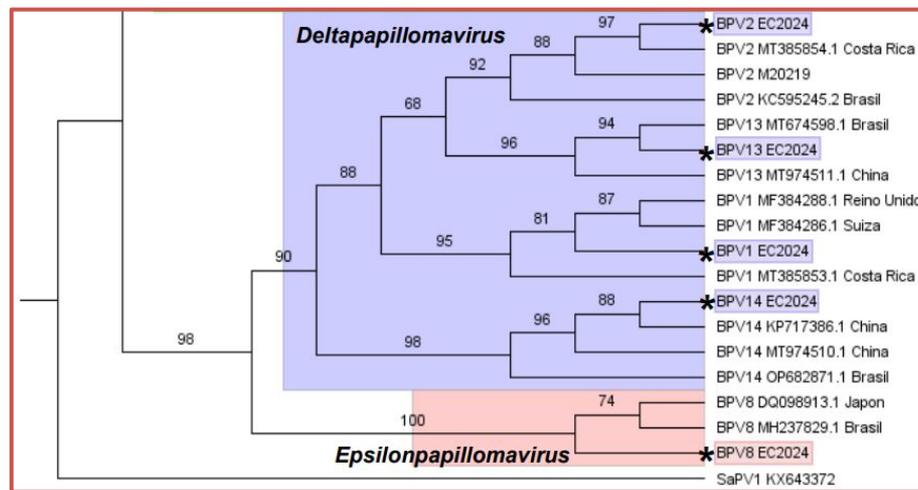


**Nota:** Frecuencia de los tipos de BPVs encontrados.

# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

### Epsilonpapillomavirus



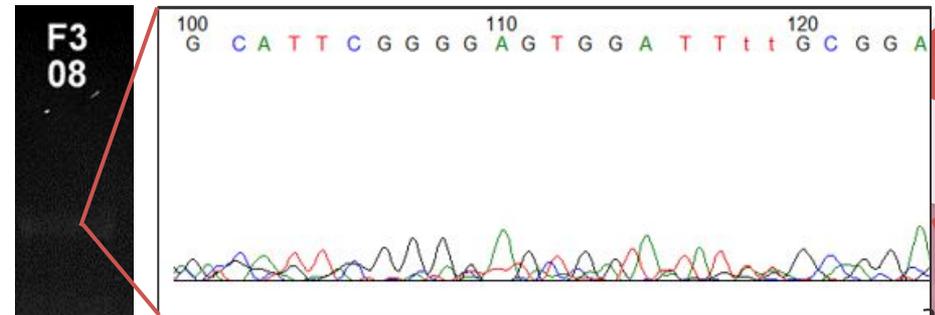
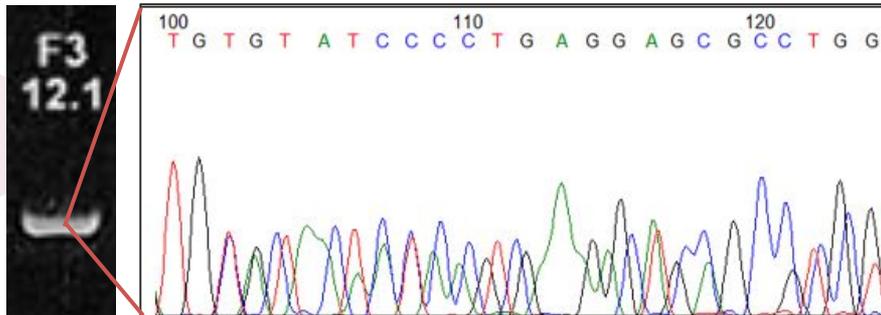
No se relaciona con papilomas malignos (Daudt et al., 2018)

Relación geográfica existente

# Resultados y discusiones

## Análisis molecular

- 6 coinfecciones de varios BPVs en un bovino
- 1 posible coinfección en un mismo papiloma
- La técnica empleada en este estudio (PCR-secuenciación) es una limitante
  - PCR-RFLP han sido eficientes para identificar tipos virales en coinfecciones (Kawauchi et al., 2015)
  - Clonación en plásmido y secuenciación (Grindatto et al., 2015)



