



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA  
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**TIPIFICACIÓN VIRAL Y CARACTERÍSTICAS INMUNOPATOLÓGICAS  
DE LA FIBROPAPILOMATOSIS BOVINA EN  
DIFERENTES REGIONES DE SAN LUIS POTOSÍ**

Tesis que presenta

**Isaura Méndez Rodríguez**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias Agropecuarias**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA  
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**TIPIFICACIÓN VIRAL Y CARACTERÍSTICAS INMUNOPATOLÓGICAS  
DE LA FIBROPAPILOMATOSIS BOVINA EN  
DIFERENTES REGIONES DE SAN LUIS POTOSÍ**

Tesis que presenta

**Isaura Méndez Rodríguez**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias Agropecuarias**

Director de tesis

**Dr. Fernando Alberto Muñoz Tenería**

Asesores:

**Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga**

**Dra. Milagros González Hernández**

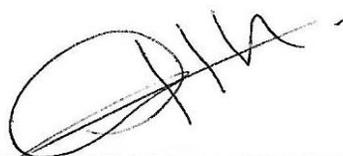
**Dra. Vanessa Labrada Martagón**

## PÁGINA DE APROBACIÓN DE TESIS

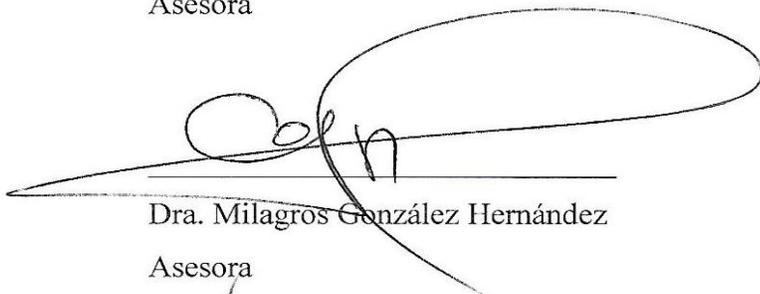
La tesis **“Tipificación Viral y Características Inmunopatológicas de la Fibropapilomatosis Bovina en Diferentes Regiones de San Luis Potosí”**, presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agropecuarias, fue elaborada por Isaura Méndez Rodríguez y aprobada por el suscrito comité de tesis



Dr. Fernando Alberto Muñoz Tenería  
Director de Tesis



Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga  
Asesora



Dra. Milagros González Hernández  
Asesora



Dra. Vanessa Labrada Martagón  
Asesora

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí; 30 de enero de 2019.

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

El trabajo de esta tesis fue realizado en los laboratorios de Inmunología y Virología de la Unidad Central de Equipos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Fernando Alberto Muñoz Tenería.

Durante la realización del trabajo, la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 423607) para la realización de sus estudios de doctorado.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi familia, amigos y a los animales que colaboraron sin saberlo y a veces sin quererlo en la realización de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández, Dra. Milagros González Hernández, Dra. Vanessa Labrada Martagón, Dr. Fernando Alberto Muñoz Tenería, MBM. Alan Ytzeen Martínez Castellanos por su apoyo y dirección en la realización de este trabajo.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UASLP, al laboratorio de inmunología celular del departamento de biología celular del CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco, al Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM y al programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias por brindarme el espacio necesario para llevar a cabo mis estudios de posgrado y las actividades experimentales que forman parte de este trabajo.

A mis colegas Manuel Román, Rafael Duque, Ingeniero Martín y Chuy; a los ganaderos y propietarios del ganado por su apoyo en la obtención de muestras biológicas; a Ramses Jasso y al personal del laboratorio de Anatomopatología EBC por el apoyo técnico con el procesamiento de las muestras biológicas.

A mi madre Elvia Rodríguez, a Isaura Abigail, Julio César, Jocelyn Denise, Perla Mariela, Norma Arévalo, Ángeles Acuña, Natalia Villafuerte, Gerardo Salas, Juana Calderón, Iván Niño Méndez, Rafael Méndez, Sandra María Méndez y a todos los que me apoyaron emocionalmente y me motivaron para concluir exitosamente este trabajo.

## CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN DE LA TESIS.....	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
Fibropapilomatosis Bovina.....	2
Etiología.....	3
Patogenia.....	6
Lesiones Macroscópicas y Signos Clínicos.....	8
Alteraciones Histopatológicas (microscópicas).....	9
Importancia Pecuaría de la Fibropapilomatosis.....	9
Respuesta a la Infección.....	10
Características Generales de los PVB.....	15
Herramientas Moleculares para el Estudio de la Interacción Virus-Animal.....	19
Diagnóstico Molecular de la Infección por PVB.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Tipo de Estudio y Diseño General.....	26
Colección de Especímenes.....	26
Caracterización Histopatológica.....	27
Extracción y Cuantificación De ADN.....	27
PCR.....	27
Purificación de los Amplicones.....	28
Secuenciación de Amplicones e Identificación de Secuencias de ADN.....	29
Análisis Filogenético.....	29

Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
Caracterización Histopatológica.....	34
Extracción de ADN y PCR.....	37
Identificación de los Tipos Virales Mediante Secuenciación.....	39
Relaciones Filogenéticas de los Aislamientos.....	41
Distribución Geográfica de los Aislamientos.....	43
Análisis Estadístico.....	43
CONCLUSIONES.....	47
LITERATURA CITADA.....	48
ANEXO: ARTÍCULOS.....	54

## CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Funciones de algunos genes involucradas en la regulación de las funciones virales.....	6
2	Localización de lesiones por el PVB de acuerdo al serotipo viral.....	18
3	Características de los bovinos incluidos en el muestreo.....	34
4	Finalidad de explotación de los bovinos, resultados histopatológicos y de PCR de las muestras obtenidas.....	38
5	Cuantificación de ADN extraído de las muestras.....	40
6	Prueba de $\chi^2$ de independencia entre la infección por PVB y diversas características de los animales muestreados.....	46

## FIGURAS

Figura		Pág.
1	Genoma del PVB tipo 1 indicando las distintas regiones codificantes .....	5
2	Mecanismo de carcinogénesis en la infección por Papilomavirus .....	7
3	Bovino en el que se pueden observar múltiples papilomas.....	9
4	Vista del comienzo de un ejemplo de lectura con el terminador.....	23
5	El algoritmo BLAST.....	26
6	Sitios de muestreo y colección de especímenes.....	36
7	Lesiones histopatológicas representativas.....	39
8	Producto de PCR con los oligonucleótidos FAP59/FAP64.....	41
9	PCR con los oligonucleótidos MY09/11 .....	42
10	Resultado representativo de la secuenciación de un producto de pcr .....	43
11	Ejemplo de alineamiento de las secuencias .....	44
12	Árbol filogenético de los PVB identificados .....	45
13	Localización de los aislamientos virales.....	47

## RESUMEN

La fibropapilomatosis bovina es una enfermedad infecciosa de distribución cosmopolita que afecta principalmente bovinos jóvenes. En México, no existen datos epidemiológicos sobre la incidencia, prevalencia o tipos virales circulantes. El objetivo de este trabajo es determinar los tipos de PVB y su relación con las características patológicas de fibrosis, papilomatosis, fibropapilomatosis y carcinomas de células escamosas en el ganado bovino de las regiones Centro y huasteca del estado de San Luis Potosí. Se obtuvieron biopsias de piel de 16 bovinos, con lesiones sugerentes de papilomas, fibropapilomas y carcinomas de células escamosas. Para la detección de los tipos de Papilomavirus bovino, se emplearon los oligonucleótidos FAP59 y FAP64. Los productos de PCR fueron secuenciados por la técnica de Sanger. Las secuencias resultantes fueron alineadas con la base de datos del NCBI. En el 75% de los casos se pudo identificar el tipo de Papilomavirus bovino mediante alineamiento. El 8.3% (n=1) de las muestras correspondieron a PVB tipo 2. Otro 8.3% (n=1) de las muestras se identificaron como PVB tipo 26. El restante 83.3% (n=10) se identificaron como PVB tipo 1, de entre las cuales se identificaron dos aislamientos diferentes, 8 pertenecientes al aislamiento BT1PLFap y 2 pertenecientes al aislamiento IPV 11. En la zona centro de San Luis Potosí se encontró mayor prevalencia del PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento BT1PLFap 62.5% (n=5). También se encontraron PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento IPV 11, PVB tipo 2 y Papilomavirus *Bos taurus* (PVBt) tipo 26. En la zona huasteca se encontró mayor prevalencia del PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento BT1PLFap 75% (n=3). También se encontró PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento IPV 11. No se encontró asociación entre la infección por un tipo específico y la caracterización histopatológica de las lesiones.

**Palabras Clave:** Papilomavirus Bovino, Genotipificación, PCR, San Luis Potosí

## SUMMARY

Bovine fibropapillomatosis is an infectious disease of cosmopolitan distribution that mainly affects young cattle. In Mexico, there are no epidemiological data on the incidence, prevalence or circulating viral types. The objective of this work is to determine the types of PVB and its relationship with the pathological characteristics of fibrosis, papillomatosis, fibropapillomatosis and squamous cell carcinomas in cattle in the Central and Huasteca regions of the state of San Luis Potosí. Skin biopsies were obtained from 16 cattle, with suggestive lesions of papillomas, fibropapillomas and squamous cell carcinomas. For the detection of bovine papillomavirus types, oligonucleotides FAP59 and FAP64 were used. The PCR products were sequenced by the Sanger technique. The resulting sequences were aligned with the NCBI database. In 75% of cases, the type of bovine papillomavirus could be identified by alignment. 8.3% (n = 1) of the samples corresponded to type 2 PVB. Another 8.3% (n = 1) of the samples were identified as type 26 PVB. The remaining 83.3% (n = 10) were identified as type 1 PVB. , of which two different isolates were identified, 8 belonging to the BT1PLFap insulation and 2 belonging to the IPV 11 isolation. In the central area of San Luis Potosí, a higher prevalence of type 1 PVB belonging to the BT1PLFap 62.5% insulation was found (n = 5 ). Type 1 PVB belonging to IPV 11, Type 2 PVB and *Bos taurus* Papillomavirus (PVBt) type 26 were also found. In the Huasteca zone, the highest prevalence of type 1 PVB belonging to BT1PLFap 75% (n = 3) was found. Type 1 PVB belonging to IPV 11 isolation was also found. No association was found between infection by a specific type and histopathological characterization of the lesions.

**Keywords:** Bovine Papillomavirus, Genotyping, PCR, San Luis Potosí

## INTRODUCCIÓN

La fibropapilomatosis bovina es una enfermedad económicamente importante en las unidades de producción de bovinos ya que, aunque no pone en riesgo la vida del animal, la presencia de lesiones asociadas a la infección por el PVB limita la movilidad, exposición y venta del ganado, particularmente, aquellas razas criadas con fines especializados, como aquellas incluidas en los programas de mejoramiento genético de razas y afecta los parámetros productivos como retraso en el desarrollo, disminución en ganancia de peso, interfiere con la ordeña e incluso predispone a la presentación de infecciones secundarias por la invasión bacteriana de verrugas traumatizadas y/o de neoplasias malignas. La caracterización de la respuesta inmune y los tipos virales más comúnmente implicados en la infección por el PVB permitirá, en un futuro, desarrollar estrategias de medicina preventiva y terapéutica, como la inmunoterapia, que permitan un control más eficiente de la enfermedad.

En el estado de San Luis Potosí, no se cuenta con datos sobre la prevalencia de las infecciones por PVB, la forma más común de presentación o los tipos virales circulantes a nivel regional. La identificación, por secuenciación, de los tipos de PVB circulantes permitirá tener un primer registro epidemiológico de la infección por PVB y la identificación de las variantes regionales, si las hay, del PVB, sentando las bases para futuros estudios experimentales que permitan obtener vacunas y biológicos diseñados específicamente para la región norte de México.

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

### Fibropapilomatosis Bovina

La fibropapilomatosis bovina es una enfermedad viral infecciosa especie específica y de distribución mundial, que afecta principalmente becerros jóvenes causada por el Papilomavirus bovino (PVB) que es quizá uno de los virus animales más estudiados, debido a su semejanza con el virus del papiloma humano, para el cual incluso ha servido de modelo experimental (Jubb y Palmer, 2007; Blowey y Weaver, 2011; Vázquez *et al.*, 2012).

En el ganado, el Papilomavirus bovino induce proliferaciones verrucosas o neoplasias benignas en forma de papilomas y fibropapilomas. Generalmente, estos tumores y la infección viral presentan regresión natural sin muchas consecuencias clínicas, pero en ocasiones deterioran el aspecto del animal en caso de venta u ocasionan signos clínicos dependiendo de su localización y pueden crear condiciones óptimas para una infección bacteriana secundaria. Si la infección persiste, se pueden desarrollar neoplasias malignas como el carcinoma de células escamosas y/o afectar además órganos internos, principalmente vejiga urinaria y tracto gastrointestinal. Clínicamente las lesiones se observan por lo general en la región occipital, cervical, torácica y dorsal, pudiendo localizarse en cualquier parte del cuerpo del animal (Jubb y Palmer, 2007; Bernard *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2010; Blowey y Weaver, 2011; Charry e Hinojosa, 2011; Salib y Farghali, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013; Meuten 2016; Zachary y McGavin, 2016).

Diversos factores predisponentes son asociados al desarrollo de la enfermedad, como son: estados de inmunosupresión, edad del animal, estado nutricional, parasitosis, mal manejo, estrés, fármacos inmunosupresores, entre otros (Jubb y Palmer, 2007; Bernard *et al.*, 2010; Charry e Hinojosa, 2011; Salib y Farghali, 2011; Corteggio *et al.*, 2013; Pattar 2013; Munday 2014).

Existen más de 10 serotipos de Papilomavirus bovino que varían en su capacidad oncogénica, recayendo ésta en los genes E2, E5, E6 y E7 principalmente (Jubb y Palmer,

2007; Blowey y Weaver, 2011; Charry e Hinojosa, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013; Pattar, 2013; Munday, 2014; Meuten, 2016).

La infección por el virus es silenciosa, aunque varía de acuerdo al serotipo, ya que algunos serotipos son más eficientes en evadir la respuesta inmune del huésped, al ser estrictamente epiteliotropos, es decir, solo afectan las células basales de la piel y mucosas, sin invadir otros tejidos, por lo cual la viremia es rara en los casos de fibropapilomatosis bovina. Así mismo, estos virus tienen la capacidad de silenciar los genes requeridos para la producción de interferones alfa y beta, factores que son esenciales para que se desarrolle el llamado “estado antiviral”, en el cual, la célula infectada por un virus genera estos interferones que inducen la producción endógena de RNAsas las cuales degradan cualquier RNA en el citoplasma celular, deteniendo la síntesis de proteínas, evitando la multiplicación del virus y provocando así un estado pro-inflamatorio que atrae células de la inmunidad innata para iniciar una poderosa respuesta inmunológica que culminara con la eliminación del virus y la generación de una memoria inmune con persistencia prolongada de anticuerpos neutralizantes. Estos mecanismos inmunológicos han sido bien estudiados en la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), pero no así en los Papilomavirus bovinos, en el cual se desconoce el papel que juegan algunas células importantes para la inmunidad antitumoral, como las células “natural killer” (NK, por sus siglas en inglés), las células de Langerhans, Linfocitos T CD8, T CD4 y T CD25 (Guzmán *et al.*, 2010; Castillo, 2011; Pattar, 2013; Zachary y McGavin, 2016).

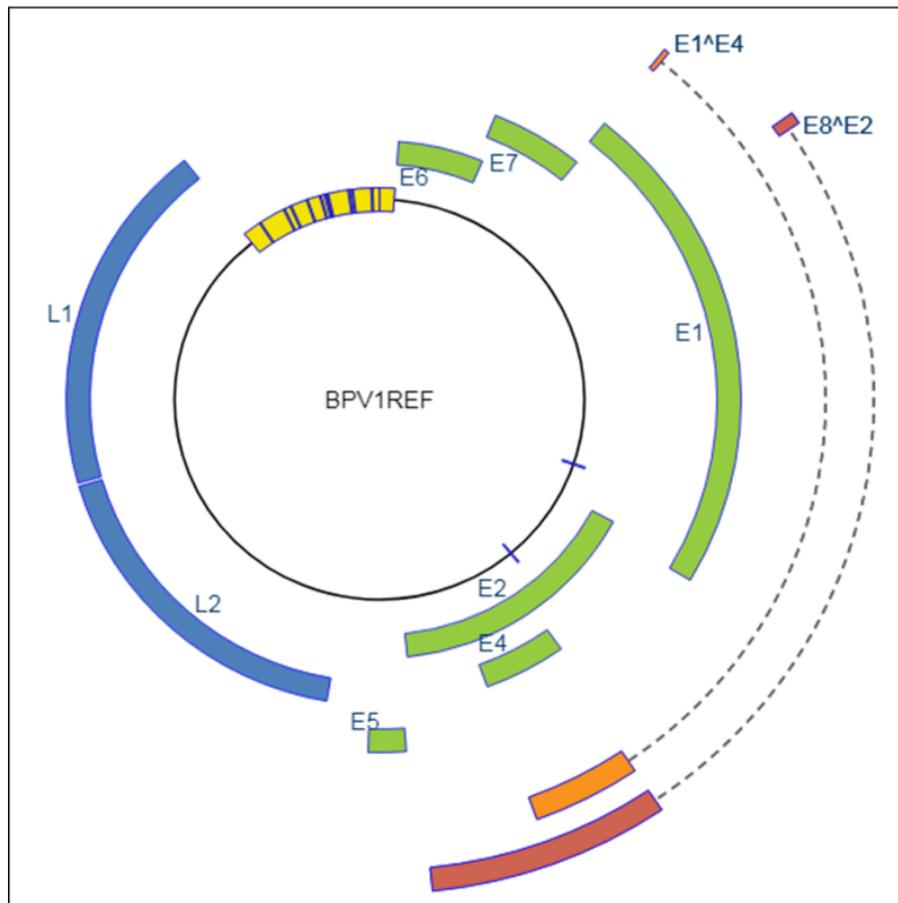
### ***Etiología***

La papilomatosis y fibropapilomatosis bovina es una enfermedad viral causada por más de 10 serotipos de PVB, los cuales provocan lesiones proliferativas en distintas zonas del cuerpo del animal (Guzmán *et al.*, 2010; Castillo, 2011; Pattar, 2013; Zachary y McGavin, 2016).

Los Papilomavirus (PV) son virus desnudos, con estructura eicosaédrica compuesta de 72 capsómeros tanto hexavalentes como pentavalentes pertenecientes a la familia *Papillomaviridae* recientemente escindida de la antigua familia *Papovaviridae*. Son virus epiteliotrópicos, aunque se ha detectado su presencia en sangre, leche, orina y semen (Charry e Hinojosa, 2011; Vázquez *et al.*, 2012).

Actualmente se reconocen 29 géneros que incluyen 69 especies. Los PVB se caracterizan por una alta diversidad viral y, hasta la fecha, se reconocen 13 tipos PVB-1 a PVB-13. Se concentran en tres de los 29 géneros descritos en la familia *Papillomavirus*: *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus* y *Xipapillomavirus* (Bernard *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2010; Munday y Kiupel, 2010; Salib y Farghali, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013; Munday, 2014).

Presentan un genoma de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases de longitud que contiene nueve o 10 regiones codificantes las cuales son secuencias de nucleótidos que codifican proteínas no estructurales (enzimas) involucradas en la regulación de las funciones virales, así como proteínas estructurales involucradas en la producción de partículas virales. Aquellas que codifican proteínas no estructurales son conocidas como genes de expresión temprana (E) y las que codifican proteínas estructurales se denominan genes de expresión tardía (L), de acuerdo a si son expresados antes o después de la síntesis del ADN destinado a ser ensamblado en las partículas de progenie viral (Figura 1). En el VPH, siete u ocho de las regiones codifican para genes tempranos y únicamente dos para genes tardíos. Contiene además una región no codificante, conocida como región larga de control o región reguladora principal, cuyas secuencias se encargan de la regulación de la expresión de todos sus genes, tanto de la región temprana como de la región tardía (Guzmán *et al.*, 2010; Castillo, 2011; Corteggio *et al.*, 2013; Henry y Ioffe, 2013; Munday, 2014).



**Figura 1 Genoma del BPV tipo 1 indicando las distintas regiones codificantes.**  
(Tomado de Van Doorslaer *et al.*, 2016).

Los productos de los genes E5, E6 y E7 han sido los más estudiados a causa de su interacción con los genes supresores p53 y pRb y su papel en la transformación y proliferación celular, se denominan oncogenes o genes transformantes, mientras que los genes denominados L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside viral (Cuadro 1) (Jubb y Palmer, 2007; Aragón-Franco *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2010; Munday y Kiupel, 2010; Castillo, 2011; Granadillo *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012; Henry y Ioffe, 2013; Maniar y Nayar, 2014).

**Cuadro 1 Funciones de algunos genes involucradas en la regulación de las funciones virales.**

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
E6	Destrucción de la proteína supresora tumoral p53 (Acumulación o mutación de P53 e inhibición de la apoptosis).
E7	Inactivación de la proteína supresora tumoral pRb
E5	Interacción con el factor de crecimiento epidermal (FCE), EGFR, VEGF
E1	Replicación de ADN viral
E2	Replicación de ADN viral: represión de genes E6 y E7
E4	Ensamblaje y liberación de partículas virales
L1 y L2	Codifican para proteínas de la cápside viral

Aunque originalmente se describieron en ganado vacuno, algunos genotipos como el PVB-1 y PVB-2 se han asociado al desarrollo de papilomas en búfalos, cebras, jirafas y yaks. Algunos genotipos se han relacionado asimismo con el desarrollo de tumores en tracto gastrointestinal y cáncer de vejiga urinaria en ganado bovino (Vázquez *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013; Pattar, 2013).

### ***Patogenia***

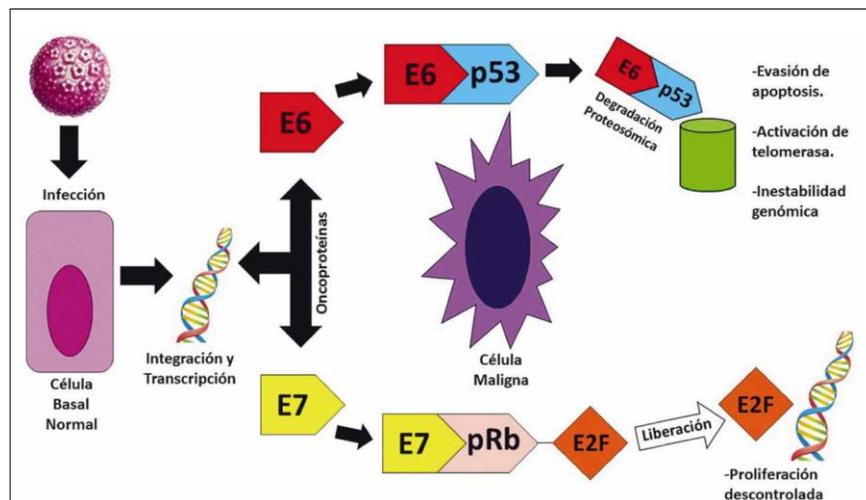
El virus se propaga con la sangre o exudados de animales infectados a través de soluciones de continuidad de la piel o mediante vectores u objetos contaminados. Infecta queratinocitos basales del epitelio y se replica en los queratinocitos del estrato espinoso y granular causando hiperplasia del epitelio (Jubb y Palmer, 2007; Salib y Farghali, 2011; Rocha *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013).

Los PV se replican exclusivamente en el núcleo de los queratinocitos basales del epitelio. Una vez en las células sigue tres posibles vías:

1. El virus puede causar una infección latente sin cambios morfológicos en los queratinocitos.
2. En las células basales maduras el virus puede pasar de una infección latente a una productiva con formación de viriones completos infectantes, dando lugar a cambios morfológicos conocidos como citopatología viral, incluyendo hiperplasia epitelial,

queratinocitos con citoplasma claro, núcleos picnóticos, y algunas veces cuerpos de inclusión intranucleares y/o intracitoplasmáticos.

3. El virus se puede integrar al genoma de la célula del huésped, resultando en transformación maligna de la célula y cambios morfológicos de neoplasia maligna. Esto ocurre debido a que los genes virales que permanecen después de la integración a la célula del huésped son también asociados con la regulación del ciclo celular; dichos genes virales (E5, E6 y E7) promueven el crecimiento celular por inactivación de proteínas supresoras tumorales como el p53 y pRb. Estos eventos dan lugar a proliferación celular incontrolada, inhabilidad para reparar algún daño al DNA y transformación maligna (Jubb y Palmer, 2007; Aguilar y Berumen, 2009; Munday y Kiupel, 2010; Castillo, 2011; Rocha *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013; Henry y Ioffe, 2013; Maniar y Nayar, 2014; Zachary y McGavin, 2016).



