



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA BOVINO
EN EL ESTADO DE TAMAULIPAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ. ZULEMA ROCÍO TÉLLEZ VELÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS FORESTALES
Y PECUARIAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. EDITH ROJAS ANAYA
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS FORESTALES
Y PECUARIAS

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
FACULTA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Gran Espíritu, a Omoteotl, a Dios Creador o al de los mil nombres por haberme creado, dotado de la fuerza y aliento de vida, a mis ancestros, consciente de que toda creación tiene un propósito tanto en lo macroscópico como en lo microscópico, que esta creación denominada Tesis pueda cumplir con su propósito y me permita continuar el camino académico personal.

Con amor a la FMVZ-UNAM, por ser mi “segunda casa” donde logré mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sustentar mis estudios de posgrado.

Agradezco a la Dra. Elizabeth Loza Rubio por su colaboración académica, y profesionalmente en la formación y enseñanzas durante el desarrollo de la tesis. Mencionar sus virtudes como lo fueron su paciencia y tolerancia, determinación, liderazgo y cariño que igualmente es gratamente correspondido. En este proceso se nos presentan maestros de vida, de los cuales aprendemos más allá de lo intelectual.

En seguida agradecer a la Dra. Edith Rojas Anaya miembro de mi comité tutorial por su tiempo, y las enseñanzas teóricas y prácticas, aunado a ello ser una mujer inteligente y dedicada.

Agradezco al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por colaborar y formar parte de mi comité tutor, además ser la persona que más me ha confrontado conmigo misma, gracias por brindarme nuevamente la oportunidad de crecimiento profesional, por permitirme ser parte de una familia académica y como usted sabe lo respeto y quiero mucho.

Gracias a la Dra. Estela Núñez, Dra. Araceli Lima y al Dr. Jorge Maldonado por su amistad, cariño, su contribución a mi desarrollo, confianza, respaldo y recomendación profesional.

Gracias al Dr. Antonio Cantú y a los ganaderos en el estado de Tamaulipas por la aportación de las muestras clínicas, que sin ello no hubiera sido posible iniciar este proyecto.

A los miembros del Jurado Dr. Arturo F. Olguín y Bernal, Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez, Dr. Humberto Ramírez Mendoza, por su valiosa aportación en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Juan J. Maya, Dr. C. Julio Jaramillo A., Dr. Pablo Pash, Dra. Cecilia Rosario C., Dra. Rosa E. Sarmiento S., Dr. Juan J. Cruz y Celis por los conocimientos, tiempo y aporte en mi formación académica del programa de clases durante la Maestría.

A Rodrigo Barrón por la colaboración y apoyo intelectual para la edición de las secuencias filogenéticas, igualmente a Rocío Parra Laca en la parte de la comprensión y aplicación de los programas de bioinformática usados en este trabajo, además por su cariño, compañerismo, risas y momentos compartidos.

A Diana Neria por su cariño, apoyo, acompañamiento físico y emocional, los jalones de orejas y el tiempo compartido.

Agradecer a mis compañeros de Laboratorio Catalina Tufiño, Efraín Rojo, Mercedes Gómez por sus detalles, aliento, convivencia y acompañamiento.

A las personas involucradas en la Coordinación de Posgrado de Maestría de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia especialmente a la M en C. Marcela Figueroa, M en C. Clara Aguillón, Dr. Librado Melo y el Dr. Iván Betancourt.

DEDICATORIA

Con toda alegría y amor incondicional para mis padres José Luis Téllez Lozano y Concepción Velázquez Rodríguez, a mi hermano Luis Eduardo, a mi hermana Leticia Téllez y su esposo Alejandro Gelover honrando sus vidas y agradecida por todos los momentos que hemos compartido, por su presencia y gran corazón, su amor, ejemplo de fortaleza, sustento y todo el crecimiento que juntos hemos desarrollado como familia. A mi sobrino Fabián Gelover, por su alegría, amor, abrazos y dulzura, los amo.