# Conclusiones

- Este estudio representa la primera caracterización molecular del BPV en Ecuador
  - Reporte de las secuencias parciales del gen L1 de 13 tipos virales del BPV
  - *Deltapapillomavirus* tuvo mayor distribución
  - *Xipapillomavirus* presentó mayor diversidad genotípica
  - Reporte de 2 nuevos tipos virales y 2 variantes de Brasil y Costa Rica
  - Reporte de una nueva especie putativa del BPV (BPVEC2024\_22.1) del genero *Xipapillomavirus*
- Se hallaron tipos virales de alto riesgo por relacionarse con patologías graves
- Se hallaron coinfecciones que involucraron tipos virales nuevos como ya reportados y una posible coinfección en un mismo papiloma
- La técnica de extracción de ADN fue suficiente para los análisis moleculares. Así mismo, la aplicación de un gradiente de temperatura permitió estandarizar de forma exitosa una prueba de PCR para la detección del BPV.
- La secuenciación y el análisis bioinformático aplicado, permitió identificar los tipos virales: BPV1, BVP2, BPV4, BPV6, BPV8, BPV9, BVP10, BPV13, BPV14, BPV43, BPV/BR-UELo8, BPV-CR2 y BPVEC2024\_22.1
- Los géneros del BPV existentes en la zona fueron: *Xipapillomavirus*, *Deltapapillomavirus* y *Epsilonpapillomavirus*.

## Recomendaciones

- Recolección de más datos para determinar posibles factores de riesgo asociados a la papillomatosis
- Ampliar la zona de muestreo a más provincias del país.
- Probar técnicas de diagnóstico para descubrir tipos virales presentes en un mismo papiloma, como PCR-RFLP
- Continuar con el análisis molecular de los tipos virales encontrados, enfocados en la secuenciación completa del gen L1 como la secuenciación del genoma completo

## Agradecimientos

Dr. Armando Reyna (ESPE)

Ing. Fausto Bedoya (ESPE)

Dr. Jacobus De Waard (UDLA)

Ing. Yanua Ledesma (UDLA)

Ing. Salomé Guerrero (UDLA)

Ing. Jimmy Jumbo

Ing. Mateo Botero

Familiares y amigos

# Bibliografía

- 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)
- 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., 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>

# Bibliografía

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>

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*.

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](https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/animal_genomes)

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>

# Bibliografía

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., & Benitez 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](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.

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>

# Anexos

N°	Código	Foto	Finca	Coordenadas	Morfología	Parte del cuerpo	Tamaño (cm)	ADN (ng/uL)
1	F101_250823	Si	1	-0,453003, -79,301004	Forma de arroz	Boca	0,7	84,1
2	F101.1_250823	No	1	-0,453003, -79,301004	NP	Pierna	NP	30,2
3	F202_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cara	1	30,7
4	F202.1_310823	No	2	-0,279649, -79,309033	NP	NP	NP	17,2
5	F203_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cuello	1,2	246,7
6	F203.1_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Pierna	0,5	30,4
7	<u>F204_310823</u>	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cabeza	0,7	70
8	F204.1_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cuello	0,6	21,2
9	F205_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cuello	1,3	82,3
10	F205.1_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cadera	0,9	55
11	F206_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cabeza	2,4	20,8
12	F206.1_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Forma de arroz	Cuello	0,9	42,2
13	F207_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Coliflor	Cuello	0,7	152,5
14	F207.1_310823	Si	2	-0,279649, -79,309033	Pedunculado	Pierna	1,1	49,3
15	F308_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Aplanado	Oreja	0,9	12,1
16	F308.1_061023	No	3	-0,354467, -79,253611	NP	Boca	NP	10,37
17	F308.2_061023	No	3	-0,354467, -79,253611	NP	Ombbligo	NP	84,1
18	F309_061023	No	3	-0,354467, -79,253611	NP	Oreja	NP	8,1
19	F309.1_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Coliflor	Ubre	0,8	101,8