**Figura 2 Mecanismo de carcinogénesis en la infección por Papilomavirus**  
(Tomado de Contreras y Venegas, 2015).

La mejora de las técnicas moleculares de detección ha puesto de manifiesto la existencia de frecuentes infecciones múltiples con hasta cuatro tipos de BPV. Aunque en cada papiloma no se ha detectado más de un tipo de PVB, un mismo animal puede tener papilomas en diferentes partes del cuerpo asociadas a diferentes tipos de PVB. La existencia de co-infecciones con diversos genotipos podría explicar la existencia de

infecciones persistentes, lo que podría conllevar una caída de la respuesta inmune y, por tanto, a la ausencia de la regresión en las lesiones (Bernard *et al.*, 2010).

### ***Lesiones macroscópicas y signos clínicos***

Los papilomas y fibropapilomas pueden tener regresión espontánea o permanecer hasta 6 a 18 meses; en caso de ser múltiples y/o dependiendo de su localización pueden ocasionar pérdida de la condición corporal. Los signos clínicos varían dependiendo de la localización de las lesiones por ejemplo si se localizan en espacio interdigital son dolorosos y pueden provocar cojeras o postración. En el tracto gastrointestinal rara vez exhiben manifestaciones clínicas pero pueden causar anorexia o timpanismo. En la glándula mamaria pueden dificultar el ordeño o complicarse con infecciones secundarias y generar mastitis. En vagina o pene pueden interferir con el coito, sangrar, infectarse e interferir con la reproducción (Jubb y Palmer, 2007; Salib y Farghali, 2011; Corteggio *et al.*, 2013; Munday, 2014; Meuten, 2016).



**Figura 3** Bovino en el que se pueden observar múltiples papilomas (Tomado de Kavetuna, 2016).

### ***Alteraciones histopatológicas (microscópicas)***

El papiloma está constituido por proyecciones papilares de epitelio escamoso, sostenidas por estroma fibrovascular. El epitelio de estas proyecciones exhibe hiperplasia e hiperqueratosis orto y paraqueratósica marcada. En algunos papilomas, los queratinocitos, principalmente los del estrato espinoso exhiben abundante citoplasma claro o un halo perinuclear y núcleos picnóticos, las cuales son denominadas Coilocitos (células con cambios citopáticos). En ciertos papilomas en regresión se aprecia reducción de la hiperplasia epidermal, incremento en la proliferación de fibroblastos, depósitos de colágena e infiltración por linfocitos. Los fibropapilomas tienen dos componentes: el epitelio de revestimiento que alterna con tejido fibroso dispuesto en haces entrelazados y fibroblastos reactivos. El epitelio de revestimiento no muestra cambios citopatológicos pero se aprecia hiperplasia marcada y acantosis plexiforme. En las lesiones grandes el epitelio se puede erosionar semejando así un fibroma (Jubb y Palmer, 2007; Guzmán *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2012; Henry y Ioffe, 2013; Zachary y McGavin, 2016).

### **Importancia pecuaria de la fibropapilomatosis**

#### ***Impacto económico***

La crianza de bovinos para leche o carne de consumo nacional o para exportación es una actividad económica de gran relevancia para los productores del estado de San Luis Potosí, como el año 2018, en el cual se produjeron más de 103 mil toneladas de carne de bovino (SAGARPA, 2018).

El estado cuenta con una capacidad de sacrificio instalada de 10 000 cabezas de ganado en las instalaciones del rastro municipal de la capital del estado y otras 25 500 en el rastro TIF, el estado se posicionó como el cuarto productor nacional de carne de bovino y el primer exportador a nivel nacional de carne a los países árabes (SAGARPA, 2018).

La papilomatosis bovina es una entidad clínica que ocasiona pérdidas económicas debido a retrasos en el crecimiento, disminución en la ganancia de peso, puede interferir con la reproducción y afectar el aspecto estético de los animales (Orozco y Padilla, 2016).

El principal obstáculo que se presenta en el control de esta enfermedad es la ausencia de un marco epidemiológico que ponga de manifiesto la relevancia de la

enfermedad, para estimar así, las pérdidas económicas atribuibles a la enfermedad. Esto, aunado a la carencia de una vacuna preventiva y/o tratamientos específicos ocasiona que los productores empleen alternativas poco exitosas para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad (Orozco y Padilla, 2016).

La subestimación de las consecuencias de esta enfermedad, han impedido que se implementen las estrictas medidas de control que se requieren para abatir esta enfermedad (Orozco y Padilla, 2016).

### ***Riesgo a la salud pública***

Aunque se da por válido que los PV son especie específicos y, por ende, no representan un riesgo a la salud pública humana, se han reportado casos en los que se han aislado secuencias específicas de BPV-1 de muestras provenientes de lesiones cutáneas que aparecen en manos de los trabajadores de las unidades de producción bovina. En todo caso, la infección parece seguir un patrón autolimitante y el humano funciona, entonces, como un hospedador incidental del papilomavirus bovino (Orth, *et al.*, 1981).

### **Respuesta a la infección**

La respuesta inmune a los PV ha sido mejor estudiada en el virus del papiloma humano. Una disminución en los mecanismos de defensa del huésped pueden dar lugar a un aumento en la susceptibilidad a infecciones, desarrollo de neoplasias o incluso a desordenes crónicos inflamatorios o autoinmunes (Charry e Hinojosa, 2011; Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

La respuesta inmune innata contra el VPH es la primera línea de defensa contra el virus, ésta incluye el reconocimiento a través de “receptores del reconocimiento de patrones” (RRPs), específicamente los “Toll-like receptos” (TLRs) que inician vías de señalización para inducir la expresión de genes que codifican para moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria y en el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Aragón-Franco *et al.*, 2010; Leon *et al.*, 2012).

La supresión inmunológica selectiva permite el desarrollo de neoplasias, tanto por predisposición a la infección con virus oncogénicos como por el escape de las células

neoplásicas a los mecanismos reguladores del huésped. Esto queda demostrado por la evidencia epidemiológica de que la infección crónica por VPH es más frecuente en individuos inmunosuprimidos (Guzman *et al.*, 2010).

### ***Respuesta celular***

Las evidencias clínicas sugieren que la inmunidad celular es importante en la protección contra la persistencia del VP. Estos resultados se documentan con la alta incidencia de displasias en pacientes inmunosuprimidos por trasplantes y en los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Munday y Kiupel, 2010; Leon *et al.*, 2012).

La cantidad de células inmunológicas, su diferenciación y su capacidad funcional puede ser el resultado de la acción simultánea de varios mecanismos desarrollados tanto por el VP como por las células tumorales para evadir la respuesta inmune, eventos que propician un ambiente supresor a medida que aumenta la carga tumoral (Leon *et al.*, 2012).

La infección por VP es capaz de inducir la diferenciación de las células Th a linfocitos Th2. El aumento en la expresión de interleucinas del perfil Th2 paralelo a la disminución de las interleucinas del perfil Th1, contribuye a la desregulación de los mecanismos de presentación antigénica y por tanto, una disminución de la activación de los linfocitos T CD8+ (Munday y Kiupel, 2010; Leon *et al.*, 2012).

### ***Respuesta del Sistema Inmune Innato a Tumores***

Las principales células efectoras del sistema inmunológico que atacan directamente a las células tumorales incluyen a las células NK, células dendríticas, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, mastocitos y linfocitos T citotóxicos. Las células NK, células dendríticas, mastocitos y macrófagos son los efectores de primera línea contra células dañadas y tumorales. Las células NK-T y linfocitos T  $\gamma\delta$  desempeñan una función del sistema inmune innato, a través de interacciones estrechas con células del sistema inmune adaptativo como linfocitos CD4 y CD8 con efectos citotóxicos y de memoria (Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

### ***Células NK***

Las células NK constituyen la primera respuesta innata celular responsable de eliminar a las células cancerígenas que desregulan el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), liberando proteínas citotóxicas como la perforina y granzima, que provocan apoptosis en las células blanco. Existen dos tipos de receptores en su pared celular: receptores estimuladores y receptores inhibidores.

La unión de NKG2D con ligandos de proteínas A y B del CMH-I (MICA y MICB), la proteína de unión UL16 y la proteína H60 del complejo de histocompatibilidad menor provoca la secreción de IFN- $\gamma$  y perforina, liberación de citocinas proinflamatorias y la inducción de la apoptosis en las células neoplásicas. Los receptores inhibidores de estas células consisten en receptores KIR (Receptores tipo inmunoglobulina de células K). La molécula no clásica del CMH-I, funciona también como ligando para los receptores KIR y puede inhibir la citotoxicidad mediada por las células NK. La molécula no clásica del CMH-I, HLA-E es el ligando para los receptores heterodímeros NKG2A/CD94. Los receptores de ligandos de la familia del TNF se expresan en la superficie de las células NK. La unión de los ligandos y receptores del factor de necrosis tumoral puede inducir de manera eficiente la muerte celular.

Las células NK activadas por el ligando LIGHT, producen IFN- $\gamma$ , que promueve la expansión y diferenciación de células T. Una vía alternativa de activación de estas células es a través del CD 16 o receptores para IgG (FC $\gamma$ R III), el cual es el receptor de baja afinidad para la región Fc de la IgG. Este mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) se desarrolla cuando la célula tumoral se recubre de anticuerpo IgG, lo cual permite la unión de las células NK a través del CD16, en estas condiciones envía señales de activación para la liberación de perforinas y granzimas. La efectividad de las células NK se incrementa bajo la acción de la IL-2 procedentes de linfocitos Th 1 (Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

### ***Macrófagos***

Las células apoptóticas tumorales pueden ser eliminadas por macrófagos para evitar autoinmunidad. Estas células tumorales expresan moléculas en su superficie para el reconocimiento y la fagocitosis por macrófagos. Dichas señales incluyen la fosfatidilserina

lipídica (PS), la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) y la proteína calreticulina multifuncional (CRT). Estas moléculas son traslocadas y redistribuidas para exponerse en la superficie de las células tumorales durante la apoptosis. Bajo condiciones normales, la interacción entre las células tumorales apoptóticas y los macrófagos lleva a una tolerancia inmune sin provocar aumento significativo de las citocinas proinflamatorias. Los macrófagos expresan tanto Fc $\gamma$ R activadores e inhibitorios simultáneamente. Los Fc $\gamma$ R activadores estimulan la citotoxicidad de las células tumorales. Por otro lado, específicamente Fc $\gamma$ RIIB es el único receptor responsable de los efectos inhibitorios en macrófagos, incluyendo la inhibición de la fagocitosis, disminución de la liberación de citocinas, de la producción de superóxido y el bloqueo de vía de los receptores Toll-like 4 (Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

### ***Linfocitos T citotóxicos***

Los péptidos que se acoplan al CMH-I y que son producidos por las células neoplásicas como antígenos tumorales, constituyen el estímulo para la inducción de respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8. Estos linfocitos reconocen a las células tumorales a través de TCR. Una vez efectuado el reconocimiento antigénico las células reciben señales de activación por citocinas procedentes de los linfocitos T CD4 cooperadores. Estos últimos también reconocen antígenos tumorales a través de células presentadoras de antígenos, que han internalizado y procesado elementos antigénicos procedentes de células tumorales previamente destruidas. Las citocinas procedentes de los linfocitos T cooperadores y que participan en la activación de las células T citotóxicas son del perfil Th1, es decir TNF  $\beta$ , IL-2, IL-12, IFN  $\gamma$ . Estas citocinas también favorecen o incrementan la expresión de MHC de clase I en la superficie tumoral, incrementando la efectividad de los linfocitos citotóxicos. Una vez activados los linfocitos citotóxicos, secretarán perforinas, las cuales producen poros en la membrana celular tumoral. Otras enzimas liberadas son las granzimas, las cuales degradan el ADN de la célula neoplásica (Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

### ***Células dendríticas***

En cuanto a la interacción directa con las células tumorales, las células dendríticas fagocitan células apoptóticas vía integrina  $\alpha\beta 5$  y receptores CD36. El marcador de células apoptóticas PS puede ser capturado por el receptor TAM, que promueve la fagocitosis de las células apoptóticas e inhibe la inflamación. El complejo integrina  $\alpha\beta 3$  puede atrapar a las células cancerígenas apoptóticas. Similar a los macrófagos, la fagocitosis de estas células puede provocar tolerancia inmune. Las células dendríticas también expresan Fc $\gamma$ R activadores e inhibidores (Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

### ***Polimorfonucleares y mastocitos***

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mastocitos pueden tener un papel significativo en la tumorigénesis y metástasis. En los neutrófilos, los Fc $\gamma$ R activadores inducen la liberación de citocinas y quimiocinas, que promueven el reclutamiento y la activación de células dendríticas y macrófagos en el ambiente tumoral. La activación de los receptores Fc $\gamma$ R II $\beta$  inhibidores en los neutrófilos disminuyen la producción de especies reactivas de oxígeno, que son citotóxicas contra los tumores (Jubb y Palmer, 2007; Zachary y McGavin, 2016).

## **Características generales de los PVB**

### ***Heterogeneidad de los PVB***

Actualmente, se reconocen 13 tipos de PVB que se diferencian entre sí por la homología de sus genomas completos (PVB-1 a PVB-13). El tipo de lesión depende del tipo viral involucrado; siendo así que se considera que los virus PVB1 y 2 dan lugar a fibropapilomas, PVB 3,4, 6, 9, 10 originan papilomas escamosos y los PVB 5 y 8 pueden generar ambos. Los tipos del PVB codifican una gran variedad de genes estando E1, E2 Y E7 presentes en todos los tipos y recayendo la capacidad oncogénica principalmente en el E5 y E6, E7 en bovinos y humanos respectivamente (Jubb y Palmer, 2007; Munday y Kiupel, 2010; Castillo, 2011; Charry e Hinojosa, 2011; Rocha *et al.*, 2012; Corteggio *et al.*, 2013; Maniar y Nayar, 2014; Munday, 2014).

Se desconoce si la infección con un PVB podría favorecer una infección posterior con otros genotipos, o si todos son transcripcionalmente activos o algunos de ellos se encuentran en forma latente. En este sentido los PV animales parecen tener un comportamiento similar a los PV humanos, ya que se ha descrito la existencia de frecuentes infecciones múltiples en lesiones o incluso la detección simultánea de varios genotipos en piel sana (Vázquez *et al.*, 2012).

### ***Tipos virales y localizaciones geográficas***

Las infecciones por papilomavirus se han descrito a lo largo de todo el mundo aunque no todos los genotipos presentan la misma prevalencia regional (Charry e Hinojosa, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Orozco y Padilla, 2016).

Los tipos BPV-1 y BPV-2 son los tipos virales que presentan una prevalencia más elevada y una mayor distribución mundial. El genotipo BPV-1 se ha reportado en bovinos de Arabia, Nueva Zelanda, Brasil, India, Japón, Suecia y México. Por su parte, el genotipo BPV-2 se ha encontrado en Alemania, Brasil, India, Japón, Portugal, Rumania y España (Charry e Hinojosa, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Orozco y Padilla, 2016; Violet *et al.*, 2017). Por su parte, los genotipos BPV-3, BPV-7, BPV-8, BPV-9, BPV-11 y BPV-12, se

han identificado en Brasil y Japón, principalmente; El genotipo BPV-4, en Brasil e Italia; BPV-6 en Brasil y El Reino Unido y los genotipos BPV-5 y 13 en Brasil, únicamente (Campo, 1997; Ogawa *et al.*, 2004; Borzacchiello y Roperto, 2008; Diniz *et al.*, 2009).

La existencia de este patrón de distribución restrictiva de los genotipos de PVB, así como la frecuencia de presentación de la infección cutánea por PVB se ha atribuido a un patrón climatológico específico de zonas cálido-húmedas (Violet *et al.*, 2017).

### ***Tipos virales y localización anatómica de las lesiones***

Diversos trabajos se han enfocado en señalar un aparente tropismo celular en los diferentes tipos de PVB. Esta observación viene fundamentada por el hecho de que, en muchas ocasiones, un mismo tipo viral causa infecciones que se autolimitan a regiones anatómicas específicas del animal. Así pues, se ha señalado que la localización, extensión y duración de la lesión depende del serotipo viral involucrado (Cuadro 2 y Figura 3) (Jubb y Palmer, 2007; Pattar, 2013; Munday, 2014).

**Cuadro 2 Localización de lesiones por el PVB de acuerdo al serotipo viral.**

<b>Tipo viral</b>	<b>Localización de la lesión</b>
<b>PVB 1</b>	Ubre, pezón, pene, cabeza, cuello, dorso
<b>PVB 2</b>	Cabeza, cuello, dorso, región perianal, abdominal
<b>PVB 3</b>	Cabeza, cuello, dorso, región abdominal
<b>PVB 4</b>	Tracto gastrointestinal
<b>PVB 5</b>	Ubre y pezones
<b>PVB 6</b>	Ubre y pezones

Este aparente tropismo anatómico-regional, sin embargo, no es absoluto por lo que, la observación de que un tipo viral provoque infección en un sitio anatómico con mayor frecuencia, debe ser evaluada en un contexto global y considerar el estado nutricional del animal y la localización geográfica de la explotación (Borzacchiello y Roperto, 2008).

## **Diagnóstico, control y tratamiento de la infección**

Se basa en diagnóstico clínico el cual tiene como objetivo la identificación de lesiones sugerentes de fibromas, papilomas y fibropapilomas en piel, tracto gastrointestinal, y genitourinario del ganado bovino.

El diagnóstico para histopatología complementa el diagnóstico clínico de la fibropapilomatosis bovina.

El diagnóstico molecular se realiza extrayendo el ADN de las muestras utilizando enzimas que degradan las proteínas de la membrana celular y de la cápside viral. Con el ADN extraído se pueden realizar técnicas de amplificación selectiva de ácidos nucleicos virales (reacción en cadena de la polimerasa, PCR), hibridación ácidos nucleicos-proteínas o el Southern Blot.

### ***Histopatología***

El diagnóstico de gabinete para la infección por PV se realiza, principalmente, mediante la búsqueda intencionada y observación microscópica de las lesiones presentes en el cuerpo del animal (Wikström *et al.*, 1992).

De manera general, las lesiones producto de la infección por papilomavirus se examinan mediante la inclusión de secciones tisulares en parafina para preparar cortes histológicos que se tiñen con Hematoxilina y Eosina lo cual posee una sensibilidad del 88.6% y una especificidad del 17.5% (Soost *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2011).

### ***Serología***

El empleo de técnicas serológicas para el diagnóstico de la infección por papilomavirus se ha visto limitado debido, en parte, a la gran variedad de subtipos de este agente infeccioso, pero también a la aparición de reacciones cruzadas entre diversos genotipos, la diversidad de lesiones precursoras de neoplasias y con los sitios blanco de infección. Asimismo, la expresión del papilomavirus en las capas superficiales del epitelio dan origen a una débil presencia de células presentadoras de antígenos virales, lo que se traduce en una elevación de la respuesta serológica (Coursaget, 2003).

A través del tiempo se han realizado diferentes esfuerzos para el desarrollo de ensayos serológicos específicos y sensibles. Así pues, la detección de anticuerpos dirigidos contra las proteínas E2 y E4 ha sido posible mediante el empleo de proteínas de fusión y otros péptidos sintéticos. De tal forma que, los anticuerpos contra la proteína E2 pueden ser detectados hasta en 2/3 partes de sujetos que muestran resultados positivos al DNA viral. En este mismo orden de ideas, basándose en la presunción de que las proteínas E6 y E7 se producen en grandes cantidades en células cancerosas, la presencia de anticuerpos anti-E6 y anti-E7 se ha asociado con la progresión maligna de la enfermedad, permitiendo, por consiguiente, emplear la detección de estos anticuerpos como un biomarcador diagnóstico y pronóstico de la infección (Banks *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1987; Dillner, 1990; Moller *et al.*, 1992; Rosales *et al.*, 2001).

En los últimos años, la expresión de las proteínas virales L1 y L2 en partículas semejantes a los virus (VLP) ha permitido el desarrollo de ensayos más sensibles para medir la respuesta inmune a la infección viral. Diversos estudios muestran que la detección de anticuerpos anti-VLP es el marcador serológico más confiable en la detección serológica de la infección por papilomavirus. Sin embargo, esta técnica posee importantes limitaciones prácticas, siendo la principal, que a cada genotipo viral debe corresponder un serotipo específico. Además, la detección de anticuerpos anti-VLP es característicamente asincrónica con la infección y rara vez se puede interpretar como señal de eliminación de la infección, aunado a que se ha señalado la posibilidad de que ocurra reactividad cruzada en hasta un 10% de los casos, la principal aplicación de los métodos serológicos debería ser el monitoreo de la vacunación contra los papilomavirus humanos y no humanos (Christensen *et al.*, 1994; Heino *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996; Roden *et al.*, 1996; Villa, 2003).

### ***Prevención y control de la infección***

La prevención y tratamiento son difíciles de evaluar debido a que la enfermedad es autolimitante, de duración variable y están involucrados diversos tipos de PVB. Se han utilizado una gran variedad de tratamientos pero ninguno ha sido completamente efectivo. Uno de los tratamientos que ha reportado mayor efectividad contra la infección por Papilomavirus bovino es la preparación y administración de autovacunas. Estos biológicos

se preparan macerando una porción de la lesión mezclándola con formol y antibióticos e inyectándose al animal con la finalidad de producir una respuesta inmune tipo específica ante el virus involucrado (Aguilar y Berumen, 2009; Bernard *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2010; Charry e Hinojosa, 2011; Salib y Farghali 2011; Granadillo *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012; Henry y Ioffe, 2013; Maniar y Nayar, 2014; Meuten, 2016).

## **Herramientas moleculares para el estudio de la interacción Virus-Animal**

En los últimos años han ocurrido avances significativos en los métodos moleculares para el diagnóstico de enfermedades, la farmacogenómica y la detección de patógenos tanto en tejidos como en líquidos procedentes de distintas especies animales (Zawacka-Pankau, 2011). Estos métodos se fundamentan en uno de 3 principios básicos: 1. Detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) pertenecientes a microorganismos patógenos; 2. Detección de Anticuerpos producidos como respuesta a una infección viral y, 3. Detección de proteínas (antígenos) específicos del agente patógeno que causa la infección (Cobo, 2012).

### ***La PCR y sus variantes***

Los métodos de diagnóstico molecular más utilizados se basan en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos (“secuencias blanco”) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se lleva a cabo en tres etapas: 1) extracción y purificación del material que contenga las secuencias blanco, 2) amplificación de las secuencias blanco y 3) detección o identificación de los productos de PCR mediante electroforesis, fluorescencia o secuenciación. Desde la invención de la PCR (Mullis y Faloona 1987), la técnica original y sus variantes han sido utilizadas para diagnosticar una gran variedad de infecciones y condiciones genéticas en humanos, plantas y animales (Morris *et al.*, 1988; Yourno y Conroy, 1992; Quinn, 1994).

La PCR genera gran número de copias de un segmento específico de ADN a partir de una o más moléculas que contienen la secuencia blanco a través de ciclos de incubación de tres pasos, programados y ejecutados automáticamente en un termociclador. Los pasos de cada ciclo son: 1) desnaturalización por calentamiento de las moléculas de ADN con la

secuencia blanco o cadena molde; 2) unión por hibridación, a la temperatura apropiada, de las parejas de oligonucleótidos iniciadores complementarios al extremo 5' (iniciador forward) y el extremo 3' (iniciador reverse) de la secuencia blanco, 3) extensión de la secuencia blanco (i.e., síntesis del producto de amplificación o amplicón de cadena doble) por una ADN polimerasa termorresistente a partir de los iniciadores forward y reverse específicos. Las principales variantes de la PCR son la PCR anidada, la retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR) y la PCR cuantitativa (qPCR) (Mullis y Faloona, 1987; Cobo, 2012).

### ***Secuenciación***

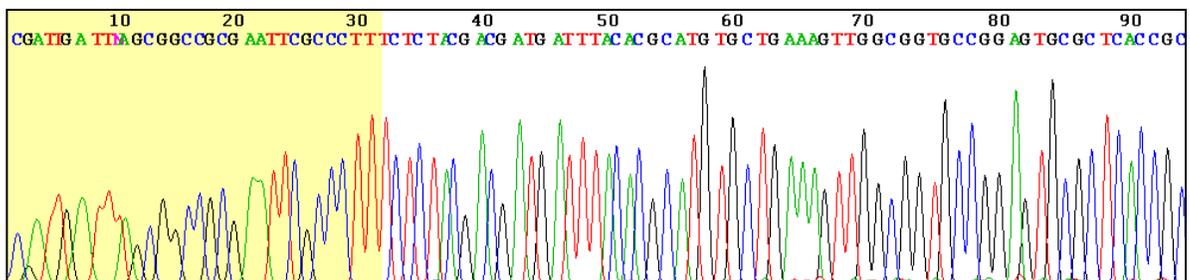
La secuenciación de ácidos nucleicos es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un fragmento de DNA. El desarrollo de la secuenciación del DNA ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología. Así pues, determinar la secuencia de DNA es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en otros campos (Sanger, 1981).