A mi amado complemento Rodrigo Cruz por haberme contenido y apoyado con su inmenso amor, paciencia, respeto y brindarme su ejemplo en determinación y seguridad e impulsarme en todo momento para cumplir este proyecto, gracias mi vida.

A mi familia Juliana Bautista y Rodrigo Cruz y su hija Carolina por su presencia, experiencias, amor, contención y apoyo.

A mis estimados Marisela Ugalde, Alicia Ávila, Raúl Gonzáles, Natividad Torres, Rolando Vargas, Itzia Kielman, Marilú Guillermo, Diana Meyer, Mari Carmen Meyer, Victoria Gil, Alma Gallegos, Rosario Sánchez, Silvia Poblano, Yaneli Peña, Judith Jiménez, Felipe Guzmán, Artemisa, Ma Ry, Nely Alonso, Deysi Rahe, Mayra Armijo, Tere Rodríguez, por su hermosa presencia y existencia en mi vida, por todos esos bellos momentos compartidos de desarrollo espiritual y personal, amor, energía, alegría, sostenimiento y acompañamiento en este proceso y etapa de vida.

A Diana Gonzáles, Julia Díaz, Beatriz Moreno, Lázaro Verdiguél, Rene Martínez, Julio Méndez, Salvador Acebedo, amigos entrañables de carrera profesional y que nuestra amistad ha trascendido y evolucionado en tiempo, muchas gracias por su apoyo y amistad.

“La mayoría de la gente dice que es el intelecto lo que hace a un gran científico. Se equivocan es el carácter”....Albert Einstein

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 3 |
| ÍNDICE DE CUADROS | 3 |
| ABREVIATURAS UTILIZADAS | 4 |
| 1.- INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1.- Papilomavirus Bovino (PVB)..... | 5 |
| 1.2.4.2.- Proteínas Estructurales..... | 17 |
| 1.2.5.- REPLICACIÓN VIRAL..... | 21 |
| 1.3.- PATOGENIA Y PATOGÉNESIS..... | 23 |
| 1.3.1.- Hospedero..... | 26 |
| 1.3.2.- Transmisión..... | 27 |
| 1.2.3.- Cuadro clínico..... | 27 |
| 1.4.- EPIDEMIOLOGÍA..... | 29 |
| 1.4.1.- Situación actual..... | 29 |
| 1.4.2.- Impacto económico..... | 31 |
| 1.4.4.- Tratamiento, prevención y control..... | 33 |
| 2.- JUSTIFICACIÓN | 34 |
| 3.- HIPÓTESIS | 34 |
| 4.- OBJETIVOS..... | 35 |
| 4.2.- Específicos | 35 |

| | |
|--|----|
| 5.- METODOLOGÍA | 36 |
| 5.1.- Población de estudio | 36 |
| 5.2.- Procesamiento de las muestras | 36 |
| 5.3.- Diseño de iniciadores y estandarización de la prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa. | 36 |
| 5.4.- Purificación y secuenciación | 37 |
| 5.5.- Análisis filogenético | 38 |
| 6.- RESULTADOS | 38 |
| 6.1.- Detección molecular. | 38 |
| 6.1.1.- Características de los iniciadores diseñados | 38 |
| 6.3.- Secuenciación nucleotídica | 40 |
| 6.4.- Análisis filogenético | 40 |
| 8.- CONCLUSIONES | 48 |
| 9.- PROSPECTIVAS | 48 |
| 10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