## Anexo 1.

*Tabla de datos del muestreo realizado*

**Nota:** Tabla con los datos obtenidos durante el muestreo de este estudio. NP=No Proporcionado. Fuente propia.

# Anexos

N°	Código	Foto	Finca	Coordenadas	Morfología	Parte del cuerpo	Tamaño (cm)	ADN (ng/uL)
20	F310_061023	No	3	-0,354467, -79,253611	NP	Ombbligo	NP	21,1
21	F311_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Forma de arroz	Pecho	0,5	7,6
22	F311.1_061023	No	3	-0,354467, -79,253611	NP	Oreja	NP	11,5
23	F311.2_061023	No	3	-0,354467, -79,253611	NP	Ubre	NP	62
24	F312_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Coliflor	Oreja	2,8	9,9
25	F312.1_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Coliflor	Ubre	0,4	13,4
26	F313_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Filamentoso	Ubre	1,4	104,4
27	F314_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	NP	NP	NP	85,2
28	F315_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Forma de arroz	Cuello	1,3	7,7
29	F315.1_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Filamentoso	Ubre	0,7	35,1
30	F316_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Pedunculado	Ubre	1,6	32,9
31	F317_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Filamentoso	Ombbligo	2,3	22,1
32	F318_061023	Si	3	-0,354467, -79,253611	Filamentoso	Ombbligo	4,2	29,1
33	F419_181023	No	4	NP	NP	NP	NP	37,2
34	F420_181023	No	4	NP	NP	NP	NP	22,3
35	F521_211123	No	5	-0,41253, -79,30947	NP	Pierna	NP	44
36	F521.1_211123	No	5	-0,41253, -79,30947	NP	Pierna	NP	25,9
37	F521.2_211123	No	5	-0,41253, -79,30947	NP	Pierna	NP	20,8
38	F622_241123	Si	6	-0.364931, -79.481354	Coliflor	Nariz	0.6	42

## Anexo 1.

*Tabla de datos del muestreo realizado*

**Nota:** Tabla con los datos obtenidos durante el muestreo de este estudio. NP=No Proporcionado. Fuente propia.

# Anexos

N°	Código	Foto	Finca	Coordenadas	Morfología	Parte del cuerpo	Tamaño (cm)	ADN (ng/uL)
39	F622.1_241123	Si	6	-0.364931, -79.481354	Coliflor	Cuello	0,7	11,4
40	F622.2_241123	Si	6	-0.364931, -79.481354	Aplanado	Espalda	0,7	18,8
41	F623_241123	Si	6	-0.364931, -79.481354	Forma de arroz	Cara	1,3	32,6
42	F623.1_241123	Si	6	-0.364931, -79.481354	Coliflor	Cabeza	1,7	25,5
43	F724_241123	Si	7	-0.25702, -79.24921	Filamentoso	Cara	1,5	10,7
44	F725_241123	Si	7	-0.25702, -79.24921	Aplanado	Cuello	0,5	163,9
45	F725.1_241123	Si	7	-0.25702, -79.24921	Aplanado	Oreja	0,5	29,1
46	F826_261123	Si	8	-0.186363, -79.125407	Coliflor	Espalda	1,7	6,2
47	F826.1_261123	Si	8	-0.186363, -79.125407	Coliflor	Cuello	0,4	12
48	F826.2_261123	Si	8	-0.186363, -79.125407	Filamentoso	Cuello	1,4	10,7
49	F827_261123	Si	8	-0.186363, -79.125407	Filamentoso	Espalda	1,3	17
50	F827.1_261123	Si	8	-0.186363, -79.125407	Coliflor	Cuello	1	69,2
51	F827.2_261123	Si	8	-0.186363, -79.125407	Coliflor	Oreja	0,7	6,6
52	F828_091223	No	8	-0.186363, -79.125407	NP	Cuello	0,4	50,4
53	F828.1_091223	Si	8	-0.186363, -79.125407	Coliflor	Oreja	0,4	14,6
54	F829_091223	Si	8	-0.186363, -79.125407	Aplanado	Cola	0,7	62
55	F829.1_091223	Si	8	-0.186363, -79.125407	Aplanado	Cuello	0,6	47,2
56	F830_091223	Si	8	-0.186363, -79.125407	Forma de arroz	Boca	NP	76,8
57	F830.1_091223	Si	8	-0.186363, -79.125407	Forma de arroz	Cuello	NP	47,1