### ***Secuenciación por terminación de cadena***

El método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger necesita una hebra molde de DNA de cadena sencilla, un cebador de DNA, una DNA polimerasa, nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de DNA. La muestra de DNA se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y una DNA polimerasa. En cada reacción se añade solo uno de cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). Estos didesoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer un grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de DNA. La incorporación de un didesoxinucleótido en la cadena naciente de DNA termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de DNA de longitud variable. Los didesoxinucleótidos se añaden a concentraciones lo suficientemente

bajas como para que produzcan todas las posibilidades de fragmentos y al mismo tiempo sean suficientes para realizar la secuenciación (Sanger, 1981; Hernández *et al.*, 1995).

La mayor ventaja de este método es que ya existen opciones para llevar a cabo la secuenciación en una sola reacción, en lugar de cuatro. En una secuenciación por terminador fluorescente se marcan cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos que terminan la cadena con un colorante fluorescente diferente, con fluorescencias a diferentes longitudes de onda. Este método es atractivo por su gran capacidad y rapidez y actualmente es el método de referencia en la secuenciación automatizada con analizadores de secuencia controlados por computadora (Deamer y Akeson, 2000).



**Figura 4. Vista del comienzo de un ejemplo de lectura con el terminador.**

#### ***Análisis Bioinformático.***

Antes de la era de la bioinformática, sólo había dos maneras de llevar a cabo experimentos biológicos: usando un organismo vivo (los llamados in-vivo) o en un medio artificial (in-vitro, del latín en vidrio). Bajo esta analogía, se puede asegurar que la bioinformática es, de hecho, biología in silico por los chips de silicio en que se construyen los microprocesadores. Según la definición del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2001). "Bioinformática, es un campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas tales como: biología, computación y tecnología de la información. El fin último de este campo es facilitar el descubrimiento de nuevas ideas biológicas así como crear perspectivas globales a partir de las cuales se puedan discernir principios unificadores en biología" (Pruitt *et al.*, 2005).

La bioinformática es una disciplina científica emergente que utiliza tecnología de la información para organizar, analizar y distribuir información biológica con la finalidad de responder preguntas complejas en biología, que incluye la colección, organización,

almacenamiento y recuperación de la información biológica que se encuentra en base de datos (Pruitt *et al.*, 2005; Palagi *et al.*, 2006; Saeys *et al.*, 2007).

Al comienzo, el concepto de bioinformática se refería sólo a la creación y mantenimiento de bases de datos donde se almacena información biológica, tales como secuencias de nucleótidos y aminoácidos, sin embargo, el desarrollo de este tipo de base de datos no solamente significaba el diseño de la misma sino también el desarrollo de interfaces donde los investigadores pudieran acceder los datos existentes y suministrar o revisar datos; luego, toda esa información debía ser combinada para formar una idea lógica de las actividades celulares normales, de tal manera que fuera posible estudiar cómo estas actividades se veían alteradas en estados de una enfermedad. A partir de estas necesidades, la bioinformática se convirtió en lo que conocemos ahora: el análisis e interpretación de varios tipos de datos, incluyendo secuencias de nucleótidos y aminoácidos, dominios de proteínas y estructura de proteínas (Pruitt *et al.*, 2005; Saeys *et al.*, 2007).

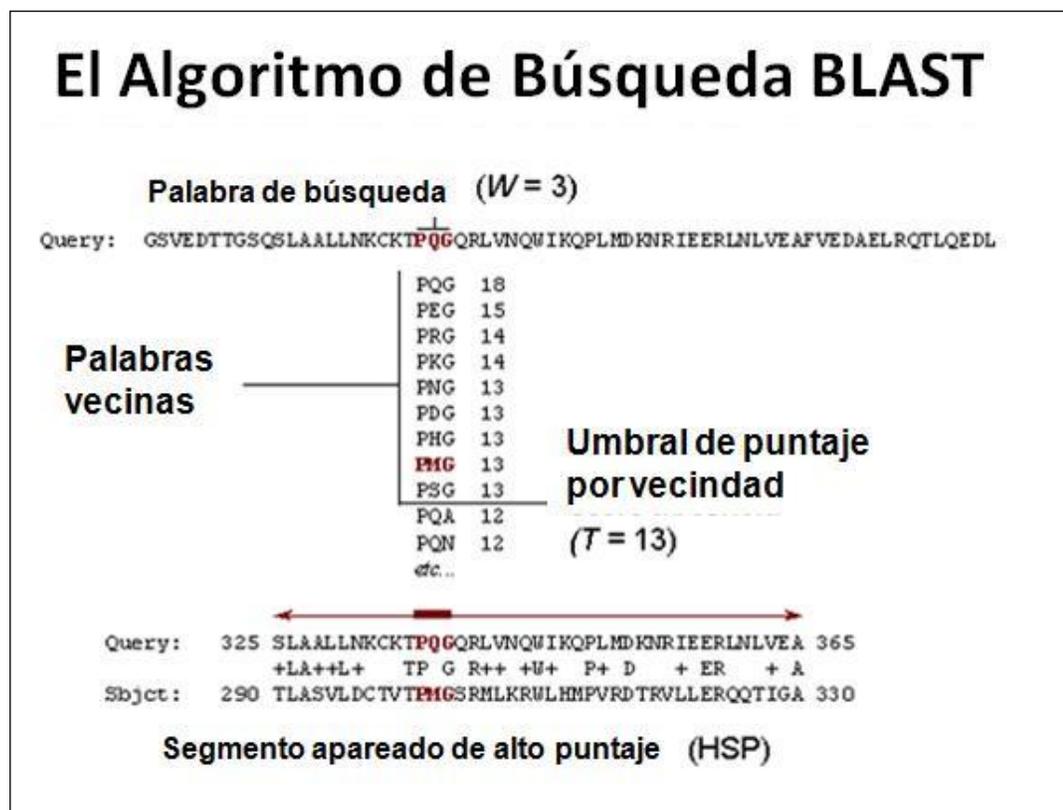
Esta nueva forma de experimentar en Biología se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada y ha estado en el centro de los descubrimientos más importantes de la Biología de nuestra época, tales como el desciframiento del genoma humano, la Biología de sistemas, las nuevas biotecnologías, las nuevas técnicas jurídicas y forenses, así como la medicina personalizada en el futuro (Saeys *et al.*, 2007).

### ***BLAST***

La comparación de secuencias de nucleótidos o proteínas de un mismo organismo, o de diferentes, es una herramienta muy poderosa en Biología molecular. Al encontrar similitudes entre las secuencias, es posible deducir la función de los genes secuenciados recientemente, predecir nuevos miembros de familias de genes, y explorar las relaciones evolutivas entre organismos. La herramienta básica de búsqueda de alineamientos (BLAST) es la herramienta más utilizada para el cálculo de la similitud de una secuencia en estudio con otras secuencias previamente reportadas en las diferentes bases de datos que componen el GenBank (Tatusova y Madden, 1999; Benson *et al.*, 2008).

El algoritmo de BLAST es un programa heurístico, lo que significa que se basa en algunos atajos inteligentes para realizar la búsqueda más rápida. BLAST realiza

alineamientos "locales". Para encontrar los dominios modulares de los ácidos nucleicos y proteínas. El alineamiento local también es capaz de alinear un mRNA con un trozo de DNA genómico, como se requiere frecuentemente para el ensamblaje y análisis del genoma. Cuando se realiza una consulta a través de la página Web de BLAST, la secuencia, además de otra información de entrada, como la base de datos donde se realizará la búsqueda, el tamaño de la secuencia, el valor “E” esperado, y otras, son analizadas con el algoritmo BLAST (Figura 8) (Johnson *et al.*, 2008; Madden, 2013).



**Figura 5. El algoritmo BLAST.** El algoritmo BLAST es un método de búsqueda heurística que busca “palabras” de longitud W con una puntuación mínima T cuando son alineadas con la secuencia y evaluadas con la matriz de sustitución.

## **Diagnóstico molecular de la infección por PVB**

Con el advenimiento de las técnicas de diagnóstico molecular y la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, se han desarrollado diversos métodos para el diagnóstico molecular de la infección por PVB, los cuales tienen por objetivo incrementar la sensibilidad y especificidad de la detección de este agente viral en muestras de tejido o líquidos fisiológicos de los bovinos.

En este sentido, Carvalho *et al.*, desarrollaron un método de PCR acoplado a RFLP que permite la detección y diferenciación simultánea de 2 o más genotipos de PVB (Carvalho *et al.*, 2013). De manera similar, Silva *et al.*, desarrollaron un método de amplificación parcial y secuenciación del gen L1 del PVB que permite identificar y diferenciar los tipos BPV-1 y BPV-2 presentes en verrugas cutáneas de ganado bovino (Silva, 2010).

En lo que respecta a la identificación mediante PCR convencional y secuenciación por terminación de cadena, Rojas-Anaya *et al.*, desarrollaron y validaron un método in-house para la detección de papilomavirus bovino mediante la amplificación de un fragmento de 383 pb del gen E7. Este método fue empleado exitosamente en la tipificación viral de los papilomavirus causantes de infección en Bovinos del estado de Tamaulipas, México (Rojas-Anaya *et al.*, 2016)

### ***PCR con los oligonucleótidos MY y FAP***

Se han desarrollado diferentes estrategias para la detección del PVB en fibromas y fibropapilomas mediante PCR. En este orden de ideas, los oligonucleótidos FAP59/FAP64, diseñados a partir del análisis de regiones conservadas del gen L1 del papilomavirus humano (VPH), además de detectar un amplio espectro de tipos de VPH en tumores cutáneos y piel sana, han demostrado ser de utilidad en la detección de papilomavirus cutáneos de diversas especies, incluyendo los Papilomavirus bovinos tipo 1 - 12. De manera similar, los oligonucleótidos MY09/MY11, diseñados originalmente para detectar tipos de VPH asociados a la mucosa y los genitales, han demostrado ser capaces de amplificar regiones del gen L1 de los tipos 1, 3, 5 6 del PVB (Forslund *et al.*, 1999; Antonsson y Hansson, 2002).

## **Objetivos**

El objetivo general de este trabajo fue determinar la presencia de diferentes tipos de PVB en muestras de tejidos de bovinos con lesiones cutáneas con diagnóstico histopatológico positivo para papilomas y fibropapilomas provenientes de diferentes regiones del estado de San Luis Potosí.

### ***Objetivos específicos***

- Obtener biopsias incisionales y excisionales de lesiones sugerentes de papilomas, fibromas, fibropapilomas y carcinomas de células escamosas de piel de bovinos de diferentes regiones del estado de San Luis Potosí para su caracterización histopatológica.
- Detectar mediante PCR punto final la presencia de Papilomavirus bovino en las muestras obtenidas.
- Identificar el tipo viral al que pertenece el Papilomavirus presente por medio de la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos por la técnica de Sanger
- Describir las relaciones filogenéticas y evolutivas entre los diferentes tipos de Papilomavirus encontrado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tipo de estudio y diseño general**

Se trata de un estudio transversal descriptivo sobre la frecuencia de presentación de los diferentes tipos de PVB que causan papilomas, fibromas y fibropapilomas en el ganado bovino, tipo de lesiones provocadas por la infección, localización anatómica de las lesiones y ubicación geográfica de los animales.

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia que incluyó 16 bovinos que presentaron lesiones sugerentes de papilomas, fibromas y fibropapilomas en las regiones Centro y Huasteca del estado de San Luis Potosí. Los datos colectados se emplearon para construir una base de datos con el programa Microsoft® Excel® y se empleó el programa Epi Info 7® para la construcción de los mapas (Dean, 2011).

### **Colección de especímenes**

Se obtuvieron biopsias incisionales y excisionales de piel de bovino con lesiones sugerentes de fibromas, papilomas, fibropapilomas de 16 animales de las regiones Centro y Huasteca del estado de San Luis Potosí. (Figura 3 y Cuadro 5)

El tejido diseccionado se fragmento en porciones pequeñas las cuales se dividieron para su estudio en 2 partes: la primera porción se colocó en tubos Falcón de 15 ml con formaldehído al 10%, para su evaluación histopatológica y la segunda porción se colocó en buffer PBS pH 7.2 para la realización de PCR.

Las muestras en PBS se colocaron en un contenedor criogénico y se transportaron a los Laboratorios de Inmunología y Virología de la Facultad de Agronomía de la UASLP para su procesamiento. Las muestras colocadas en formaldehído fueron transportadas a temperatura ambiente al mismo laboratorio.

## **Caracterización Histopatológica**

Las biopsias obtenidas se fragmentaron en porciones pequeñas las cuales se dividieron para su estudio en 2 partes: la primera porción se colocó en tubos Falcón de 15 ml con formaldehído al 10%, para su evaluación histopatológica.

## **Extracción y Cuantificación de ADN**

Para la extracción de ADN de las muestras colectadas, las muestras obtenidas se transportaron en PBS con etanol al 50% (pH=7.2) a 4°C.

Se seccionaron 25 mg de tejido y se sometieron a digestión alcalina con proteinasa K (Qiagen, Valencia, California, EUA) pH 8.0 a 37 °C durante 24 horas a 60°C hasta lograr la disgregación del tejido. Posteriormente, para la extracción del DNA se empleó el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, California, EUA) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante.

Para comprobar la pureza y cuantificar el ADN extraído, se empleó un microespectrofotómetro de gota Nano-200 (All sheng, Beijing, China).

## **PCR**

El DNA se sometió a la amplificación por PCR con oligonucleótidos para BPV con los oligonucleótidos FAP59 (forward; 5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') y FAP64 (reverse; 5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3') (Forslund *et al.*, 1999; Ogawa, *et al.*, 2004), para la amplificación de un fragmento de 480pb.

Se prepararon mezclas de PCR de 50µl con el kit para PCR Invitrogen (Invitrogen, Massachusetts, USA) conteniendo: buffer 1×, DNTp 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Oligonucleótidos 20 pM y 5 UI de Taq polimerasa y 10 ng de ADN. Las mezclas se colocaron en un Termociclador Multigene Optimax (LabNET, California, USA). El programa del termociclador consistió en 10 min de desnaturalización inicial a 94°C, 45 ciclos de 90 seg a 94° C, 90 seg a 50°C, 90 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

5  $\mu$ l del producto de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de TAE-Agarosa al 1%. La electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 80V durante 80 minutos, transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio (Sigma - Aldrich, Missouri, EUA) y la imagen se capturó con un fotodocumentador Gel Doc EZ System (BioRad, Hercules, California, EUA).

Para corroborar los resultados de la PCR con el set de oligonucleótidos FAP59/FAP64, se prepararon mezclas de PCR con los oligonucleótidos MY09/MY11, que generan un amplicón de 480 pb.

Se empleó el kit para PCR Invitrogen (Invitrogen, Massachusetts, USA) para preparar mezclas de 50  $\mu$ l. Estas mezclas contenían: buffer 1 $\times$ , DNTp 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2mM, oligonucleótidos 20 pM y 5 UI de Taq polimerasa y 10 ng de ADN. Estas mezclas se colocaron en un Termociclador Multigene Optimax (LabNET, California, USA). Para los oligonucleótidos MY09/MY11, el programa de PCR consistió en 10 min de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de 90 seg a 94° C, 60 seg a 50°C, 90 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis de 5  $\mu$ l del producto en gel de TAE-Agarosa al 2%. La electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 80V durante 80 minutos, transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio (Sigma - Aldrich, Missouri, EUA) y la imagen se capturó con un fotodocumentador Gel Doc EZ System (BioRad, Hercules, California, EUA).

### **Purificación de los amplicones**

Para purificar los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos FAP59 / FAP64, se prepararon mezclas que contenían 45  $\mu$ l del amplicón de PCR, 1/5 del volumen de Acetato de Sodio 3M y 4/5 de volumen de Isopropanol. Estas Mezclas fueron refrigeradas a -80 °C durante 15 minutos, para permitir la precipitación del ADN y, posteriormente, fueron centrifugadas durante 20 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.

El DNA precipitado fue lavado con 1 ml de Etanol al 95% y centrifugado durante 20 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se permitió

la evaporación del etanol a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 12µl de buffer TE 1× (pH 8.0) y se cuantificó mediante espectrofotometría.

### **Secuenciación de amplicones e identificación de secuencias de ADN**

La concentración de los productos de PCR purificados se ajustó a 50 ng/µl con buffer TE 1× (pH 8.0). La pureza de los amplicones así como la concentración de éstos fue determinada mediante espectrofotometría.

Se prepararon mezclas con 5 µl del amplicón de PCR purificado y 5 µl del oligonucleótido FAP 59 y se enviaron a secuenciación mediante el método de terminación de cadena con ddNTP's (Macrogen inc., Seoul, Rep. de Korea).

Para establecer la identidad de los tipos virales, se realizó el alineamiento de las secuencias de los productos de PCR en la colección de nucleótidos de la base de datos del NCBI utilizando el programa Mega BLAST (Altschul *et al.*, 1990). La identificación de una secuencia mediante alineamiento de nucleótidos se dio por válida si cumplía con los siguientes criterios en el alineamiento: Porcentaje de identidad  $\geq 99\%$ , Valor E  $\leq 1 \times 10^{-6}$  y Porcentaje de cobertura del alineamiento  $\geq 99\%$  como criterios principales para identificar las secuencias en los alineamientos.

### **Análisis filogenético**

Se realizó una comparación filogenética entre los aislamientos y la secuencia modelo de PBV Tipo 1 disponible en Genbank (Accesion No.: NC\_001522.1) (Benson *et al.*, 2012) para construir el árbol filogenético de los papilomavirus circulantes identificados.

Se utilizó el programa MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) para realizar el alineamiento de las secuencias con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Con este alineamiento construimos un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud con el modelo Jukes and Cantor (Jukes y Cantor, 1969).

### **Análisis estadístico**

Utilizamos el programa Open Epi versión 3.01 (Sullivan *et al.*, 2009) para construir tablas de contingencia 2x2 y se utilizaron pruebas de independencia  $\chi^2$  para evaluar la dependencia de la infección por PVB con las variables edad, raza, tipo de explotación y fin productivo de los animales. Se estableció un valor de significancia de  $p=0.05$ .

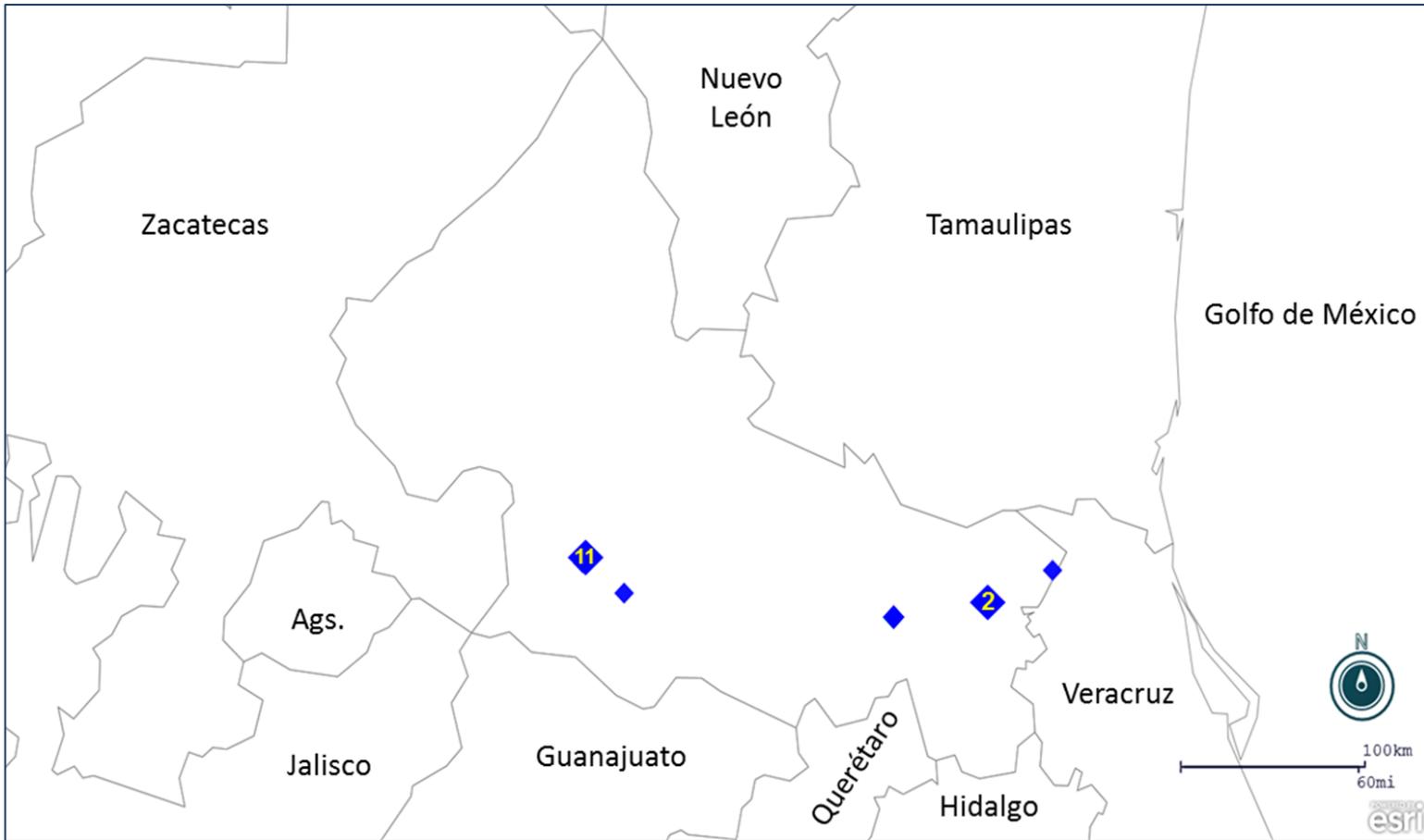
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los animales muestreados provenían de la región centro del estado de San Luis Potosí, concretamente, del municipio de Soledad de Graciano Sánchez (56.25%; n=9), el resto provenía de distintos municipios de las regiones media y huasteca del estado de San Luis Potosí (Cuadro 3). La raza que se muestreo con mayor frecuencia fue la raza Holstein (n=9; 56.25% del total de animales muestreados) y el resto de los animales eran cruza de Suizo, Cebú, Charolais y Lidia (Cuadro 3).

La edad promedio de los animales que presentaron lesiones sugerentes de infección por PVB durante el periodo de estudio fue de 11 meses al momento del muestreo, con un rango de 5 – 18 meses de edad (Cuadro 3). 37% de los animales muestreados eran machos (n= 6), el restante 62.5 % correspondió a hembras. El 75% (n= 12) de los animales muestreados provenían de sistema de producción estabulados, el 12.5% (n=2) provenía de sistema de producción semi-estabulado, los animales restantes provenían de sistema de producción en agostadero. 56.25 % (n=9) de los animales eran criados con fines de producción de leche; el 37.5% (n=6) eran criados con fines de producción de carne, el resto de los animales tenían fines de exhibición.

**Cuadro 3 Características de los bovinos incluidos en el muestreo.**

ID	Raza	Edad	Sexo	Sistema de Producción	Ubicación
1	Suizo-Cebú	18 meses	hembra	Estabulado	Tamuín, S.L.P.
2	Suizo-Cebú	5 meses	macho	Agostadero	Ébano, S.L.P.
3	Lidia	6 meses	macho	Estabulado	Villa de Reyes, S.L.P.
4	Cruza de Suizo	6 meses	macho	Semi-estabulado	Villa de Zaragoza, S.L.P.
5	Holstein	1 año 3 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
6	Holstein	10 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
7	Holstein	10 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
8	Holstein	1 año	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez
9	Holstein	1 año 1 mes	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
10	Cruza de Cebú	7 meses	macho	Agostadero	Tamuín, S.L.P.
11	Cruza de Suizo	8 meses	macho	Semi-estabulado	Tamasopo, S.L.P.
12	Holstein	1 año 6 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
13	Holstein	1 año	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
14	Holstein	11 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
15	Holstein	1 año 2 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
16	Cruza de Charolais	1 año	macho	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.