RESUMEN

El virus de papiloma bovino (PVB) es ADN y pertenece a la familia *Papillomaviridae*, es la causa de la papilomatosis bovina, enfermedad que se presenta en el ganado vacuno, caracterizada por la presencia de lesiones hiperproliferativas benignas en la mucosa y el epitelio cutáneo. Los animales más afectados son los bovinos jóvenes, menores a los dos, años de edad, sin embargo, todos los animales pueden ser susceptibles a la infección. En México, Tamaulipas es el tercer estado exportador de ganado bovino en pie hacia los Estados Unidos, por cada becerro en pie afectado por la papilomatosis bovina se estima una pérdida económica de \$3,600.00 MN. El objetivo de este trabajo fue detectar una región del gen *L1* a partir de muestras de verrugas obtenidas de bovinos en dos regiones del estado de Tamaulipas,, mediante PCR y su secuenciación para realizar un estudio de filogenia que permitió identificar los subtipos de papilomavirus presentes. Se utilizaron 45 verrugas de bovinos, se extrajo el ADN genómico y se amplificó el gen *L1* del Papilomavirus Bovino. Las secuencias obtenidas fueron analizadas para determinar el subtipo viral. La inferencia se realizó utilizando el paquete MEGA versión 6.0, mediante el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas. Se detectaron 27 (60 %) positivas y 18 (40%) negativas a la prueba. El 100% de los bovinos de la región Noreste fueron positivos y un 56 % de la región Sureste. Las secuencias analizadas se agruparon en el clado que corresponde a los *Deltapapillomavirus*, el 100% correspondió al subtipo 1 de PVB al ser comparadas con secuencias de referencia en el GenBank. Este estudio demostró la presencia de PVB1, lo que contribuye al estudio de caracterización molecular de los papilomas bovinos en México.

Palabras clave: Papilomatosis Bovina, Papilomavirus Bovino, Deltapapillomavirus, gen *L1*, caracterización molecular, filogenia.

ABSTRACT

The Bovine Papillomavirus (BPV) is a DNA virus from *Papillomaviridae* family causal of bovine papillomatosis a disease present in bovine cattle characterized by the presence of benign hyperproliferative lesions in the mucosa and cutaneous epithelium. The most affected animals are young bovines with less of two years old, however all ages are susceptible to the infection. In México Tamaulipas is the third state of exporting livestock to the United States. It has been estimated that each calf affected by bovine papillomatosis produces an economic loss of \$ 3,600.00 MN. The aim of this work was to detect a L1 gene region coming from wart bovine samples in two different regions of Tamaulipas state using PCR, and then sequencing the amplified products to carry out a phylogenetic study that would allow to determine the subtypes of papillomavirus. 45 bovine warts were used, the genomic DNA was extracted and used to amplify the L1 gene of the Bovine Papillomavirus. Sequences of positive samples were analyzed to determine the viral subtype, for this MEGA package version 6.0 was used. 27 samples (60%) were positive and 18 (40%) negative to the PCR, from these, 100% of the bovines evaluated for the Northeast region were positive and 56% for the Southeast region. The analyzed sequences were grouped in a clade corresponding to the Deltapapillomavirus, 100% corresponded to subtype 1 of BPV when compared with reference sequences from the Genbank. This study demonstrated the presence of PVB1 contributing to the study of molecular characterization of bovine papillomas in Tamaulipas.

Key words: Bovine papillomatosis, Bovine papillomavirus, Deltapapillomavirus, L1 gene, molecular characterization, phylogeny.

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Título | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Árbol filogenético que contiene las secuencias de 118 tipos de virus del papiloma. | 8 |
| 2 | Cápside de PVB. | 11 |
| 3 | Partículas virales vistas mediante microscopía electrónica de PBV 1. | 11 |
| 4 | Mapa genómico de BPV 1. | 13 |
| 5 | Monómero de L1. | 19 |
| 6 | Visualización de productos de amplificación de 196 pb de un fragmento del gen <i>L1</i> de PVB. | 39 |
| 7 | Árbol filogenético de un fragmento de 196 pb del gen <i>L1</i> del PVB. | 43 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Características de los iniciadores diseñados. PCR positivo a un fragmento del gen <i>L1</i> del PVB | 39 |
| 2 | correspondiente a muestras de tres regiones diferentes del Estado de Tamaulipas. | 40 |
| 3 | Distribución de subtipos basados en secuencias parciales del gen <i>L1</i> del PVB referidas. | 42 |