## Anexo 1.

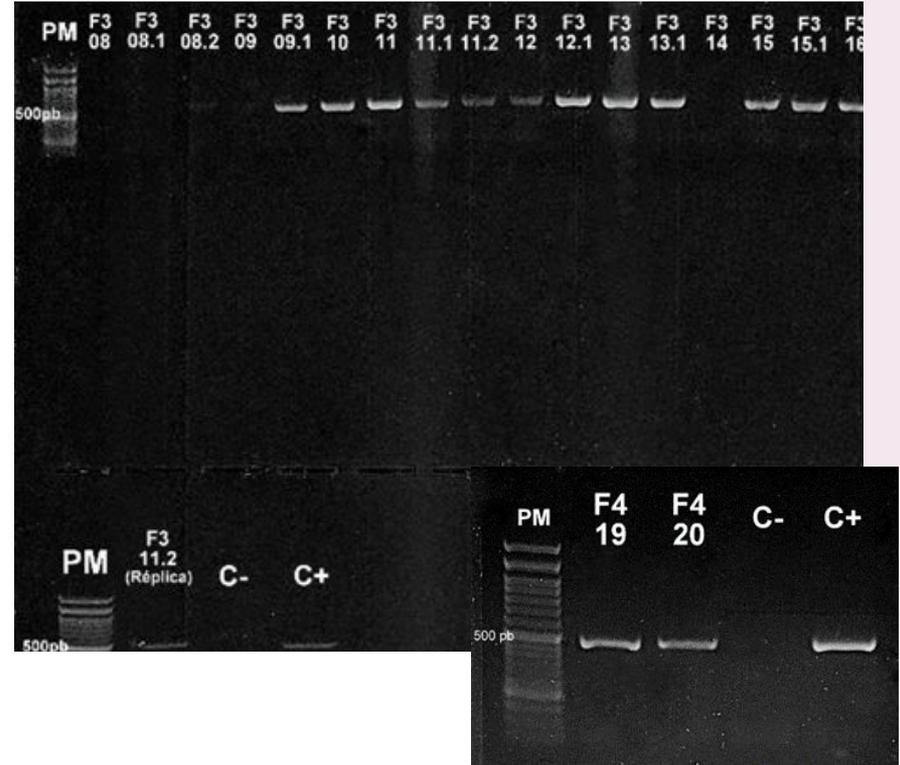
*Tabla de datos del muestreo realizado*

**Nota:** Tabla con los datos obtenidos durante el muestreo de este estudio. NP=No Proporcionado. Fuente propia.

# Anexos

## Anexo 2.

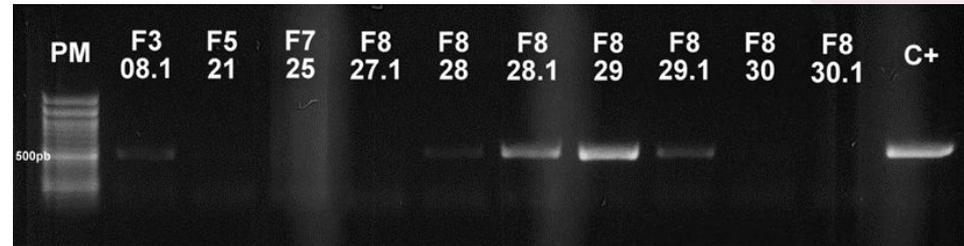
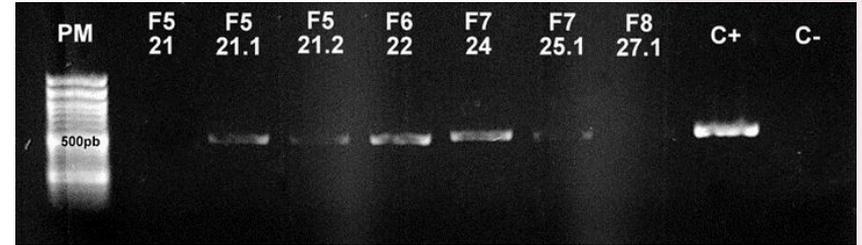