**Figura 6. Sitios de muestreo y colección de especímenes.**

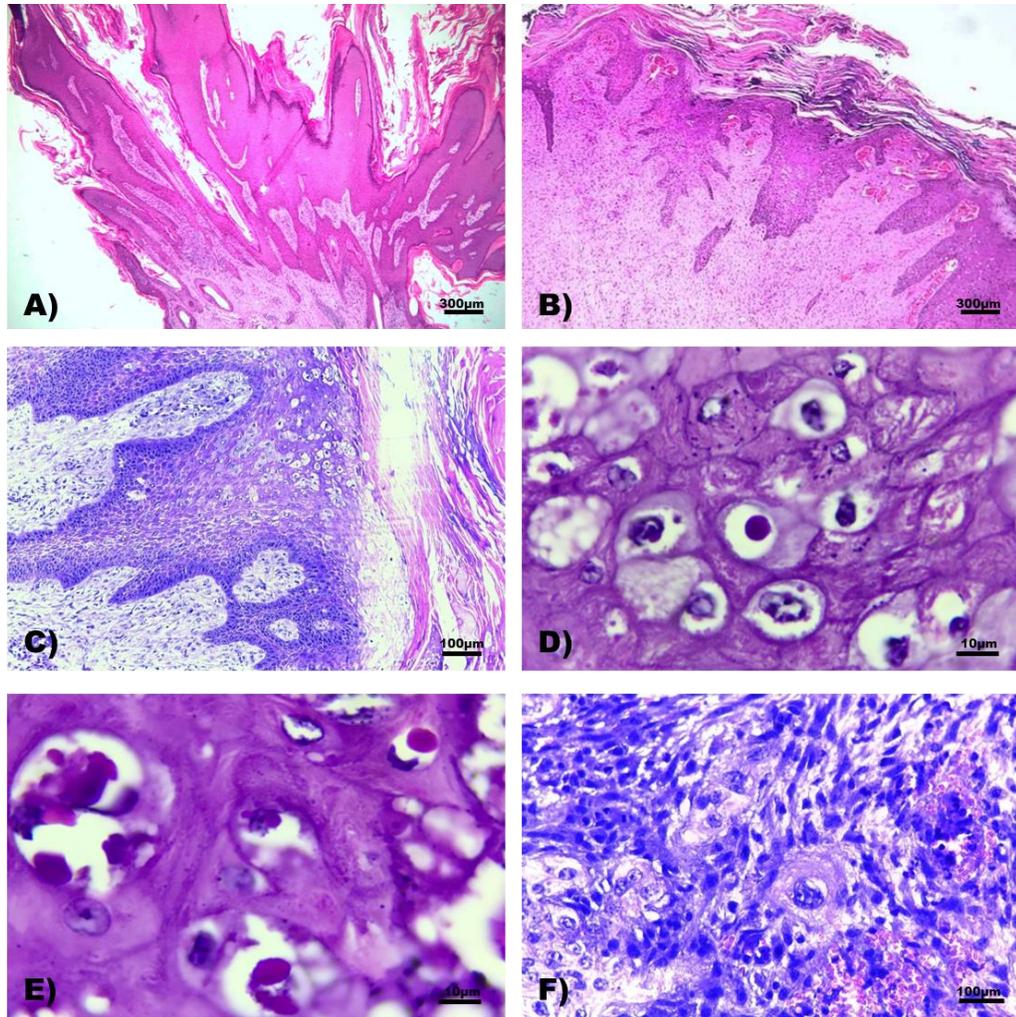
## **Caracterización Histopatológica**

En las secciones histológicas de piel, la epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada multifocal, así como presencia de erosiones, úlceras multifocales y costras serocelulares, además en algunas secciones emite proyecciones papilares sostenidas por estroma fibrovascular que alterna con colágena densa. Así mismo, algunos queratinocitos de los diferentes estratos de la epidermis presentan degeneración balonoide u en algunos de ellos se observaron estructuras anfólicas amorfas intranucleares compatibles con cuerpos de inclusión. En la dermis adyacente se observa proliferación de tejido conectivo fibroso maduro, entremezclado con fibroblastos reactivos, colágena densa, vasos linfáticos de nueva formación, así como múltiples agregados de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Además en una de las secciones de tejido examinadas se aprecian células epiteliales atípicas dispersas, las cuales exhiben pérdida de la relación núcleo citoplasma, abundante citoplasma intensamente eosinofílico; núcleo grande, con escotaduras, cromatina desplazada a la periferia y uno a tres nucléolos evidentes.(Figura 2)

Las lesiones histopatológicas observadas fueron sugerentes de un proceso hiperplásico/neoplásico de tipo viral compatibles con fibromas y fibropapilomas. Los diagnósticos histopatológicos definitivos se resumen en el cuadro 2.

**Cuadro 4 Finalidad de explotación de los bovinos, resultados histopatológicos y de PCR de las muestras obtenidas.**

<b>ID</b>	<b>Propósito de cría</b>	<b>Caracterización Histopatológica</b>
1	Carne	Fibroma
2	Carne	Fibropapiloma
3	Exhibición	Fibropapiloma
4	Carne	Fibroma
5	Leche	Fibropapiloma
6	Leche	Fibropapiloma
7	Leche	Fibroma
8	Leche	Fibroma
9	Leche	Papiloma
10	Carne	Fibroma
11	Carne	Fibropapiloma
12	Leche	Papiloma
13	Leche	Fibropapiloma
14	Leche	Fibropapiloma
15	Leche	Fibropapiloma
16	Carne	Fibroma



**Figura 7. Lesiones histopatológicas representativas, encontradas en el ganado muestreado.** A) Fibropapiloma. La epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada difusa así como formación de proyecciones papilares sostenidas por estroma fibrovascular. H&E, 4X; B) Fibroma: La epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada difusa, en la dermis se observa proliferación de tejido conectivo fibroso entremezclado con vasos sanguíneos congestionados y agregados de linfocitos y células plasmáticas. H&E, 4X; C) Fibroma: La epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada, además se observa degeneración balonoide de los queratinocitos en diferentes estratos; en la dermis se aprecia proliferación de fibroblastos reactivos y agregados de linfocitos y células plasmáticas. H&E, 10X; D y E) Fibroma. Los queratinocitos exhiben degeneración balonoide y presencia de estructuras anfólicas amorfas compatibles con cuerpos de inclusión. H&E, 100X; F) Fibroma. Algunas células epiteliales exhiben marcada anisocariosis con pérdida de la relación núcleo citoplasma, abundante citoplasma intensamente eosinofílico; núcleo grande, con escotaduras, cromatina desplazada a la periferia y uno a tres nucléolos evidentes. H&E, 40X.

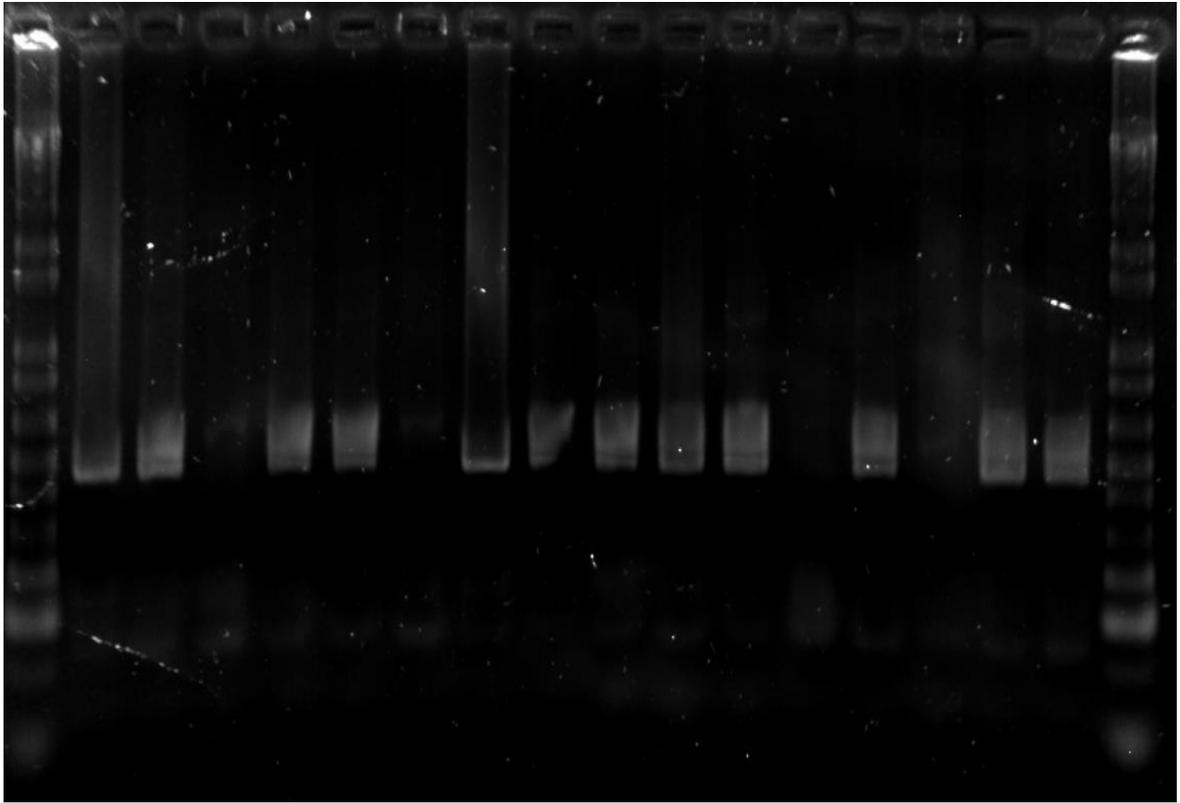
## Extracción de ADN y PCR

El rendimiento promedio del proceso de extracción de ADN fue de 165.43 ng/ $\mu$ l, con un valor medio de Absorbancia a  $\lambda$ 260 nm =3.3. Este valor sugiere, de acuerdo con las indicaciones del fabricante del kit de extracción empleado, que durante el procedimiento de extracción se pudo haber co-purificado ARN. La relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  arrojó un valor promedio de 1.85, valor muy cercano al recomendado para emplear el producto de esta extracción en una PCR (Cuadro 5) (Group, 2006).

**Cuadro 5 Cuantificación de ADN extraído de las muestras.**

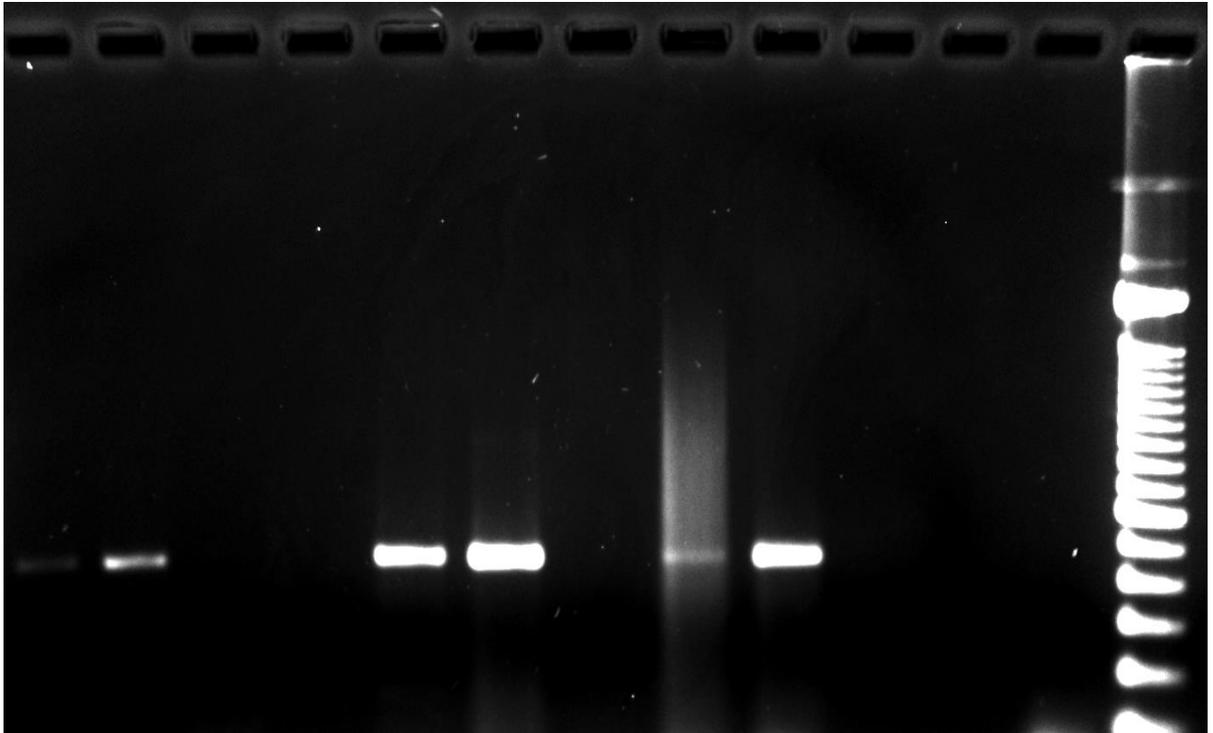
<b>Muestra</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>	<b><math>A_{260}</math></b>	<b>Relación <math>A_{260}/A_{280}</math></b>
<b>1</b>	138	2.76	1.86
<b>2</b>	158.1	3.163	1.89
<b>3</b>	213.4	4.269	1.88
<b>4</b>	189.58	3.792	1.86
<b>5</b>	140.84	2.817	1.86
<b>6</b>	59.84	1.197	1.88
<b>7</b>	91.23	1.825	1.86
<b>8</b>	138.1	2.762	1.86
<b>9</b>	110.61	2.212	1.84
<b>10</b>	210.74	4.215	1.86
<b>11</b>	154.52	3.09	1.8
<b>12</b>	154.8	3.096	1.86
<b>13</b>	269.33	5.387	1.88
<b>14</b>	211.4	4.228	1.86
<b>15</b>	278.75	5.575	1.86
<b>16</b>	127.73	2.555	1.84

En la reacción de amplificación con los oligonucleótidos FAP59/FAP64, observamos un amplicón de entre 480 a 538pb en las muestras 1, 2, 9, 10 y 11 (45.45% del total de las muestras) correspondiente al producto de la amplificación por PCR del gen L1 del PVB. En las muestras 1, 4 y 7 (27.27% del total de las muestras) no se observó ningún producto de PCR. De manera global, hasta un 72% de las muestras fueron positivas para secuencias de ADN correspondientes a secuencias del gen L1 del virus del PVB.



**Figura 8. Producto de PCR con los oligonucleótidos FAP59/FAP64.** Carril 1: Muestra 5, amplicón de 485 pb. Carril 2: Muestra 6, amplicón de 511 pb; Carril 7: Muestra 10, amplicón de 521 pb; Carril 9: Muestra 11, amplicón de 515 pb; Carril 11: muestra 4, amplicón de 513 pb. Carril 12: Control negativo (Sin DNA); Carril 13: Escalera de 100 pb. Carriles 3, 4, 5, 6 y 8: No se observa producto de PCR.

El análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos MY09/MY11 mostró la presencia de bandas de entre 470 a 490 pb en las muestras 1, 2, 5, 6, 8 y 9 (54.5% del total de las muestras), este amplicón es coincidente con el esperado para la PCR del gen L1 del virus del PVB.



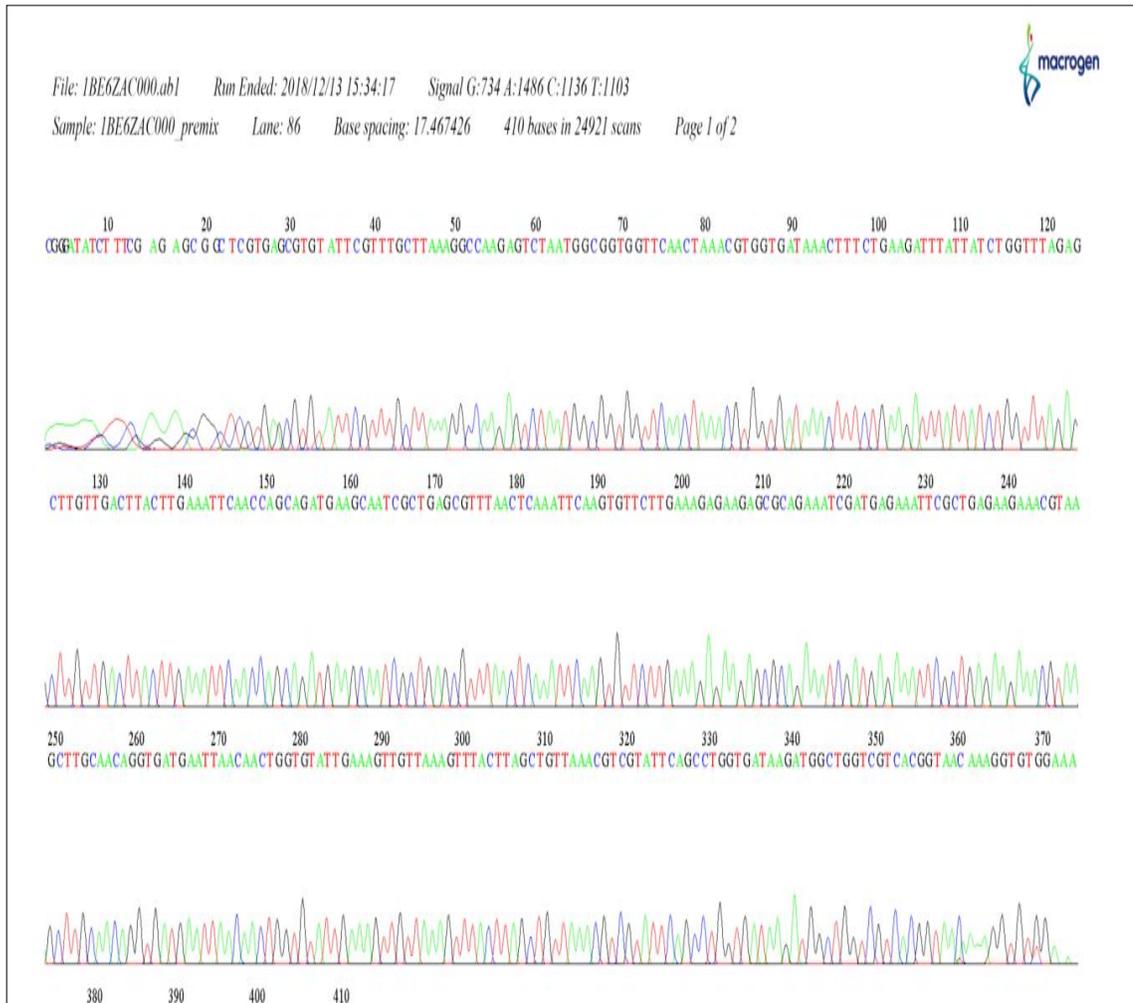
**Figura 9. PCR con los oligonucleótidos MY09/11.** Carril 1: Muestra 5, amplicón de 472 pb. Carril 2: Muestra 6, amplicón de 479 pb; Carril 5: Muestra 9, amplicón de 492 pb, Carril 6: Muestra 1, amplicón de 488 pb; Carril 8: muestra 3, amplicón de 483 pb. Carril 9: Muestra 4, amplicón de 486 pb Carril 12: Control negativo (Sin DNA); Carril 13. Escalera de 100 pb. Carriles 3, 4, 7, 10 y 11: No se observa producto de PCR.

### **Identificación de los tipos virales mediante secuenciación**

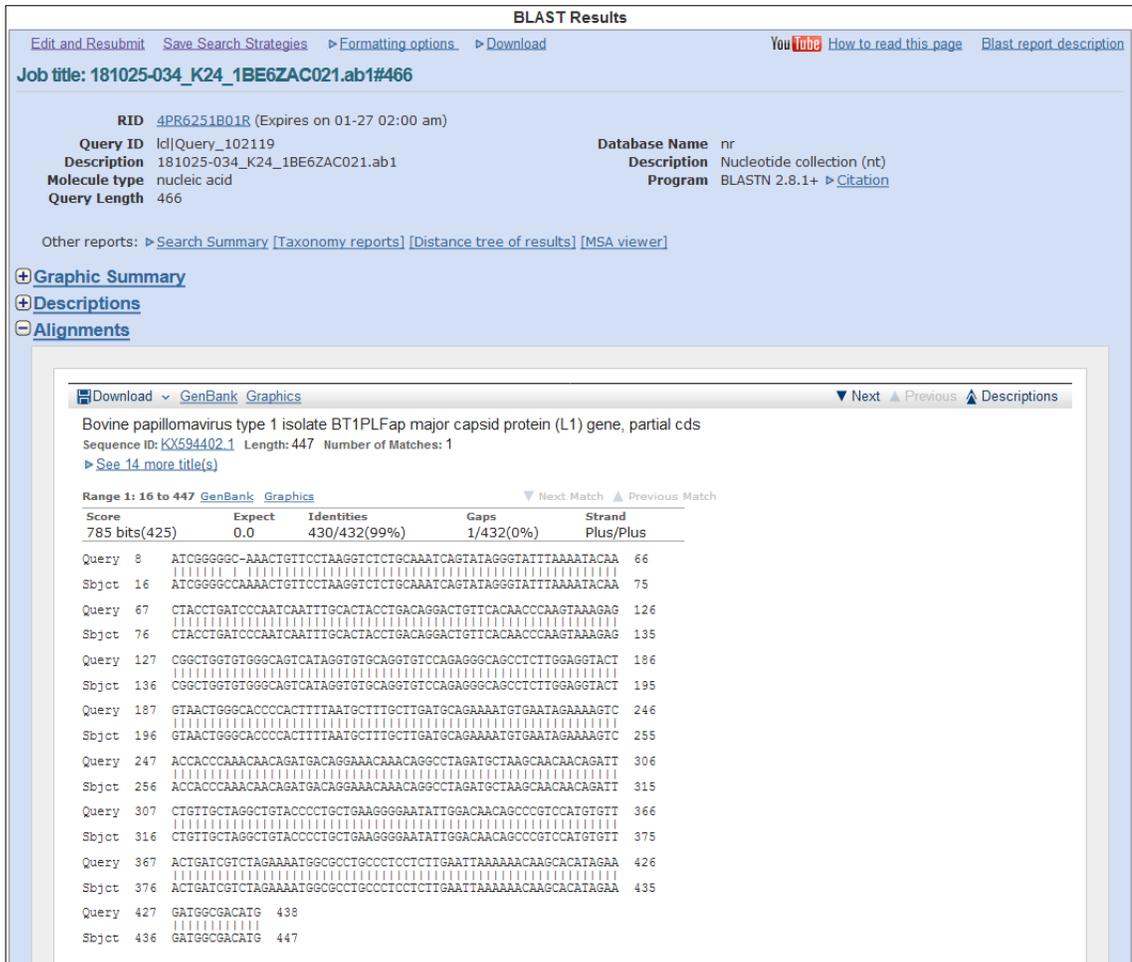
En el 100% de los animales muestreados se detectaron secuencias de algún tipo de PVB. De las 16 muestras secuenciadas en el 75% de los casos se pudo identificar algún tipo de Papilomavirus bovino mediante alineamiento. 2 muestras secuenciadas no dieron resultados en el BLAST y en otras dos no se pudo llevar a cabo la secuenciación, por la probable asociación de más de un tipo viral detectable mediante PCR con los oligonucleótidos FAP.

El 8.3% (n=1) de las muestras secuenciadas e identificadas correspondieron a PVB tipo 2. De la misma manera, otro 8.3% (n=1) de las muestras secuenciadas e identificadas correspondieron a PVB tipo 26. El restante 83.3% (n=10) de las muestras se identificaron como PVB tipo 1, de entre las cuales se identificaron dos aislamientos diferentes, 8

pertenecientes al aislamiento BT1PLFap y 2 pertenecientes al aislamiento IPV 11 (Bezerra, 2016; Szczerba-Turek, 2016).



**Figura 10. Resultado representativo de la secuenciación de uno de los productos de PCR.**



**Figura 11. Ejemplo de alineamiento de las secuencias.**

### Relaciones filogenéticas de los aislamientos

Con base en la comparación filogenética de los distintos PVB encontrados en el estado con el modelo de PVB tipo 1 el dendograma muestra dos grupos primarios; a partir de uno de los cuales se generan tres grandes clados, los cuales identificamos como A, B y C. Los clados A y C están compuestos en su mayoría por PVB tipo 1 BT1PLFap, el A, además presenta un grupo formado únicamente por PVB tipo 1 IPV 11 y el clado C está compuesto por PBV tipo 2 y PVBt tipo 26.

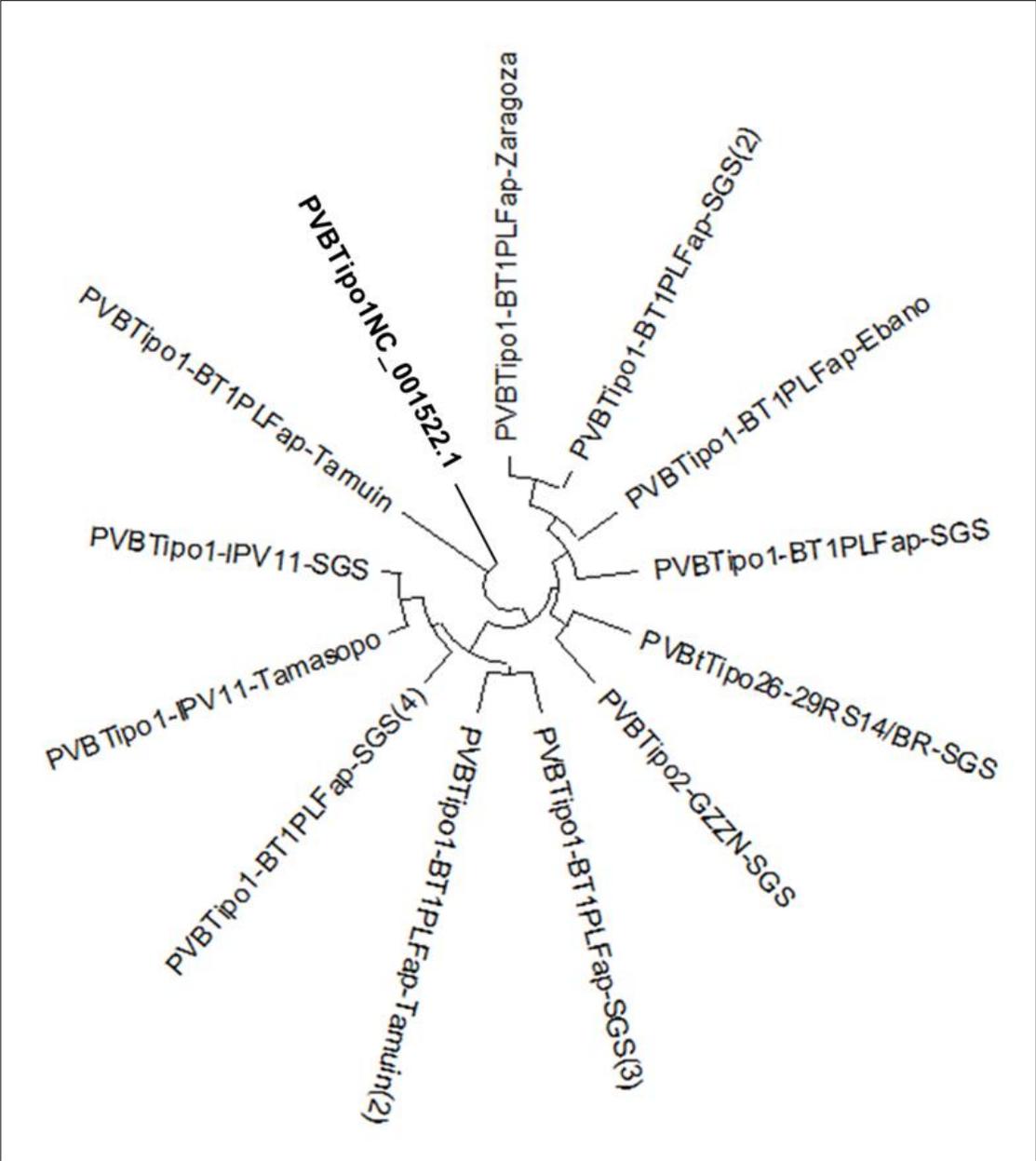


Figura 12. Árbol filogenético de los PVB identificados.

## Distribución geográfica de los aislamientos

En lo que respecta a la zona centro del estado de San Luis Potosí se encontró mayor prevalencia del PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento BT1PLFap 62.5% (n=5). También se encontraron PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento IPV 11, PVB tipo 2 y Papilomavirus Bos taurus (PVBt) tipo 26.

En la zona huasteca se encontró mayor prevalencia del PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento BT1PLFap 75% (n=3). También se encontró PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento IPV 11. Figura 12

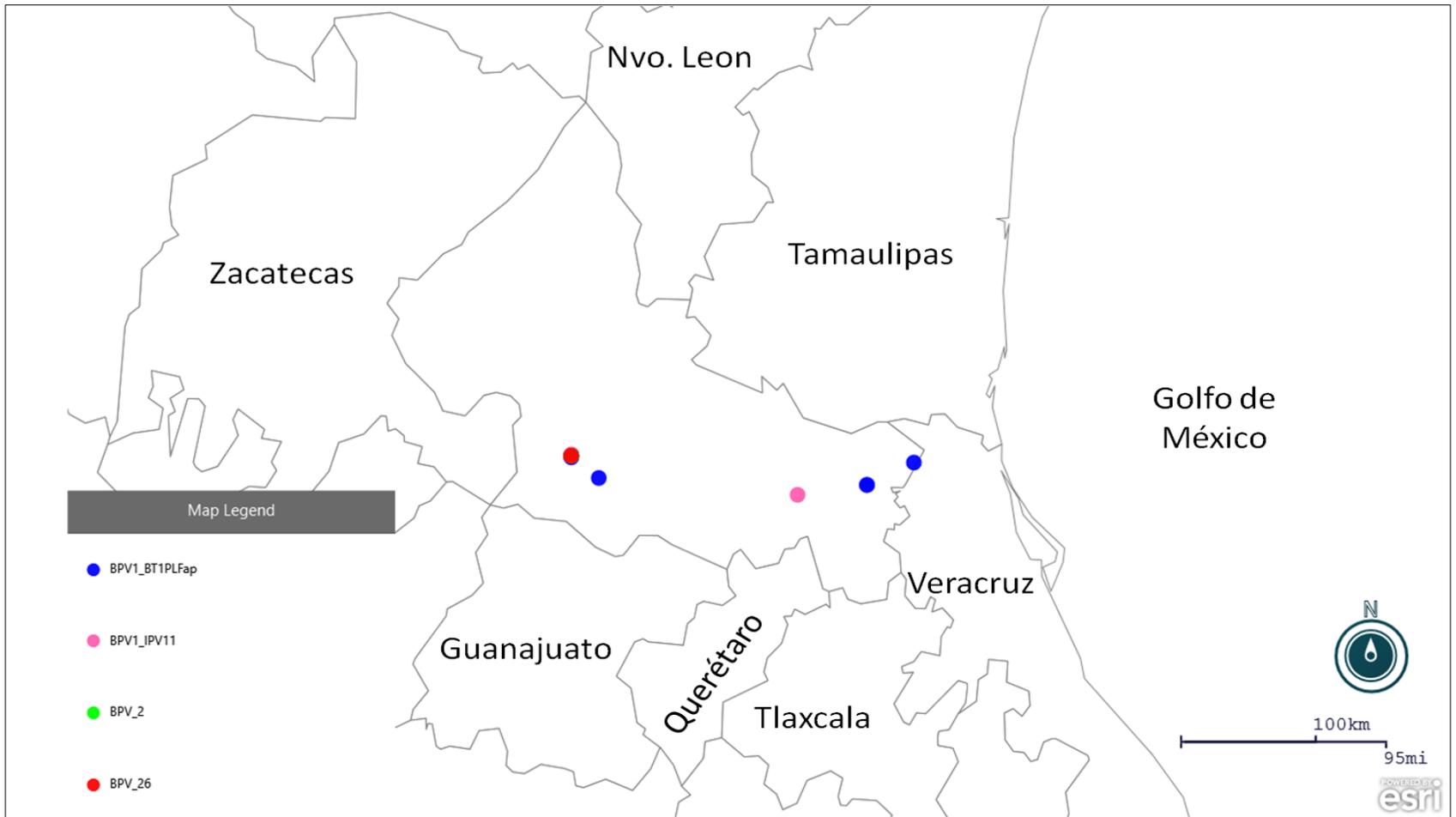
No se observó una distribución geográfica tipo-específica de los PV tipo 1 encontrados, sin embargo el PBV tipo 2 y PBbt tipo 26 provenían de la misma zona del estado.

## Análisis estadístico

La Prueba de  $\chi^2$  de independencia entre la infección por PVB, la raza, el sistema de producción, fin productivo del rancho y la región de origen del ganado demostró que los bovinos infectados por PVB tuvieron 517 veces el riesgo de desarrollar formas generalizadas de fibropapilomatosis en comparación con aquellos que no estaban infectados con PVB. (Cuadro 6).

**Cuadro 6 Prueba de  $\chi^2$  de independencia entre la infección por PVB y diversas características de los animales muestreados.**

Característica	Odds Ratio	Intervalo de confianza	Valor-p
Raza	1.05	0.3114 – 3.5407	0.4665
Fin productivo	0.95	0.2824 – 3.2115	0.4665
Sistema de producción	1.38	0.3955 – 4.8780	0.3155
Forma sistémica de la enfermedad	517.30	38.9898 – 4011.82	< 0.001
Región de origen (Centro / Media-Huasteca)	1.32	0.3305 – 4.73	0.3279



**Figura 13 Localización de los aislamientos virales.** Los puntos del mapa muestran las regiones del estado de San Luis Potosí de donde provenían las muestras incluidas en este trabajo y el tipo viral identificado mediante secuenciación de producto de PCR.

Este es el primer trabajo que describe los diferentes tipos de papilomavirus que infectan el ganado bovino en el estado de San Luis Potosí. Además, se caracterizaron las secuencias del marco de lectura abierto del gen L1 de los papilomavirus bovinos, criterio mundialmente aceptado para establecer la identidad (a nivel de secuencia de ácidos nucleicos) de los papilomavirus humanos y no humanos (Bzhalava *et al.*, 2015).

A la evaluación histopatológica las lesiones más frecuentemente observadas en los fragmentos examinados de piel, fueron la hiperplasia irregular de la epidermis, hiperqueratosis marcada difusa, degeneración balanoide de queratinocitos y en la dermis la proliferación de fibroblastos reactivos, tejido conectivo fibroso y agregados de linfocitos y células plasmáticas. Estas características han sido señaladas en extenso como lesiones sugerentes de una infección por Papilomavirus (Jang *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2012; Violet *et al.*, 2017).

La mayoría de las lesiones examinadas fueron sugerentes de fibromas, sin embargo es importante considerar que algunos papilomas y fibropapilomas pueden presentar regresión o cambios morfológicos durante su evolución que los hacen semejar fibromas en función de la cronicidad y estado inmunológico del animal. Dado que la etiología y evolución de estas lesiones pueden seguir un patrón común, es probable que la incidencia de fibromas en el ganado del estado de San Luis potosí se encuentre sobreestimada en función del momento en que los animales fueron muestreados (Jang *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2010).

Las muestras incluidas en este estudio provenían de piel de diferentes regiones anatómicas de bovinos sin que se observara un patrón de restricción de las lesiones a una zona determinada en el cuerpo del animal. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Borzacchiello y cols. quienes señalan que la presentación de lesiones cutáneas en la infección por PVB puede ser de manera generalizada y que además el sitio de aparición de estas lesiones se pueden correlacionar con el tipo viral involucrado (Borzacchiello y Roperto, 2008).

En este trabajo, detectamos, mediante PCR, ADN de papilomavirus bovino en el 100% de las muestras colectadas. Este dato concuerda con lo reportado en estudios previos realizados en Japón, empleando la misma pareja de oligonucleótidos FAP-59 / FAP-64 (Ogawa *et al.*, 2004). Sin embargo, la frecuencia de presentación de PVB contrasta con lo

reportado por Rojas – Anaya quienes reportan de 2 a 70% de muestras positivas en el estado de Tamaulipas, México (Rojas-Anaya *et al.*, 2016). Estas diferencias en la frecuencia de presentación de PVB podrían deberse, en parte, al empleo de un set de oligonucleótidos diferentes, por lo que es necesario realizar una comparación entre la sensibilidad de ambos juegos de oligonucleótidos.

Las infecciones por papilomavirus se han descrito a lo largo de todo el mundo aunque no todos los genotipos presentan la misma prevalencia regional (Charry e Hinojosa, 2011; Díaz *et al.*, 2012; Orozco y Padilla, 2016). E inclusive se ha sugerido la posible existencia de una asociación entre el tipo de clima y los genotipos de PVB circulantes (Violet *et al.*, 2017). En este trabajo se incluyeron muestras colectadas de bovinos de las regiones Centro y Huasteca del estado de San Luis Potosí, las cuales poseen climas muy diferentes entre sí (seco árido en el centro y subtropical en la huasteca). Nuestro estudio encontró una mayor frecuencia de presentación de PVB tipo 1 sin limitación climatológica evidente, dato que contrasta con lo reportado por rojas Anaya y cols (Rojas-Anaya *et al.*, 2016), quienes reportan proporciones similares de PVB tipo 1 y PVB tipo 2 (53% y 47% respectivamente) para una población de bovinos en el estado vecino de Tamaulipas, México.

El hallazgo del aislamiento BT1PLFap del PVB tipo 1 en México podría explicarse por dos razones probables. Primero que haya existido movilización de ganado de Polonia a México o viceversa en los últimos seis meses o que el tipo viral identificado inicialmente en Polonia no se encuentra restringido al país o incluso al continente europeo, sino que presente una distribución cosmopolita o al menos en todo el hemisferio norte. Ninguna de las dos opciones ha podido ser confirmada o descartada por lo que son necesarios más estudios enfocados a la evolución de este aislamiento (Szczerba-Turek, 2016). De la misma forma, los aislamientos del PVB tipo 2 y PVBt tipo 26 apenas fueron identificados en Brasil, entre el año 2016 y 2017 (Daudt, 2017; Zhang, 2017). Su presencia en México se podría explicar por alguna de las dos razones anteriormente descritas sin embargo son necesarios más estudios para confirmar o rechazar dichas opciones.

## CONCLUSIONES

En las regiones huasteca y centro del estado de San Luis Potosí el PVB tipo 1 es el principal causante de lesiones cutáneas sugerentes de papilomas, fibromas y fibropapilomas en ganado bovino sin restringirse a una localización geográfica, tipo de explotación o fin zootécnico sin embargo no se debe menospreciar la presencia de los PVB tipo 2 y PVBt tipo 26 en las unidades de producción del estado.

A la evaluación histopatológica, la mayoría de las lesiones mostraron características que las clasificaban como fibromas o fibropapilomas, sin embargo, es importante considerar que, debido a la capacidad de algunos papilomas y fibropapilomas de presentar regresión o cambios morfológicos que los hacen semejar fibromas, en función de la cronicidad y estado inmunológico del animal, es probable que la incidencia de fibromas en el ganado muestreado se encuentre sobreestimada.

Los tipos de PVB identificado en las muestras incluidas, no parece seguir un patrón de distribución anatómico o geográfico en particular sino que, la mayoría de las lesiones cutáneas se presentaron de forma generalizada y sin distinción de las características geográficas o climatológicas en donde habita el animal.

La infección por distintos tipos del PVB es importante debido a que afecta parámetros productivos ocasionando retraso en el desarrollo, disminución en ganancia de peso y las consecuentes pérdidas económicas y predisposición a la presentación de infecciones secundarias y/o de neoplasias malignas. Continuar con la identificación de los tipos virales circulantes en el ganado del estado de San Luis Potosí permitirá caracterizar patrones de distribución específicos (clúster) y el desarrollo de biológicos efectivos específicamente contra estos tipos virales.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, R. E. B. and J. Berumen Campos (2009). "Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano." *Dermatología Revista Mexicana* 53(5): 234-242.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- Antonsson, A. and B. G. Hansson (2002). "Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts." *Journal of Virology* 76(24): 12537-12542.
- Aragón-Franco, F. R., C. R. López-Macías, et al. (2010). "El papel de los Toll Like Receptors (TLRs) en la respuesta inmune innata contra el cáncer cérvico-uterino." *Revista de Sanidad Militar* 64(6): 287-299.
- Banks, L., G. Matlashewski, et al. (1987). "Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization." *Journal of general virology* 68(12): 3081-3089.
- Benson, D. A., M. Cavanaugh, et al. (2012). "GenBank." *Nucleic acids research* 41(D1): D36-D42.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, et al. (2008). "GenBank." *Nucleic acids research* 36(Database issue): D25.
- Bernard, H.-U., R. D. Burk, et al. (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." *Virology* 401(1): 70-79.
- Bezerra, A. A., Bertagnolli, A.C., Nunes, R., dos Reis, E.M., Varela, A.P.M., Roehe, P.M., Cavali, L.S. and Mayer, F.Q. (2016). Molecular and histological characterization of bovine papillomavirus from southern Brazil. U. S. N. L. o. M. National Center for Biotechnology Information. Rio Grande do Sul, Brasil, FEPAGRO Saude Animal.
- Blowey, R. and A. D. Weaver (2011). *Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- Borzacchiello, G. and F. Roperto (2008). "Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle." *Veterinary research* 39(5): 1.
- Bzhalava, D., C. Eklund, et al. (2015). "International standardization and classification of human papillomavirus types." *Virology* 476: 341-344.
- Campo, M. (1997). "Bovine papillomavirus and cancer." *The Veterinary Journal* 154(3): 175-188.
- Carvalho, R., S. T. Sakata, et al. (2013). "Bovine papillomavirus in Brazil: Detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method." *BioMed research international* 2013.
- Castillo, A. (2011). "HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract." *Colombia medica* 42(2): 233-242.

- Cobo, F. (2012). "Application of molecular diagnostic techniques for viral testing." *Open Virol J* 6: 104-14.
- Contreras, W. and B. Venegas (2015). "Virus Papiloma Humano en Cáncer Oral y Orofaringeo: Revisión de la Literatura." *International journal of odontostomatology* 9(3): 427-435.
- Corteggio, A., G. Altamura, et al. (2013). "Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one?" *Infectious agents and cancer* 8(1): 1.
- Coursaget, P. (2003). "Serology for human papillomavirus." *salud pública de méxico* 45: 361-366.
- Charry Dávalos, J. V. and M. B. Hinojosa López (2011). *Estudio de papilomatosis bovina en cinco propiedades de ganadería de leche, en cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha, Quito: Universidad de las Américas, 2011.*
- Choi, I. H., S. Y. Jin, et al. (2011). "Cytomorphologic features according to HPV DNA type in histologically proven cases of the uterine cervix." *Korean J Pathol* 45(45): 612-620.
- Christensen, N. D., R. Kirnbauer, et al. (1994). "Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes." *Virology* 205(1): 329-335.
- Christensen, N. D., C. A. Reed, et al. (1996). "Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6." *Virology* 224(2): 477-486.
- Daudt, C., Da Silva, F.R.C., Cibulski, S.P., Junqueira, D.M. and Canal, C.W. (2017). *Expansion of Papillomaviridae in bovine host: characterization of two new virus types assigned to Xi and Epsilon papillomavirus genus. U. S. N. L. o. M. National Center for Biotechnology Information, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*
- Deamer, D. W. and M. Akeson (2000). "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing." *Trends in biotechnology* 18(4): 147-151.
- Dean, A. G., Arner, T.G., Sunki, G.G., Friedman, R., Lantinga, M., Sangam, S., Zubieta, J.C., Sullivan, K.M., Brendel, K.A., Gao, Z. (2011). "Epi Info, a database and statistics program for public health professionals, 2011." *CDC: Atlanta, GA, USA.*
- Díaz, R. V., C. E. Duch, et al. (2012). "Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV)." *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 6(2): 38-58.
- Dillner, J. (1990). "Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames." *International journal of cancer* 46(4): 703-711.
- Diniz, N., T. Melo, et al. (2009). "Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil." *Genetics and Molecular Research* 8(4): 1474-1480.

- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic acids research* 32(5): 1792-1797.
- Forslund, O., A. Antonsson, et al. (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.
- Granadillo, M., I. Torrens, et al. (2012). "A novel strategy to improve antigen presentation for active immunotherapy in cancer. Fusion of the human papillomavirus type 16 E7 antigen to a cell penetrating peptide." *Biotecnología Aplicada* 29(3): 194-197.
- Group, Q. (2006). *DNeasyBlood & Tissue Handbook*. Hilden, Germany, Quiagen Group.
- Guzmán López, S., O. Barboza Quintana, et al. (2010). "Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico." *Medicina universitaria* 12(49): 231-238.
- Heino, P., B. Skyldberg, et al. (1995). "Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes." *Journal of general virology* 76(5): 1141-1153.
- Henry, M. and O. Ioffe (2013). "Squamous premalignancy of the cervix: advantages of a 2-tiered versus 3-tiered terminology." *AJSP: Reviews & Reports* 18(4): 177-182.
- HERNÁNDEZ, C., P. M. VASALLO, et al. (1995). "Análisis del DNA-II: clonar, secuenciar y PCR." *Nefrología (Madr.)* 15(Supl 2): 31-43.
- Jang, J.-S., J.-H. Kim, et al. (2008). "A case of cutaneous fibroma in a Korean indigenous cattle." *한국임상수의학회지* 25(3): 200-201.
- Johnson, M., I. Zaretskaya, et al. (2008). "NCBI BLAST: a better web interface." *Nucleic acids research* 36(Web Server issue): W5-W9.
- Jubb KVF, K. P., Palmer NC. (2007). *Pathology of the Domestic Animals*. Philadelphia, USA, Saunders-Elsevier.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor (1969). "Evolution of protein molecules." *Mammalian protein metabolism* 3(21): 132.
- Kavetuna, Y. (2016). *A WARTY DISASTER*. Farmer's Creek. Y. Kavetuna. 2019.
- Kumar, S., G. Stecher, et al. (2018). "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms." *Molecular biology and evolution* 35(6): 1547-1549.
- Leon, C., P. Arango, et al. (2012). "Cellular immune response in patients presenting with benign and malignant lesions of cervix." *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 37(4).
- Li, C., K. Shah, et al. (1987). "Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera." *Journal of virology* 61(9): 2684-2690.
- Madden, T. (2013). "The BLAST sequence analysis tool."
- Maniar, K. P. and R. Nayar (2014). "HPV-related squamous neoplasia of the lower anogenital tract: an update and review of recent guidelines." *Advances in anatomic pathology* 21(5): 341-358.

- Meuten, D. J. (2016). *Tumors in domestic animals*, John Wiley & Sons.
- Moller, M., R. P. Viscidi, et al. (1992). "Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer." *Virology* 187(2): 508-514.
- Morris, B. J., J. L. Flanagan, et al. (1988). "Papillomavirus screening of cervical lavages by polymerase chain reaction." *Lancet* 2(8624): 1368.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Munday, J. (2014). "Bovine and human papillomaviruses: a comparative review." *Veterinary pathology* 51(6): 1063-1075.
- Munday, J. S. and M. Kiupel (2010). "Papillomavirus-associated cutaneous neoplasia in mammals." *Veterinary pathology* 47(2): 254-264.
- Ogawa, T., Y. Tomita, et al. (2004). "Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin." *Journal of general virology* 85(8): 2191-2197.
- Orozco Aguilar, N. M. and H. J. Padilla Mendoza (2016). *Manual alternativas de tratamiento contra la papilomatosis bovina*, Universidad Nacional Agraria.
- Orth, G., S. Jablonska, et al. (1981). "Identification of papillomaviruses in butchers' warts." *Journal of Investigative Dermatology* 76(2): 97-102.
- Palagi, P. M., P. Hernandez, et al. (2006). "Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data." *Proteomics* 6(20): 5435-5444.
- Pattar, J. (2013). "Autogenous Vaccination and Immunomodulation for Management of Cutaneous Papillomatosis in a Crossbred cow." *Intas Polivet* 14(2).
- Pruitt, K. D., T. Tatusova, et al. (2005). "NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins." *Nucleic acids research* 33(suppl\_1): D501-D504.
- Quinn, T. C. (1994). "Recent advances in diagnosis of sexually transmitted diseases." *Sex Transm Dis* 21(2 Suppl): S19-27.
- Rocha Buelvas, A., R. Bologna Molina, et al. (2012). "Human Papillomavirus and Upper Aerodigestive Tract Neoplasm: A Review Literature from Mexico and Colombia." *Universitas Odontológica* 31(67).
- Roden, R. B., N. L. Hubbert, et al. (1996). "Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition." *Journal of virology* 70(5): 3298-3301.
- Rojas-Anaya, E., A. Cantú-Covarrubias, et al. (2016). "Detection and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus in cutaneous warts in cattle in Tamaulipas, Mexico." *Canadian Journal of Veterinary Research* 80(4): 262-268.