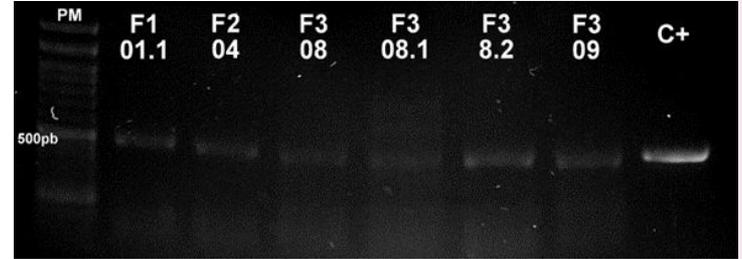
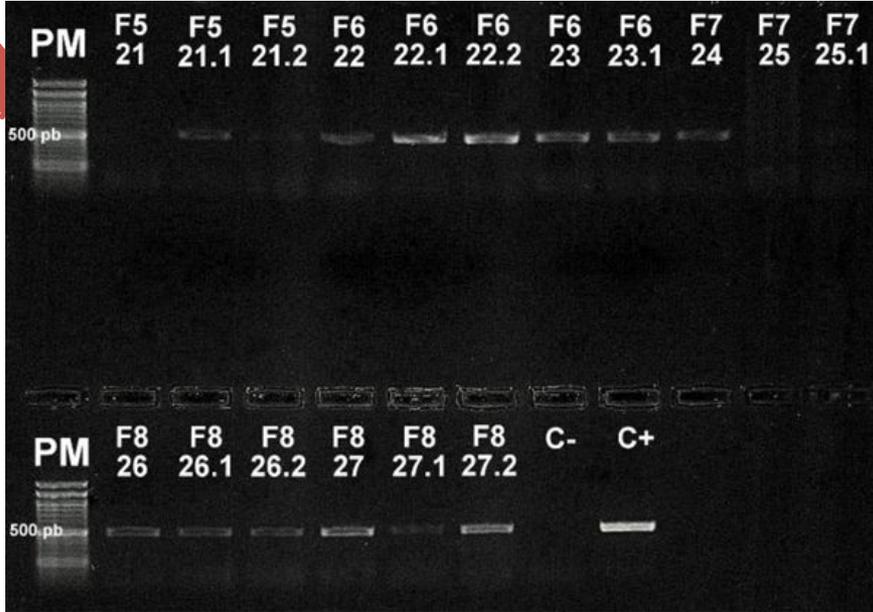
*Electroforesis en gel de productos de PCR de BPV*



# Anexos

## Anexo 2.

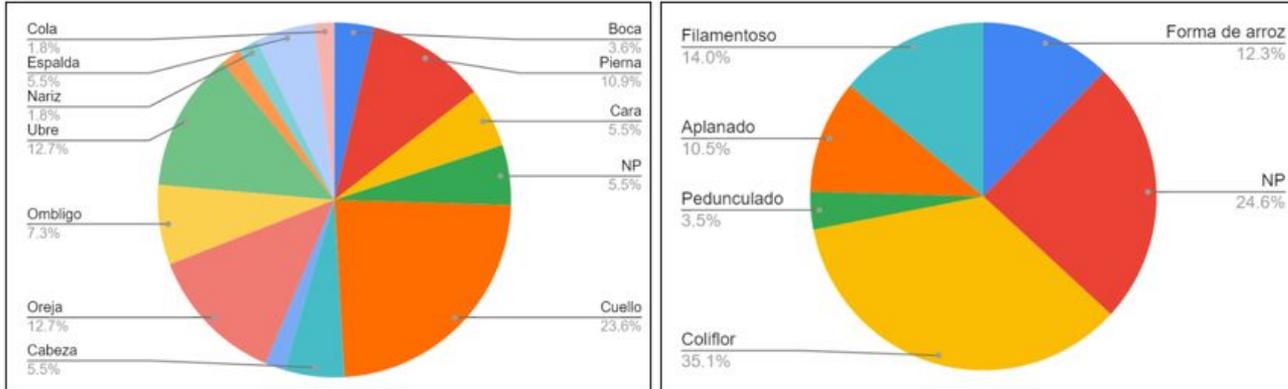
*Electroforesis en gel de productos de PCR de BPV*



# Anexos

## Anexo 3.

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.