- Rosales, R., M. López-Contreras, et al. (2001). "Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA." *Journal of medical virology* 65(4): 736-744.
- Saews, Y., I. Inza, et al. (2007). "A review of feature selection techniques in bioinformatics." *bioinformatics* 23(19): 2507-2517.
- SAGARPA (2018). SLP alcanza tercer lugar nacional como productor de carne de res SAGARPA.
- Salib, F. A. and H. A. Farghali (2011). "Clinical, epidemiological and therapeutic studies on Bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt in 2008." *Veterinary World* 4(2): 53.
- Sanger, F. (1981). "Determination of nucleotide sequences in DNA." *Bioscience reports* 1(1): 3-18.
- Silva, M. S. e., M. Weiss, et al. (2010). "Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 22(4): 603-606.
- Soost, H., H. Lange, et al. (1991). "The validation of cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values." *Acta cytologica* 35(1): 8-14.
- Sullivan, K. M., A. Dean, et al. (2009). "OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health." *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)* 124(3): 471-474.
- Szczerba-Turek, A., Bancercz-Kisiel, A., Socha, P. and Siemionek, J. (2016). Bovine Papillomaviruses detected in Bos Taurus in Poland. U. S. N. L. o. M. National Center for Biotechnology Information, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.
- Tatusova, T. A. and T. L. Madden (1999). "BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences." *FEMS microbiology letters* 174(2): 247-250.
- Van Doorslaer, K., Z. Li, et al. (2016). "The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database." *Nucleic acids research* 45(D1): D499-D506.
- Vázquez Díaz, R., C. Escudero Duch, et al. (2012). "Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV)." *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 6(2): 38-58.
- Villa, L. L. (2003). "Vaccines against papillomavirus infections and disease." *salud pública de méxico* 45(S3): 443-448.
- Violet, L., D. Montes, et al. (2017). "Frecuencia de papilomatosis en bovinos (Bos taurus) del departamento de Córdoba, Colombia." *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA* 9(2): 294-300.
- Wikström, A., M. Hedblad, et al. (1992). "The acetic acid test in evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: a comparative study on penoscopy,

histopathology, virology and scanning electron microscopy findings." *Sexually Transmitted Infections* 68(2): 90-99.

Yourno, J. and J. Conroy (1992). "A novel polymerase chain reaction method for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filter paper." *J Clin Microbiol* 30(11): 2887-92.

Zachary, J. F. and M. D. McGavin (2016). *Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult-E-BOOK*, Elsevier Health Sciences.

Zawacka-Pankau, J. (2011). *Nucleic acid techniques in molecular diagnosis of human diseases and pathogens*, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG&MUG Gdańsk.

Zhang, H., Zhou, B.-J., Wang, K.-G., Chen, Z.-T., Wen, M. and Hu, X.-Y. (2017). Cloning and sequence analysis of the complete genome of bovine papillomavirus type 2. U. S. N. L. o. M. National Center for Biotechnology Information, Guizhou University.

## ARTÍCULOS

Fwd: [RMCP] Decisión del Editor > Recibidos x

Luisa Eugenia Hernández Arteaga <socorrohauaslp@hotmail.com>  
para mí ▾

vie., 28 dic. 2018 8:57

Obtener [Outlook para Android](#)

---

**From:** Ciencias Pecuarias <[cienciaspecuarias@inifap.gob.mx](mailto:cienciaspecuarias@inifap.gob.mx)>  
**Sent:** Thursday, December 27, 2018 9:41:14 AM  
**To:** Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández-Arteaga  
**Cc:** [rodriguez\\_oscar@prodigy.net.mx](mailto:rodriguez_oscar@prodigy.net.mx)  
**Subject:** [RMCP] Decisión del Editor

Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández-Arteaga:

Con referencia al trabajo: "CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS BOVINO EN LA FIBROPAPILOMATOSIS BOVINA EN LA REGIÓN CENTRO NORTE DE MEXICO". que tuvo a bien someter a revisión en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias; nos permitimos hacer de su conocimiento el siguiente:

Dictamen: Publicable con modificaciones como Nota de investigación.  
Revisor 1.

## **Artículo 1.- CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS EN LA FIBROPAPILOMATOSIS BOVINA EN LA REGIÓN CENTRO NORTE DE MEXICO**

### **HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND PAPILOMAVIRUS DETECTION IN BOVINE FIBROPAPILLOMATOSIS IN THE NORTH-CENTER REGIÓN OF MÉXICO**

#### **Resumen**

El objetivo del trabajo fue determinar la presencia del PVB en muestras de tejidos de bovinos con lesiones cutáneas sugerentes de papilomas, fibromas y fibropapilomas en unidades de producción de ganado bovino en el estado de San Luis Potosí. Obtuvimos 11 biopsias de piel de bovinos de entre 5 y 18 meses provenientes de sistemas de producción estabulado, semiestabulado y de agostadero con fines productivos de carne y leche, con lesiones sugerentes de papilomas, fibropapilomas y carcinomas de células escamosas. Estas muestras se procesaron mediante histopatología y se realizó extracción de ADN para la detección del Papilomavirus Bovino mediante PCR con los Oligonucleótidos FAP59/FAP64 y MY09/MY11. Las lesiones se clasificaron en fibromas (45.45 %) y fibropapilomas (54.54%) sin que se observara distribución de un tipo de lesión específica de acuerdo a la localización anatómica, edad, sistema de producción o fin zootécnico. 72.72 % (n=8) de las muestras mostraron resultados positivos para PVB mediante PCR; 45.45 % (n=5) con los oligos FAP y 54.54 % (n=6) con los oligos MY. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que describe la presencia de PVB en el estado de San Luis Potosí, por lo que estos resultados aportan datos útiles para establecer medidas de detección y control necesarias para mejorar las condiciones zoonosanitarias de los animales. Palabras clave: Papilomavirus Bovino, Fibropapilomatosis bovina, Histopatología, PCR, San Luis Potosí

#### **Abstract**

The aim of this work was to determine BPV presence in tissue samples of cattle with suggestive skin lesions of papillomas, fibromas and fibropapillomas in cattle production systems in San Luis Potosí State. We obtained skin biopsies of 11 cattle between 5 and 18 months from stabulated, semi-stabulated and pasture production systems for productive purposes of meat and milk, with suggestive lesions of papillomas, fibropapillomas and squamous cell carcinomas. Samples were processed by histopathology and DNA was extracted for BPV detection by PCR with the Oligonucleotides FAP59 / FAP64 and MY09 / MY11. Based on the histopathological characteristics of the tissues, were classified as fibromas (45.45%) and fibropapillomas (54.54%) with no distribution of a specific type of lesion according to anatomical location, age, production system or zootechnical purpose. BPV was detected in 72.72% (n=8) of tested samples by PCR; 45.45%(n=5) of positive samples with the FAP oligos and 54.54%(n=6) with the MY oligo set. As far as we know, this is the first study that describes the presence of BPV in animals of the state of San Luis Potosí, so these results provide useful data to establish detection and control measures necessary to improve animal health conditions.

Key words: Bovine papillomavirus, Bovine fibropapillomatosis, Histopathology, PCR, San Luis Potosí

## INTRODUCCIÓN

La fibropapilomatosis bovina es una enfermedad viral infecciosa especie específica y de distribución mundial que afecta principalmente bovinos jóvenes causada por el papilomavirus bovino (PVB) asociado a diversos factores predisponentes como estados de inmunosupresión, edad de los animales, estado nutricional, parasitosis, mal manejo, estrés, fármacos inmunosupresores entre otros.. [56, 60] Los papilomavirus son una familia de virus oncogénicos pequeños, no envueltos, capaces de infectar aves, mamíferos y peces. La familia *papillomaviridae* comprende 29 géneros que agrupan 189 tipos virales, de los cuales, 120 se han aislado de humanos, 64 de mamíferos, 3 de aves y 2 de reptiles. [60, 61]

Hasta la fecha, se han caracterizado 10 tipos virales capaces de causar infección en diferentes sitios anatómicos de los bovinos y se ha descrito que dependiendo el tipo viral será la forma de presentación de la lesión. Así, el BPV-1 produce papilomas y fibropapilomas en la región del pene; el tipo 2, papilomas y fibropapilomas cutáneos y del tracto alimentario; los tipos 3 y 8, papilomas cutáneos; el tipo 4 se ha asociado a la aparición de papilomas del tracto gastrointestinal; el tipo 5, fibropapilomas en la ubre y los tipos 6, 9 y 10 se han encontrado asociados a la aparición de papilomas en ubres. [53, 61-64]

Los fibromas, papilomas o fibropapilomas son neoplasias proliferativas benignas que pueden ser exofíticas o endofíticas, solitarias o múltiples, parcialmente delimitadas, tipo placa, papilares, con aspecto de grano de arroz o coliflor, secas y de consistencia firme que pueden necrosarse y desprenderse o exhibir contaminación bacteriana secundaria. [14, 65]

Estas lesiones pueden tener regresión espontánea o permanecer hasta 6 a 18 meses; en caso de ser múltiples y/o dependiendo de su localización pueden ocasionar pérdida de la condición corporal. Los signos clínicos varían dependiendo de su localización por ejemplo si se localizan en espacio interdigital son dolorosos y pueden provocar cojeras o postración. En el tracto gastrointestinal rara vez exhiben manifestaciones clínicas pero pueden causar anorexia o timpanismo. En la glándula mamaria pueden dificultar el ordeño o complicarse con infecciones secundarias y generar mastitis. En vagina o pene pueden interferir con el coito, sangrar, infectarse e interferir con la reproducción. [10, 11, 66]

Histológicamente los papilomas están constituidos por proyecciones papilares de epitelio escamoso, sostenidas por estroma fibrovascular. El epitelio de estas proyecciones exhibe hiperplasia e hiperqueratosis orto y paraqueratosis marcada. En algunos papilomas, los queratinocitos, principalmente los del estrato espinoso exhiben abundante citoplasma claro o un halo perinuclear y núcleos picnóticos, las cuales son denominadas coilocitos (células con cambios citopáticos). En ciertos papilomas en regresión se aprecia reducción de la hiperplasia epidermal, incremento en la proliferación de fibroblastos, depósitos de colágena e infiltración por linfocitos. Los fibropapilomas tienen dos componentes: el epitelio de revestimiento que alterna con tejido fibroso dispuesto en haces cortos entrelazados y fibroblastos reactivos. El epitelio de revestimiento no muestra cambios citopatológicos pero exhibe hiperplasia marcada y acantosis plexiforme. [12, 16, 56] En las lesiones grandes el epitelio se puede erosionar semejando así fibromas, en los cuales se observa proliferación de fibroblastos con depósitos de colágena densa. [51]

Se han desarrollado diferentes estrategias para la detección del PVB en fibromas y fibropapilomas mediante PCR. En este sentido, los oligonucleótidos FAP59/FAP64,

diseñados a partir del análisis de regiones conservadas del gen L1 del papilomavirus humano (VPH), además de detectar un amplio espectro de tipos de VPH en tumores cutáneos y piel sana, han demostrado ser de utilidad en la detección de papilomavirus cutáneos de diversas especies, incluyendo los Papilomavirus bovinos tipo 1 - 12 . De manera similar, los oligos MY09/MY11, diseñados originalmente para detectar tipos de VPH asociados a la mucosa y los genitales, han demostrado ser capaces de amplificar regiones del gen L1 de los tipos 1, 3, 5 6 del PVB. [67, 68].

En México solamente se han reportado datos de detección e identificación molecular de la infección por el PVB en el estado de Tamaulipas. [55] No existen datos epidemiológicos sobre la incidencia, prevalencia o los tipos virales más frecuentemente involucrados en el desarrollo de papilomas o fibropapilomas en ganado bovino de otras regiones del país. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de diferentes tipos de PVB en muestras de tejidos de bovinos con lesiones cutáneas con diagnóstico histopatológico positivo para papilomas, fibropapilomas en diferentes regiones del estado de San Luis Potosí.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo.

Obtuvimos biopsias incisionales y excisionales de piel de bovino con lesiones sugerentes de fibromas, papilomas, fibropapilomas de 11 animales de diferentes regiones del estado de San Luis Potosí. (Cuadro 1 y Figura 1)

El tejido diseccionado se fragmento en porciones pequeñas las cuales se dividieron para su estudio en 2 partes: la primera porción se colocó en tubos Falcón de 15 ml con formaldehído al 10%, para su evaluación histopatológica y la segunda porción se colocó en buffer PBS pH 7.2 para la realización de PCR. Las muestras en PBS se colocaron en un contenedor criogénico y se transportaron al Laboratorio de Inmunología y Virología de la UASLP para su procesamiento. Las muestras colocadas en formaldehído fueron transportadas a temperatura ambiente al mismo laboratorio.

### Evaluación Histopatológica.

Para la evaluación histopatológica, los fragmentos de tejido previamente fijados en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina y se procesaron por la técnica histológica de rutina, se hicieron cortes de 3 - 5  $\mu\text{m}$  de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

### Extracción y cuantificación de ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras colectadas se procesaron 25 mg de tejido con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, California, EUA) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante. El ADN extraído fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para comprobar la pureza y cuantificar el ADN extraído, se empleó un microespectrofotómetro de gota Nano-200 (All sheng, Beijing, China). Para verificar la integridad del ADN, se realizó una electroforesis en gel TAE-Agarosa al 2%.

### PCR.

Las Muestras de ADN fueron sometidas a PCR empleando las parejas de oligos FAP-59/FAP-64 (Macrogen, Seoul Rep. de Korea) (FAP-59: 5'-

TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'; FAP-64: 5'-  
CCWATATCWWHCATITCICCATC-3') y MY-09/MY-11 (IDT, San Diego, California, USA) (MY-09: 5'- CGTCCAAAAGGAAACTGAGC-3'; MY-11: 5'- GCACAGGGACATAACAATGG-3'). Ambas parejas de oligos detectan el marco abierto de lectura del gen de la proteína mayoritaria de la cápside L1, altamente conservada en todos los tipos de PV bovinos y humanos.

Preparamos mezclas de PCR de 50µl con el kit para PCR Invitrogen (Invitrogen, Massachusetts, USA). Estas mezclas contenían: buffer 1×, DNTp 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Oligonucleótidos 20 pM y 5 UI de Taq polimerasa y 10 ng de ADN. Estas mezclas se colocaron en un Termociclador Multigene Optimax (LabNET, California, USA). Para los oligos MY09/MY11, el programa de PCR consistió en 10 min de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de 90 seg a 94° C, 60 seg a 50°C, 90 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Para la pareja FAP59/FAP64, el programa empleado consistió en 10 min de desnaturalización inicial a 94°C, 45 ciclos de 90 seg a 94° C, 90 seg a 50°C, 90 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis de 5 µl del producto en gel de TAE-Agarosa al 2%. La electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 80V durante 80 minutos, transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio (Sigma - Aldrich, Missouri, EUA) y la imagen se capturó con un fotodocumentador Gel Doc EZ System (BioRad, Hercules, California, EUA).

## RESULTADOS

### Evaluación Histopatológica.

Las secciones histológicas examinadas de biopsias de piel, exhibían características en común tales como hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcadas de la epidermis, presencia de erosiones, úlceras y costras serocelulares, en algunas se observaron además proyecciones papilares sostenidas por estroma fibrovascular que alterna con colágena densa, degeneración balonoide y cuerpos de inclusión. En la dermis se observó proliferación de tejido conectivo fibroso maduro, entremezclado con fibroblastos reactivos, colágena densa, vasos linfáticos de nueva formación, así como múltiples agregados de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Además en una de las secciones de tejido examinadas se aprecian células epiteliales atípicas dispersas, las cuales exhiben pérdida de la relación núcleo citoplasma, abundante citoplasma intensamente eosinofílico; núcleo grande, con escotaduras, cromatina desplazada a la periferia y uno a tres nucléolos evidentes.(Figura 2)

Las lesiones histopatológicas observadas fueron sugerentes de un proceso neoplásico de tipo viral compatibles con fibromas y fibropapilomas con base en características como: hiperplasia irregular e hiperqueratosis epidérmica, presencia de proyecciones papilares de la epidermis; proliferación de tejido conectivo fibroso maduro, entremezclado con fibroblastos reactivos, colágena densa y agregados de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Además de presencia de coilocitos, cuerpos de inclusión anfófilos intranucleares. . Los diagnósticos histopatológicos definitivos se resumen en la tabla 2.

### PCR.

En la reacción de amplificación con los oligos FAP59/FAP64, observamos un amplicón de entre 480 a 538pb correspondiente al producto de la amplificación por PCR del gen L1 de PVB en el 45.45% del total de las muestras (n=5). En el 27.27% (n=3) del total de las muestras no se observó ningún producto de PCR. De manera global, hasta un 72% de las muestras fueron positivas para secuencias de ADN correspondientes a secuencias del gen L1 del virus del PVB. (Figura 3 y Tabla 2)

El análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los oligos MY09/MY11 mostró la presencia de bandas de entre 470 a 490 pb en las muestras 1, 2, 5, 6, 8 y 9 (54.5% del total de las muestras), este amplicón es coincidente con el esperado para la PCR del gen L1 del virus del PVB. (Figura 4)

## DISCUSIÓN

La mayoría de las lesiones examinadas fueron sugerentes de fibromas, sin embargo es importante considerar que algunos papilomas y fibropapilomas pueden presentar regresión o cambios morfológicos durante su evolución que los hacen semejar fibromas en función de la cronicidad y estado inmunológico del animal. [12, 51] Por esta razón es altamente probable que la incidencia de fibromas reportada en este trabajo este sobreestimada con respecto al momento en que los animales fueron muestreados, dado que la etiología y evolución de estas lesiones pueden seguir un patrón común.

Las muestras incluidas en este estudio provenían de piel de diferentes regiones anatómicas de bovinos sin que se observara un patrón de restricción de las lesiones a una zona determinada en el cuerpo del animal. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Borzacchiello y cols. [53] quienes señalan que la presentación de lesiones cutáneas en la infección por PVB puede ser de manera generalizada y que además el sitio de aparición de estas lesiones se pueden correlacionar con el tipo viral involucrado.

Dado que las lesiones muestreadas se presentaron únicamente en la piel de los bovinos es probable que los tipos virales involucrados correspondan al PVB-2, PVB-3, PVB-6 PVB-8 PVB-9 ó PVB-10. Este hallazgo, sin embargo deberá ser confirmado mediante secuenciación de los productos de PCR obtenidos.

Hasta donde sabemos este es el primer trabajo que se ocupa de la detección a nivel molecular de la infección por el PVB en bovinos de toda la región. Por lo cual los datos contenidos en este trabajo señalan las áreas de oportunidad en las cuales es necesario trabajar para implementar las medidas de detección y control necesarias para impactar favorablemente en la salud de los animales y mejorar la calidad de los productos pecuarios. A la evaluación histopatológica las lesiones más frecuentemente observadas en los fragmentos examinados de piel, fueron la hiperplasia irregular de la epidermis, hiperqueratosis marcada difusa, degeneración balonoide de queratinocitos y en la dermis la proliferación de fibroblastos reactivos, tejido conectivo fibroso y agregados de linfocitos y células plasmáticas. Estas características han sido señaladas en extenso como lesiones sugerentes de una infección por Papilomavirus. [69, 70]

Estudios previos realizados en Japón empleando la pareja de oligos FAP-59 / FAP-64 reportan una prevalencia de hasta el 100% de PVB en lesiones cutáneas [54]. Un estudio en Irán reporta una prevalencia del 12.5% en ganado Holstein [71]. Nuestro estudio encontró una frecuencia global de infección por algún tipo de PVB del 72%; dato similar a lo reportado por Santos y cols. [72] quienes reportan una prevalencia de hasta el 86% de muestras positivas a PVB en Brasil y Rojas – Anaya quienes reportan de 2 a 70% de

muestras positivas en el estado de Tamaulipas, México [55]. En el 27.27% de las muestras, las lesiones histopatológicas fueron altamente sugestivas de una infección viral, sin embargo estas resultaron negativas por PCR a PVB por lo que no se descarta la posibilidad de asociación del PVB con estas lesiones, debido al proceso de integración genómica presente en la historia natural de la infección por PVB [53, 73].

Las infecciones por papilomavirus se han descrito a lo largo de todo el mundo aunque no todos los genotipos presentan la misma prevalencia regional. [6, 56, 57] En este trabajo se incluyeron muestras colectadas de bovinos de las regiones centro y huasteca del estado de San Luis Potosí, las cuales poseen climas muy diferentes entre sí (seco árido en el centro y subtropical en la huasteca). A pesar de que la mayoría de las muestras provenían de la región centro, los habitantes de las localidades de la región huasteca del estado reportan de forma empírica una mayor incidencia de lesiones sugerentes de infección por PVB lo que concuerda con lo reportado por Violet y cols. [52] quienes señalan una probable asociación entre la frecuencia de presentación de papilomatosis cutánea y climas de tipo tropical lluvioso.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se describió por primera ocasión la presencia de PVB en bovinos del estado de San Luis Potosí. La presencia de este agente en bovinos de la entidad es alta, pero se considera similar a la encontrada en una región aledaña al estado y no se encuentra restringida a un patrón de presentación relacionado con la edad, raza o sistema de producción de los animales.

Debido a que los tipos de PVB circulantes en el estado de SLP no han sido caracterizados hasta tipo viral es importante su identificación lo que permitirá caracterizar patrones de distribución específicos (clúster) y el desarrollo de biológicos efectivos específicamente contra estos tipos virales

## REFERENCIAS

1. Díaz, R.V., et al., Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2012. 6(2): p. 38-58.
2. Fauquet, C.M., et al., *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2005: Academic Press.
3. de Villiers, E.M., et al., Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004. 324(1): p. 17-27.
4. Borzacchiello, G. and F. Roperto, Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary research*, 2008. 39(5): p. 1.
5. Ogawa, T., et al., Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *Journal of general virology*, 2007. 88(7): p. 1934-1938.
6. Tomita, Y., et al., Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes*, 2007. 35(2): p. 243-249.
7. Hatama, S., K. Nobumoto, and T. Kanno, Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of general virology*, 2008. 89(1): p. 158-163.
8. Pattar, J., Autogenous vaccination and immunomodulation for management of cutaneous papillomatosis in a crossbred cow. *Intas Polivet*, 2013. 14(2): p. 423-425.

9. Munday, J., Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Veterinary pathology*, 2014. 51(6): p. 1063-1075.
10. Corteggio, A., et al., Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? *Infectious agents and cancer*, 2013. 8(1): p. 1.
11. Knight, C.G., et al., Persistent, widespread papilloma formation on the penis of a horse: a novel presentation of equine papillomavirus type 2 infection. *Veterinary dermatology*, 2011. 22(6): p. 570-574.
12. Salib, F.A. and H.A. Farghali, Clinical, epidemiological and therapeutic studies on Bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt in 2008. *Veterinary World*, 2011. 4(2): p. 53-59.
13. Guzmán López, S., O. Barboza Quintana, and R.A. González Ramírez, *Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico*. Medicina universitaria, 2010. 12(49): p. 231-238.
14. Henry, M. and O. Ioffe, Squamous premalignancy of the cervix: advantages of a 2-tiered versus 3-tiered terminology. *AJSP: Reviews & Reports*, 2013. 18(4): p. 177-182.
15. Jang, J.-S., et al., A case of cutaneous fibroma in a Korean indigenous cattle. *한국임상수의학회지*, 2008. 25(3): p. 200-201.
16. Forslund, O., et al., 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*, 1999. 80(9): p. 2437-2443.
17. Antonsson, A. and B.G. Hansson, Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *Journal of Virology*, 2002. 76(24): p. 12537-12542.
18. Rojas-Anaya, E., et al., Detection and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus in cutaneous warts in cattle in Tamaulipas, Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2016. 80(4): p. 262-268.
19. Jarrett, W.F., et al., Alimentary fibropapilloma in cattle: a spontaneous tumor, nonpermissive for papillomavirus replication. *J Natl Cancer Inst*, 1984. 73(2): p. 499-504.
20. Campo, M., Bovine papillomavirus and cancer. *The Veterinary Journal*, 1997. 154(3): p. 175-188.
21. Ogawa, T., et al., Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *Journal of general virology*, 2004. 85(8): p. 2191-2197.
22. Babaahmady, E. and K. Taherpour, Verrugas en los pezones de vacas lecheras- Warts on the. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 2011. 1695: p. 7504.
23. Santos, E., et al., Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. *Transboundary and emerging diseases*, 2016. 63(1).
24. Agrawal, R., et al., Integration of bovine papillomavirus type 1 DNA and analysis of the amplified virus-cell junctions in transformed primary mouse fibroblasts. *Journal of general virology*, 1992. 73(1): p. 201-206.
25. Orozco Aguilar, N.M. and H.J. Padilla Mendoza, *Manual alternativas de tratamiento contra la papilomatosis bovina*. 2016, Universidad Nacional Agraria.
26. Charry Dávalos, J.V. and M.B. Hinojosa López, *Estudio de papilomatosis bovina en cinco propiedades de ganadería de leche, en cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha*. 2011, Quito: Universidad de las Américas, 2011.

27. Violet, L., D. Montes, and J. Cardona, Frecuencia de papilomatosis en bovinos (*Bos taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 2017. 9(2): p. 294-300.
28. Vázquez Díaz, R., et al., Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2012. 6(2): p. 38-58.
29. Nasir, L. and M.S. Campo, Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary dermatology*, 2008. 19(5): p. 243-254.
30. Pompeo Claus, M., et al., Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2009. 52(SPE): p. 93-98.

#### AGRADECIMIENTOS

La Maestra Isaura Méndez Rodríguez, desea agradecer al CONACYT (México) por la beca otorgada para realizar sus estudios doctorales.

#### CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

IMR realizó el muestreo y la evaluación histopatológica. IMR y AMC prepararon los experimentos de PCR.MGH, FAMT y LESHA revisaron los resultados experimentales. Todos los autores contribuyeron por igual en la preparación del manuscrito.

#### CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés, en relación a la elaboración, revisión y publicación de este trabajo.

#### TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1. Características de los bovinos incluidos en el muestreo.**

ID	Raza	Edad	Sexo	Sistema de Producción	Ubicación
1	Suizo-Cebú	18 meses	hembra	Estabulado	Tamuín, S.L.P.
2	Suizo-Cebú	5 meses	macho	Agostadero	Ébano, S.L.P.
3	Lidia	6 meses	macho	Estabulado	Villa de Reyes, S.L.P.
4	Cruza de Suizo	6 meses	macho	Semi-estabulado	Villa de Zaragoza, S.L.P.
5	Holstein	1 año 3 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
6	Holstein	10 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
7	Holstein	10 meses	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
8	Holstein	1 año	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez
9	Holstein	1 año 1 mes	hembra	Estabulado	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.
10	Cruza de Cebú	7 meses	macho	Agostadero	Tamuín, S.L.P.

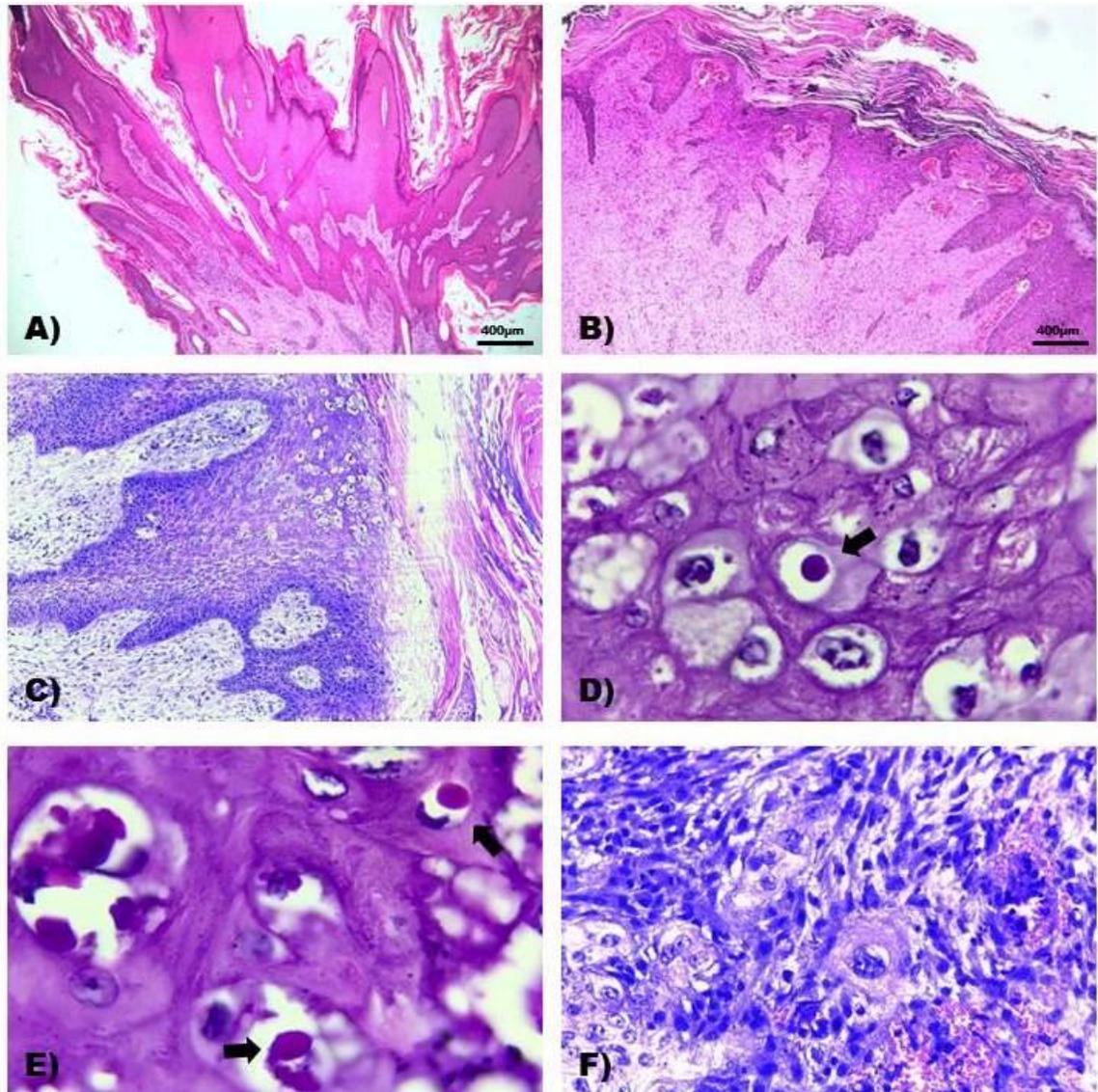
<b>11</b>	Cruza Suizo	de 8 meses	macho	Semi-estabulado	Tamasopo, S.L.P.
-----------	-------------	------------	-------	-----------------	------------------

**Tabla 2. Finalidad de explotación de los bovinos, resultados histopatológicos y de PCR de las muestras obtenidas**

<b>ID</b>	<b>Propósito de cría</b>	<b>Diagnóstico Histopatológico</b>	<b>PCR FAP</b>	<b>PCR MY</b>
<b>1</b>	Carne	Fibroma	-	+
<b>2</b>	Carne	Fibropapiloma	-	-
<b>3</b>	Exhibición	Fibropapiloma	-	+
<b>4</b>	Carne	Fibroma	+	+
<b>5</b>	Leche	Fibropapiloma	+	+
<b>6</b>	Leche	Fibropapiloma	+	+
<b>7</b>	Leche	Fibroma	-	-
<b>8</b>	Leche	Fibroma	-	-
<b>9</b>	Leche	Fibropapiloma	-	-
<b>10</b>	Carne	Fibroma	+	-
<b>11</b>	Carne	Fibropapiloma	+	-
<b>Total</b>			<b>5</b>	<b>6</b>

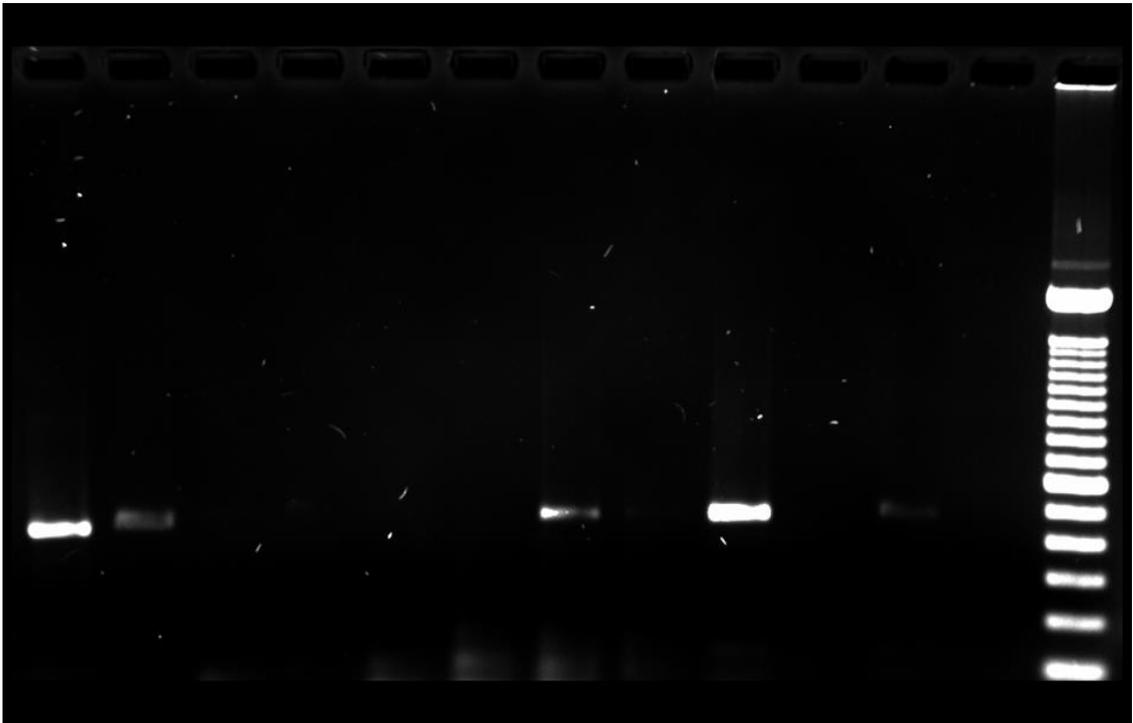


**Figura 1. Localización geográfica y cantidad de muestras obtenidas en las localidades del estado de San Luis Potosí.**

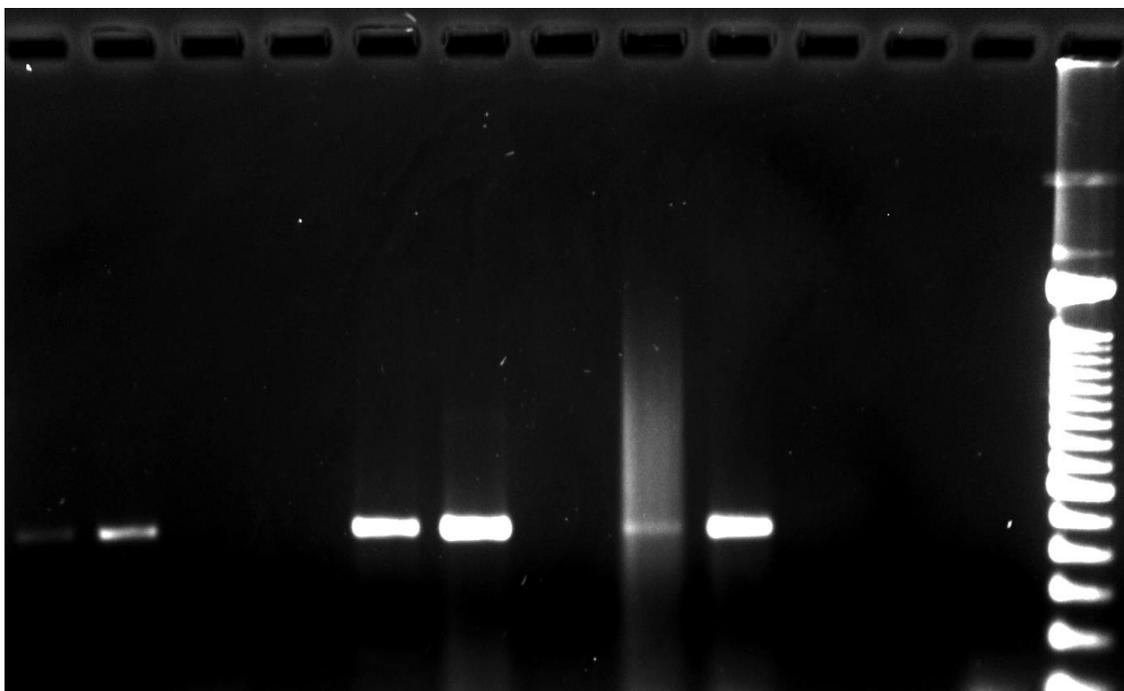


**Figura 2.** Lesiones histopatológicas representativas de los fibromas, papilomas y fibropapilomas encontrados en la piel del ganado.- A) Fibropapiloma. La epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada difusa así como formación de proyecciones papilares sostenidas por estroma fibrovascular. H&E, 4X; B) Fibroma: La epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada difusa, en la dermis se observa proliferación de tejido conectivo fibroso entremezclado con vasos sanguíneos congestionados y agregados de linfocitos y células plasmáticas. H&E, 4X; C) Fibroma: La epidermis exhibe hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcada, además se observa degeneración balonoide de los queratinocitos en diferentes estratos; en la dermis se aprecia proliferación de fibroblastos reactivos y agregados de linfocitos y células plasmáticas. H&E, 10X; D y E) Fibroma. Los queratinocitos exhiben degeneración balonoide y presencia de estructuras anfólicas amorfas compatibles con cuerpos de inclusión. H&E, 100X; F) Fibroma. Algunas células epiteliales exhiben marcada anisocariosis con pérdida de la relación núcleo citoplasma, abundante citoplasma intensamente eosinofílico; núcleo

grande, con escotaduras, cromatina desplazada a la periferia y uno a tres nucléolos evidentes. H&E, 40X.



**Figura 3. Producto de PCR con los oligos FAP59/FAP64.** Carril 1: Muestra 5, amplicón de 485 pb. Carril 2: Muestra 6, amplicón de 511 pb; Carril 7: Muestra 10, amplicón de 521 pb; Carril 9: Muestra 11, amplicón de 515 pb; Carril 11: muestra 4, amplicón de 513 pb. Carril 12: Control negativo (Sin DNA); Carril 13: Escalera de 100 pb. Carriles 3, 4, 5, 6 y 8: No se observa producto de PCR;



**Figura 4 PCR con los oligos MY09/11.** Carril 1: Muestra 5, amplicón de 472 pb. Carril 2: Muestra 6, amplicón de 479 pb; Carril 5: Muestra 9, amplicón de 492 pb; Carril 6: Muestra 1, amplicón de 488 pb; Carril 8: muestra 3, amplicón de 483 pb. Carril 9: Muestra 4, amplicón de 486 pb Carril 12: Control negativo (Sin DNA); Carril 13: Escalera de 100 pb. Carriles 3, 4, 7, 10 y 11: No se observa producto de PCR;

Fwd: A manuscript number has been assigned to PAPILOMAVIRUS CAUSANTES DE FIBROMAS, PAPILOMAS Y FIBROPAPILOMAS EN GANADO BOVINO DE UNA ZONA ÁRIDA DE MÉXICO.  Recibidos x



Laboratorio de Virología Unidad Central de Equipos <virologia\_uce@hotmail.com>  
para mí ▾

jue., 9 may. 17:47



 inglés ▾ > español ▾ [Traducir mensaje](#)

[Desactivar para: inglés](#)

Obtener [Outlook para Android](#)

De: RCHSZA

Enviado: jueves, 9 de mayo 5:37 p. m.

Asunto: A manuscript number has been assigned to PAPILOMAVIRUS CAUSANTES DE FIBROMAS, PAPILOMAS Y FIBROPAPILOMAS EN GANADO BOVINO DE UNA ZONA ÁRIDA DE MÉXICO.

Para: Luisa Eugenia del Socorro Hernández-Arteaga

Dear Dr. Hernández-Arteaga,

Your submission entitled "PAPILOMAVIRUS CAUSANTES DE FIBROMAS, PAPILOMAS Y FIBROPAPILOMAS EN GANADO BOVINO DE UNA ZONA ÁRIDA DE MÉXICO." has been assigned the following manuscript number: 105154 RRCHSZA 2018.12.027.

## Artículo 2.- PAPILOMAVIRUS CAUSANTES DE FIBROMAS, PAPILOMAS Y FIBROPAPILOMAS EN GANADO BOVINO DE UNA ZONA ARIDA DE MÉXICO.

### HIGHLIGHTS

- Type1 BPV is the most BPV type in the Huasteca and Central Region of San Luis Potosí
- Types2 and 26 were also identified in bovines of Central Region of San Luis Potosí
- This is the first Report on circulating BPV types in cattle of San Luis Potosí

### RESUMEN

La fibropapilomatosis bovina es una enfermedad infecciosa, de distribución mundial que afecta bovinos jóvenes, causada por el papilomavirus bovino (PVB). En México, solo se cuenta con datos de infección por PVB en el estado de Tamaulipas y no existen datos sobre su prevalencia en otras regiones del país. En este trabajo determinamos los tipos de PVB que causan Fibromas, Papilomas y Fibropapilomas en el ganado bovino de las regiones Centro y huasteca del estado de San Luis Potosí. Obtuvimos biopsias de piel de 16 bovinos con lesiones sugerentes de Papilomas, Fibropapilomas y Carcinomas de células escamosas. Empleamos los oligos FAP59 /FAP64 para la detección de PVB mediante PCR e identificamos los tipos virales mediante secuenciación de ácidos nucleicos. 8.3% de las muestras correspondieron a PVB tipo 2, 8.3% al PVB tipo 26 y 83.3% al PVB tipo 1, de entre las cuales identificamos los aislamientos BT1PLFap e IPV 11. En la zona centro encontramos PVB tipo 1 BT1PLFap y PVB tipo 1 IPV 11, PVB tipo 2 y Papilomavirus *Bos taurus* (PVBt) tipo 26. En la zona Huasteca encontramos PVB tipo 1 BT1PLFap principalmente. Este es el primer trabajo que describe los diferentes tipos de PVB que infectan el ganado bovino en el estado de San Luis Potosí entre los cuales el tipo Viral más frecuentemente identificado correspondió al PVB tipo 1 BT1PLFap

**PALABRAS CLAVE:** Papilomavirus Bovino, Genotipificación, PCR, Noreste de México

### ABSTRACT

Bovine fibropapillomatosis is an infectious disease of worldwide distribution that affects young cattle, caused by bovine papillomavirus (BPV). In Mexico, there is only data on infection by BPV in the state of Tamaulipas and there are no data on its prevalence in other regions of the country. In this work we determined BPV types that cause Fibromas, Papillomas and Fibropapillomas in cattle of the Central and Huasteca regions of the state of San Luis Potosí. We obtained skin biopsies from 16 bovines with lesions suggestive of Papillomas, Fibropapillomas and Squamous cell carcinomas. We use the FAP59/FAP64 oligos for the detection of BPV by PCR and identified viral types by nucleic acid sequencing. 8.3% of the samples corresponded to type-2 BPV, 8.3% to type-26 BPV and 83.3% to type-1 BPV, from which we identified the BT1PLFap and IPV11 isolates. In the central zone we found type-1 BPV BT1PLFap and type-1 PVB IPV11, type-2 BPV and Type-26 *Bos taurus* papillomavirus (PVBt). In the Huasteca zone we found type-1 BT1PLFap BPV mainly. This is the first work that describes the different types of BPV that infect cattle in the state of San Luis Potosí among which the most frequently identified Viral type corresponded to type-1 PVB BT1PLFap.

**KEYWORDS:** Bovine Papillomavirus, Genotyping, PCR, Northeast of México

### INTRODUCCIÓN

Los Papilomavirus (PV) son virus oncogénicos, pequeños desnudos, con estructura icosaédrica, capaces de infectar aves, mamíferos y peces. Hasta 2017 se habían secuenciado 376 tipos de PV distribuidos en 50 géneros. Existen secuenciados 24 tipos de PV que infectan a bovinos y que se distribuyen en los géneros XI, Phi, Delta, Dyoxi, Diolambda y Dyoeta. [60, 61]

La fibropapilomatosis bovina es una enfermedad infecciosa, especie específica y de distribución mundial que afecta principalmente bovinos jóvenes causada por el papilomavirus bovino (PVB) asociado a diversos factores predisponentes como estados de inmunosupresión, edad de los animales, estado nutricional, parasitosis, mal manejo, estrés, fármacos inmunosupresores entre otros. [56, 60] Esta enfermedad se autolimita en un periodo de 6 a 8 meses, sin embargo, si la infección persiste, se pueden desarrollar neoplasias malignas como el carcinoma de células escamosas y/o afectar además órganos internos, principalmente vejiga urinaria y tracto gastrointestinal. Clínicamente las lesiones se observan por lo general en piel de la región occipital, cervical, torácica y dorsal, pudiendo localizarse en cualquier región del cuerpo del animal. [12, 14, 16, 56, 62]

Se ha descrito que dependiendo el tipo viral será la forma de presentación de la lesión. Así, el BPV-1 produce papilomas y fibropapilomas en la región del pene; el tipo 2, papilomas y fibropapilomas cutáneos y del tracto alimentario; los tipos 3 y 8, papilomas cutáneos; el tipo 4 se ha asociado a la aparición de papilomas del tracto gastrointestinal; el tipo 5, fibropapilomas en la ubre y los tipos 6, 9 y 10 se han encontrado asociados a la aparición de papilomas en ubres. [53, 61, 63-65]

En México solamente se han reportado datos de detección e identificación molecular de la infección por el PVB en el estado de Tamaulipas. [55] No existen datos epidemiológicos sobre la incidencia, prevalencia o los tipos virales más frecuentemente involucrados en el desarrollo de papilomas o fibropapilomas en ganado bovino de otras regiones del país. El objetivo de este trabajo fue determinar los tipos de PVB que causan fibromas, papilomas y fibropapilomas en el ganado bovino de las regiones Centro y huasteca del estado de San Luis Potosí

## MATERIALES Y MÉTODOS

Obtuvimos duplicados de biopsias incisionales y excisionales de piel de bovinos con lesiones sugerentes de papilomas, fibropapilomas y carcinomas de células escamosas de 16 animales de las regiones centro y huasteca del estado de San Luis potosí, México. El tejido diseccionado se colocó en buffer PBS pH 7.2. y se transportó al Laboratorio de Virología de la UASLP para su procesamiento.

Uno de los duplicados de las muestras colectadas se fijaron en formaldehído al 10% y fueron incluidas en bloques de parafina para preparar cortes de 5µm de espesor que fueron procesados por la técnica de H&E de rutina. Estas preparaciones fueron examinadas al microscopio para clasificar las lesiones como Fibromas, Papilomas o Fibropapilomas.

El tejido restante se empleó para realizar la extracción de ADN. Fue cortado en porciones de 25 mg y se sometió a digestión con proteinasa K durante 24 h (pH 8.0, 56 °C). Para la extracción de ADN de las muestras, empleamos el Kit DNeasy blood & tissue (Quiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones especificadas por el fabricante. La calidad e integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de SB-agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y se cuantificó mediante técnica espectrofotométrica de rutina.

Para la detección de Papilomavirus bovino en las muestras, empleamos los oligos FAP-59 (Forward) (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') y FAP-64 (Reverse) (5'-CCWATATCWVHCATITCICCATC-3') (Macrogen, Seoul, Rep. de Korea) [66]. Preparamos mezclas de 50 µl con el kit para PCR Invitrogen (Invitrogen, Massachusetts, USA) que contenían Buffer 1×, dNTP 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Oligonucleótidos 20 pM y 5 UI de Taq polimerasa y 10 ng de ADN. Estas mezclas se colocaron en un Termociclador Multigene Optimax (LabNET, California, USA). El programa empleado para amplificación consistió en 10 min de desnaturalización inicial a 94°C, 45 ciclos de 90 seg a 94°C, 90 seg a 50°C, 90 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis de 5 µl del producto en gel de SB-agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma - Aldrich, Missouri, EUA) y la imagen del gel se capturó con un fotodocumentador con iluminación UV Gel Doc EZ System (BioRad, Hercules, California, EUA).

Los productos de PCR fueron purificados mediante precipitación con acetato de sodio e isopropanol en frío y su concentración se ajustó a 50 ng/µl con buffer TE 1× (pH 8.0). La pureza de los amplicones así como la concentración de éstos fue determinada mediante espectrofotometría. Se prepararon mezclas con 5 µl del amplicón de PCR purificado y 5 µl del oligo FAP 59 y se enviaron a secuenciación mediante el método de Sanger (Macrogen inc., Seoul, Rep. de Korea).

Para establecer la identidad de los tipos virales, se realizó el alineamiento de las secuencias de los productos de PCR en la colección de nucleótidos de la base de datos del NCBI utilizando el programa Mega BLAST [44]. La identificación de una secuencia mediante alineamiento de nucleótidos se dio por válida si cumplía con los siguientes criterios en el alineamiento: Porcentaje de identidad  $\geq 99\%$ , Valor E  $\leq 1 \times 10^{-6}$  y Porcentaje de cobertura del alineamiento  $\geq 99\%$  como criterios principales para identificar las secuencias en los alineamientos.

Realizamos una comparación filogenética entre los aislamientos y la secuencia modelo de PBV Tipo 1 disponible en Genbank (Accesion No.: NC\_001522.1)[45] para construir el árbol filogenético de los papilomavirus circulantes identificados.

Utilizamos el programa MEGAX [46] para realizar el alineamiento de las secuencias con el algoritmo MUSCLE [47]. Con este alineamiento construimos un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud con el modelo Jukes and Cantor [48]

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que describe los diferentes tipos de papilomavirus que infectan el ganado bovino en el estado de San Luis Potosí. Además, caracterizamos las secuencias del ORF del gen L1 de los papilomavirus bovinos, criterio mundialmente aceptado para establecer la identidad (a nivel de secuencia de ácidos nucleicos) de los papilomavirus humanos y no humanos.[50]

A la histopatología se encontraron lesiones sugerentes de una infección de tipo viral, tales como degeneración de queratinocitos de los diferentes estratos y presencia de cuerpos de inclusión anfófilos intranucleares e intracitoplasmáticos, además se observó hiperplasia irregular e hiperqueratosis marcadas de la epidermis; así mismo en la dermis superficial y profunda se aprecia proliferación de tejido conectivo fibroso entremezclado con linfocitos, células plasmáticas, algunos macrófagos y vasos sanguíneos

congestionados. Estas lesiones son compatibles con un proceso hiperplásico/neoplásico como fibromas y fibropapilomas de tipo viral.

A la evaluación histopatológica, la mayoría de las lesiones mostraron características citológicas que las clasificaban como fibromas, sin embargo es importante considerar que algunos papilomas y fibropapilomas pueden presentar regresión o cambios morfológicos que los hacen semejar fibromas en función de la cronicidad y estado inmunológico del animal. [12, 51]. Dado que la etiología y evolución de estas lesiones pueden seguir un patrón común, es probable que la incidencia de fibromas en el ganado del estado de San Luis potosí se encuentre sobreestimada en función del momento en que los animales fueron muestreados.

Las muestras incluidas en este estudio provenían de piel de diferentes regiones anatómicas de bovinos sin que se observara un patrón de restricción de las lesiones a una zona determinada en el cuerpo del animal. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Borzacchiello y cols.[53] quienes señalan que la presentación de lesiones cutáneas en la infección por PVB puede ser de manera generalizada y que además el sitio de aparición de estas lesiones se pueden correlacionar con el tipo viral involucrado.

En el 100% de los animales muestreados se detectaron secuencias de algún tipo de PVB. De las 16 muestras secuenciadas en el 75% de los casos se pudo identificar algún tipo de Papilomavirus bovino mediante alineamiento. 2 muestras secuenciadas no dieron resultados en el BLAST y en otras dos no se pudo llevar a cabo la secuenciación, por la probable asociación de más de un tipo viral detectable mediante PCR con los oligos FAP.

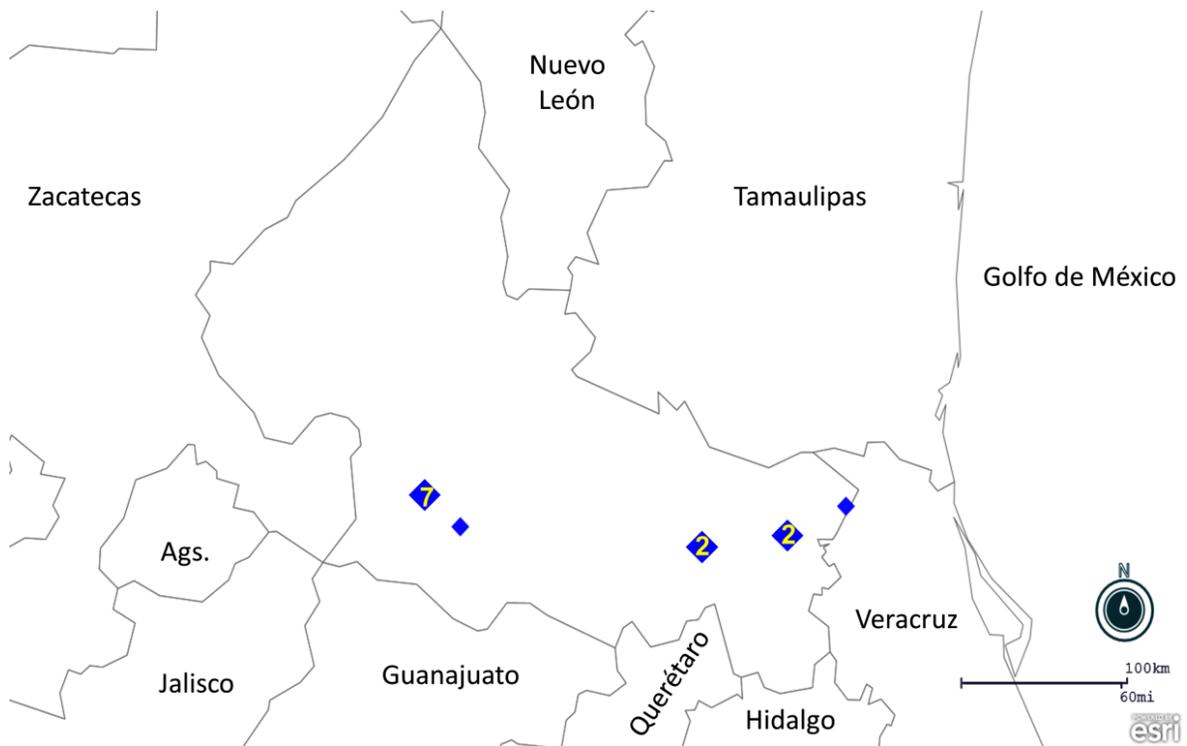
En este trabajo, detectamos, mediante PCR, ADN de papilomavirus bovino en el 100% de las muestras colectadas. Este dato concuerda con lo reportado en estudios previos realizados en Japón, empleando la misma pareja de oligos FAP-59 / FAP-64 [54]. Sin embargo, la prevalencia global de PVB contrasta con lo reportado por Rojas – Anaya quienes reportan de 2 a 70% de muestras positivas en el estado de Tamaulipas, México [55]. Estas diferencias en la prevalencia de PVB podrían deberse, en parte, al empleo de un set de oligos diferentes, por lo que es necesario realizar una comparación entre la sensibilidad de ambos juegos de Oligonucleótidos.

El 8.3% (n=1) de las muestras secuenciadas e identificadas correspondieron a PVB tipo 2. De la misma manera, otro 8.3% (n=1) de las muestras secuenciadas e identificadas correspondieron a PVB tipo 26. El restante 83.3% (n=10) de las muestras se identificaron como PVB tipo 1, de entre las cuales se identificaron dos aislamientos diferentes, 8 pertenecientes al aislamiento BT1PLFap y 2 pertenecientes al aislamiento IPV 11.[1, 2]

En lo que respecta a la zona centro del estado de San Luis Potosí se encontró mayor prevalencia del PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento BT1PLFap 62.5% (n=5). También se encontraron PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento IPV 11, PVB tipo 2 y PVBt tipo 26. En la zona huasteca se encontró mayor prevalencia del PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento BT1PLFap 75% (n=3). También se encontró PVB tipo 1 perteneciente al aislamiento IPV 11. (Ver Figura 1)

Las infecciones por papilomavirus se han descrito a lo largo de todo el mundo aunque no todos los genotipos presentan la misma prevalencia regional. [6, 56, 57] e inclusive se ha sugerido la posible existencia de una asociación entre el tipo de clima y los genotipos de PVB circulantes [52]. En este trabajo se incluyeron muestras colectadas de bovinos de las regiones Centro y Huasteca del estado de San Luis Potosí, las cuales poseen climas muy diferentes entre sí (seco árido en el centro y subtropical en la huasteca).

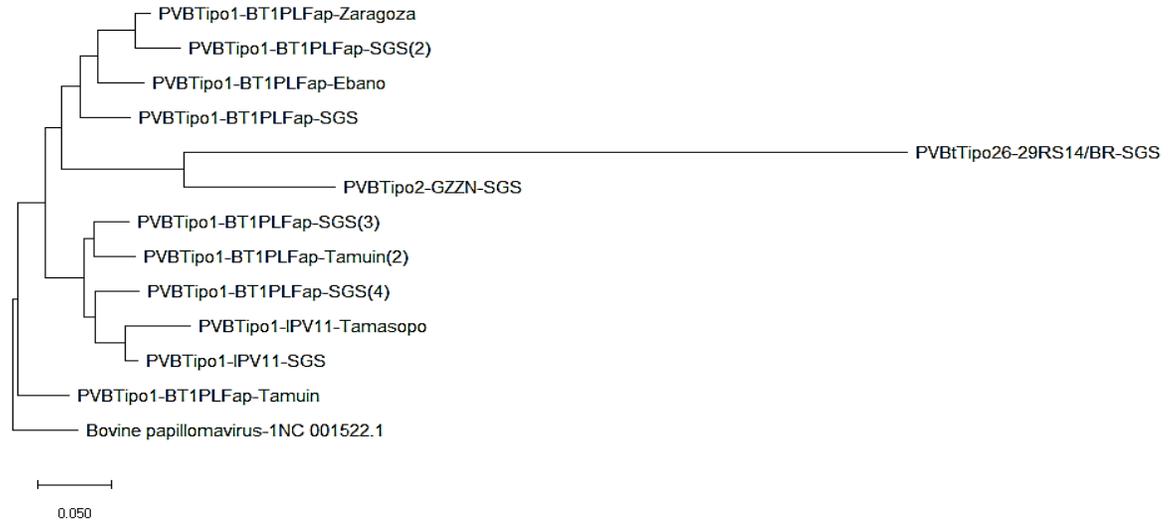
Nuestro estudio encontró una mayor prevalencia de PVB tipo 1 sin limitación climatológica evidente, dato que contrasta con lo reportado por rojas Anaya y cols. (2016) quienes reportan proporciones similares de PVB tipo 1 y PVB tipo 2 (53% y 47% respectivamente) para una población de bovinos en el estado vecino de Tamaulipas, México. [55]



**Figura 1.** Localización de los aislamientos virales

Con base en la comparación filogenética de los distintos PVB encontrados en el estado con el modelo de PVB tipo 1 el dendograma muestra dos grupos primarios; a partir de uno de los cuales se generan tres grandes clados, los cuales identificamos como A, B y C. Los clados A y C están compuestos en su mayoría por PVB tipo 1 BT1PLFap, el A, además presenta un grupo formado únicamente por PVB tipo 1 IPV 11 y el clado C está compuesto por PVB tipo 2 y PVBt tipo 26. (Figura 2)

El hallazgo del aislamiento BT1PLFap del PVB tipo 1 en México podría explicarse por dos razones probables. Primero que haya existido movilización de ganado de Polonia a México o viceversa en los últimos seis meses o que el tipo viral identificado inicialmente en Polonia no se encuentra restringido al país o incluso al continente europeo, sino que presente una distribución cosmopolita o al menos en todo el hemisferio norte. Ninguna de las dos opciones ha podido ser confirmada o descartada por lo que son necesarios más estudios enfocados a la evolución de este aislamiento [1]. De la misma forma los aislamientos del PVB tipo 2 y PVBt tipo 26 apenas fueron identificados en Brasil, entre el año 2016 y 2017. [58, 59] Su presencia en México se podría explicar por alguna de las dos razones anteriormente descritas sin embargo son necesarios más estudios para confirmar o rechazar dichas opciones.



**Figura 2.** Árbol filogenético de los PVB identificados. Se empleó el método de máxima verosimilitud y el modelo J+C para construir el árbol.

No observamos una distribución geográfica tipo-específica de los PV tipo 1 encontrados, sin embargo el PBV tipo 2 y PBbt tipo 26 provenían de la misma zona del estado. No encontramos relación entre el tipo viral identificado y el tipo de lesión o su localización anatómica. (Ver cuadro)

No encontramos asociación entre la raza de los bovinos o el sistema de producción y la presencia de algún tipo de PVB. Dato que contrasta con lo descrito por Vázquez Díaz y cols. [5] quienes refieren mayor prevalencia de presentación en bovinos de raza Holstein; Nasir y campo [67] y Orozco Aguilar [57] mencionan que el ganado estabulado tiene mayor riesgo de presentar infecciones por el PVB. Al examinar la prevalencia de PVB en función de la edad de los animales no encontramos asociación estadísticamente significativa; este dato concuerda con lo reportado por Pompeo – Claus para una población brasileña de ganado y por Rojas Anaya para ganado en el estado de Tamaulipas, México [55, 68]

**Cuadro1. Características de los bovinos incluidos en el muestreo.**

Bovino	Municipio/Estado	Raza	Edad	Sistema de producción	Localización de la lesión	Tipo viral identificado
1	Tamuín, S.L.P.	Suizo-Cebú	18 meses	Estabulado	Cabeza, cuello, tórax, abdomen, extremidades	BPV1 BT1PLFap
2	Ébano, S.L.P.	Suizo-Cebú	5 meses	Agostadero	Cabeza, cuello, abdomen	BPV1 BT1PLFap
4	Villa de Zaragoza, S.L.P.	Cruza de Suizo	6 meses	Semi - estabulado	Cabeza	BPV1 BT1PLFap
5	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	6 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV1 BT1PLFap
6	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	6 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV1 BT1PLFap
7	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	6 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV 26
8	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	6 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV1 BT1PLFap
10	Tamuín, S.L.P.	Cruza de Cebú	7 meses	Agostadero	Rostral	BPV1 BT1PLFap
11	Tamasopo, S.L.P.	Cruza de Suizo	8 meses	Semi – estabulado	Dorso	BPV1 IPV11
13	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	7 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV 2
15	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	9 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV1 IPV11
16	Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.	Holstein	10 meses	Estabulado	Cuello, tórax, patas	BPV1 BT1PLFap

## CONCLUSIONES

En las regiones huasteca y centro del estado de San Luis Potosí el PVB tipo 1 es el principal causante de lesiones cutáneas sugerentes de Fibromas y Fibropapilomas en ganado bovino sin restringirse a una localización geográfica, tipo de explotación o fin zootécnico sin embargo no se debe menospreciar la presencia de los PVB tipo 2 y PVBt tipo 26 en las unidades de producción del estado.

## REFERENCIAS

1. Szczerba-Turek, A., Bancercz-Kisiel, A., Socha, P. and Siemionek, J., Bovine Papillomaviruses detected in Bos Taurus in Poland, U.S.N.L.o.M. National Center for Biotechnology Information, Editor. 2016, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.
2. Bezerra, A.A., Bertagnolli, A.C., Nunes, R., dos Reis, E.M., Varela, A.P.M., Roehe, P.M., Cavali, L.S. and Mayer, F.Q., Molecular and histological characterization of bovine papillomavirus from southern Brazil, U.S.N.L.o.M. National Center for Biotechnology Information, Editor. 2016, FEPAGRO Saude Animal: Rio Grande do Sul, Brasil.
3. Jubb KVF, K.P., Palmer NC. , Pathology of the Domestic Animals. 5th ed, ed. Saunders-Elsevier. 2007, Philadelphia, USA: Saunders-Elsevier.
4. Blowey, R. and A.D. Weaver, Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle E-Book. 2011: Elsevier Health Sciences.
5. Vázquez Díaz, R., et al., Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 2012. 6(2): p. 38-58.
6. Charry Dávalos, J.V. and M.B. Hinojosa López, Estudio de papilomatosis bovina en cinco propiedades de ganadería de leche, en cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha. 2011, Quito: Universidad de las Américas, 2011.

7. Zachary, J.F. and M.D. McGavin, Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult-E-BOOK. 2016: Elsevier Health Sciences.
8. Meuten, D.J., Tumors in domestic animals. 2016: John Wiley & Sons.
9. Bernard, H.-U., et al., Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 2010. 401(1): p. 70-79.
10. Corteggio, A., et al., Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? *Infectious agents and cancer*, 2013. 8(1): p. 1.
11. Salib, F.A. and H.A. Farghali, Clinical, epidemiological and therapeutic studies on Bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt in 2008. *Veterinary World*, 2011. 4(2): p. 53.
12. Guzmán López, S., O. Barboza Quintana, and R.A. González Ramírez, Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina universitaria*, 2010. 12(49): p. 231-238.
13. Pattar, J., Autogenous Vaccination and Immunomodulation for Management of Cutaneous Papillomatosis in a Crossbred cow. *Intas Polivet*, 2013. 14(2).
14. Munday, J., Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Veterinary pathology*, 2014. 51(6): p. 1063-1075.
15. Castillo, A., HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract. *Colombia medica*, 2011. 42(2): p. 233-242.
16. Henry, M. and O. Ioffe, Squamous premalignancy of the cervix: advantages of a 2-tiered versus 3-tiered terminology. *AJSP: Reviews & Reports*, 2013. 18(4): p. 177-182.
17. Maniar, K.P. and R. Nayar, HPV-related squamous neoplasia of the lower anogenital tract: an update and review of recent guidelines. *Advances in anatomic pathology*, 2014. 21(5): p. 341-358.
18. Munday, J.S. and M. Kiupel, Papillomavirus-associated cutaneous neoplasia in mammals. *Veterinary pathology*, 2010. 47(2): p. 254-264.
19. Van Doorslaer, K., et al., The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic acids research*, 2016. 45(D1): p. D499-D506.
20. Granadillo, M., et al., A novel strategy to improve antigen presentation for active immunotherapy in cancer. Fusion of the human papillomavirus type 16 E7 antigen to a cell penetrating peptide. *Biotechnología Aplicada*, 2012. 29(3): p. 194-197.
21. Rocha Buelvas, A., R. Bologna Molina, and C. Rocha Buelvas, Human Papillomavirus and Upper Aerodigestive Tract Neoplasm: A Review Literature from Mexico and Colombia. *Universitas Odontológica*, 2012. 31(67).
22. Aragón-Franco, F.R., et al., El papel de los Toll Like Receptors (TLRs) en la respuesta inmune innata contra el cáncer cérvico-uterino. *Revista de Sanidad Militar*, 2010. 64(6): p. 287-299.
23. Aguilar, R.E.B. and J. Berumen Campos, Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología Revista Mexicana*, 2009. 53(5): p. 234-242.
24. Contreras, W. and B. Venegas, Virus Papiloma Humano en Cáncer Oral y Orofaringeo: Revisión de la Literatura. *International journal of odontostomatology*, 2015. 9(3): p. 427-435.
25. Kavetuna, Y., A WARTY DISASTER, in Farmer's Creek, Y. Kavetuna, Editor. 2016
26. Leon, C., et al., Cellular immune response in patients presenting with benign and malignant lesions of cervix. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 2012. 37(4).

27. Zawacka-Pankau, J., Nucleic acid techniques in molecular diagnosis of human diseases and pathogens. Course book prepared as part of the project: „Kształcimy najlepszych kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów oraz akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego”. 2011: Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG&MUG Gdańsk.
28. Cobo, F., Application of molecular diagnostic techniques for viral testing. *Open Virol J*, 2012. 6: p. 104-14.
29. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. 155: p. 335-50.
30. Quinn, T.C., Recent advances in diagnosis of sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis*, 1994. 21(2 Suppl): p. S19-27.
31. Morris, B.J., et al., Papillomavirus screening of cervical lavages by polymerase chain reaction. *Lancet*, 1988. 2(8624): p. 1368.
32. Yourno, J. and J. Conroy, A novel polymerase chain reaction method for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filter paper. *J Clin Microbiol*, 1992. 30(11): p. 2887-92.
33. Sanger, F., Determination of nucleotide sequences in DNA. *Bioscience reports*, 1981. 1(1): p. 3-18.
34. HERNÁNDEZ, C., et al., Análisis del DNA-II: clonar, secuenciar y PCR. *Nefrologia (Madr.)*, 1995. 15(Supl 2): p. 31-43.
35. Deamer, D.W. and M. Akeson, Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends in biotechnology*, 2000. 18(4): p. 147-151.
36. Pruitt, K.D., T. Tatusova, and D.R. Maglott, NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 2005. 33(suppl\_1): p. D501-D504.
37. Saey, Y., I. Inza, and P. Larrañaga, A review of feature selection techniques in bioinformatics. *bioinformatics*, 2007. 23(19): p. 2507-2517.
38. Palagi, P.M., et al., Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics*, 2006. 6(20): p. 5435-5444.
39. Tatusova, T.A. and T.L. Madden, BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS microbiology letters*, 1999. 174(2): p. 247-250.
40. Benson, D.A., et al., GenBank. *Nucleic acids research*, 2008. 36(Database issue): p. D25.
41. Madden, T., The BLAST sequence analysis tool. 2013.
42. Johnson, M., et al., NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, 2008. 36(Web Server issue): p. W5-W9.
43. Dean, A.G., Arner, T.G., Sunki, G.G., Friedman, R., Lantinga, M., Sangam, S., Zubieta, J.C., Sullivan, K.M., Brendel, K.A., Gao, Z., Epi Info, a database and statistics program for public health professionals, 2011. CDC: Atlanta, GA, USA, 2011.
44. Altschul, S.F., et al., Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990. 215(3): p. 403-10.
45. Benson, D.A., et al., GenBank. *Nucleic acids research*, 2012. 41(D1): p. D36-D42.
46. Kumar, S., et al., MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 2018. 35(6): p. 1547-1549.
47. Edgar, R.C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 2004. 32(5): p. 1792-1797.

48. Jukes, T.H. and C.R. Cantor, Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 1969. 3(21): p. 132.
49. Sullivan, K.M., A. Dean, and M.M. Soe, OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*, 2009. 124(3): p. 471-474.
50. Bzhalava, D., C. Eklund, and J. Dillner, International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 2015. 476: p. 341-344.
51. Jang, J.-S., et al., A case of cutaneous fibroma in a Korean indigenous cattle. *한국임상수의학회지*, 2008. 25(3): p. 200-201.
52. Violet, L., D. Montes, and J. Cardona, Frecuencia de papilomatosis en bovinos (*Bos taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 2017. 9(2): p. 294-300.
53. Borzacchiello, G. and F. Roperto, Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary research*, 2008. 39(5): p. 1.
54. Ogawa, T., et al., Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *Journal of general virology*, 2004. 85(8): p. 2191-2197.
55. Rojas-Anaya, E., et al., Detection and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus in cutaneous warts in cattle in Tamaulipas, Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2016. 80(4): p. 262-268.
56. Díaz, R.V., et al., Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2012. 6(2): p. 38-58.
57. Orozco Aguilar, N.M. and H.J. Padilla Mendoza, Manual alternativas de tratamiento contra la papilomatosis bovina. 2016, Universidad Nacional Agraria.
58. Daudt, C., Da Silva, F.R.C., Cibulski, S.P., Junqueira, D.M. and Canal, C.W., Expansion of Papillomaviridae in bovine host: characterization of two new virus types assigned to Xi and Epsilon papillomavirus genus, U.S.N.L.o.M. National Center for Biotechnology Information, Editor. 2017, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
59. Zhang, H., Zhou, B.-J., Wang, K.-G., Chen, Z.-T., Wen, M. and Hu, X.-Y., Cloning and sequence analysis of the complete genome of bovine papillomavirus type 2, U.S.N.L.o.M. National Center for Biotechnology Information, Editor. 2017, Guizhou University.
60. Fauquet, C.M., et al., *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2005: Academic Press.
61. de Villiers, E.M., et al., Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004. 324(1): p. 17-27.
62. Pattar, J., Autogenous vaccination and immunomodulation for management of cutaneous papillomatosis in a crossbred cow. *Intas Polivet*, 2013. 14(2): p. 423-425.
63. Ogawa, T., et al., Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *Journal of general virology*, 2007. 88(7): p. 1934-1938.
64. Tomita, Y., et al., Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes*, 2007. 35(2): p. 243-249.
65. Hatama, S., K. Nobumoto, and T. Kanno, Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of general virology*, 2008. 89(1): p. 158-163.

66. Forslund, O., et al., 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*, 1999. 80(9): p. 2437-2443.
67. Nasir, L. and M.S. Campo, Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary dermatology*, 2008. 19(5): p. 243-254.
68. Pompeo Claus, M., et al., Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2009. 52(SPE): p. 93-98.