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|-----------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| CRPV | <i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i> ; Papilomavirus del conejo cola de algodón |
| cm ² | Centímetros cuadrados |
| °C | Grados Celsius |
| PV | Papilomavirus |
| PVB | Papilomavirus bovino |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| ORF | Open Reading Frame ; Marco Abierto de Lectura |
| dNTP | Desoxinucleótido trifosfato |
| D.O. | Densidad óptica |
| PVB1 | Papilomavirus bovino subtipo 1 |
| ICTV | International Committee on Taxonomy of Viruses |
| IHQ | Inmunohistoquímica |
| kb | kilobases |
| kDa | Kilodaltones |
| Log | Logaritmo |
| μl | Microlitros |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| nm | Nanómetros |
| ng | Nanogramos |
| pb | Pares de bases |
| LCR | Long Region Control; Región Larga de control |

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Papilomavirus Bovino (PVB).

La papilomatosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial causada por el género Papillomavirus, son virus de ADN que afectan a los seres humanos, así como muchas especies de animales domésticos y de vida libre, incluyendo aves, roedores, reptiles y animales marinos. Estos virus ocasionan lesiones hiperproliferativas benignas en la mucosa y el epitelio cutáneo (Bernard et al. 2010).

De acuerdo con la nomenclatura establecida por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*ICTV*) por sus siglas en inglés, el virus de papiloma bovino (PVB) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, causal de la enfermedad en ganado vacuno.

Anteriormente se consideraba a estos virus como epiteliotrópicos, sin embargo, a la fecha los autores Lindsey et al. 2009; Freitas et al. 2011 han detectado la presencia de este virus en células mononucleares, en placenta, en fluidos corporales como lo son sangre, leche, orina, semen y líquido amniótico.

La investigación de los Papilomavirus data de hace más de 100 años, concretamente cuando en 1896 McFadyean y Hobday demostraron la transmisión de las verrugas en los perros. A este hallazgo siguió el de Ciuffo, quien publicó en 1907 la transmisión de las verrugas en humanos. No obstante, la investigación en este campo no volvió a interesar a la comunidad médica hasta casi 80 años después, cuando se demostró la relación entre algunas infecciones específicas por virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de cuello uterino, basándose en técnicas empleadas previamente para detectar ADN del virus de Epstein-Barr, en linfoma de Burkitt y en casos de cáncer nasofaríngeo (David Mahan Knipe 2001; Bishop et al. 2007; Parrish 2011).

En el año 1930 Richard Shope describió el género por primera vez como Papilomavirus (PV), logrando caracterizar la naturaleza transmisible de los papilomas cutáneos que afectaban a los conejos silvestres (*Sylvilagus floridanus*) (Shope & Hurst 1933). Este PV denominado CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*) fue el primer virus oncogénico identificado. Actualmente la familia Papillomaviridae está compuesta por al menos 29 géneros, y comprende más de 200 tipos virales (De Villiers et al. 2004).

Entre los años 1950 y 1960 se obtuvieron avances respecto a la información de la diferenciación celular y la replicación del virus. El desarrollo de la microscopía de inmunofluorescencia y la mejora de la microscopía electrónica permitió examinar la estructura de las partículas virales. El análisis de los papilomas producidos por el CRPV mostró que las partículas aparecían exclusivamente en el núcleo de queratinocitos diferenciados de las capas superiores de las lesiones. La naturaleza crónica de los papilomas indicaba que el virus debía estar presente también en las capas basales, por lo que la ausencia de partículas virales en éstas llevó a inferir que el virus podía estar en una forma inmadura. Además, se dedujo que la replicación de los papilomavirus estaba estrechamente ligada al proceso de diferenciación de las células epiteliales (David Mahan Knipe 2001; Bishop et al. 2007; Parrish 2011).

Desde los años 1970 hasta el inicio de los años 1990 se produjo el desarrollo de la genética viral con el desarrollo de las técnicas de clonaje molecular, esto permitió superar parte de las limitaciones experimentales que presentaba el estudio de los Papilomavirus, lo que condujo a la renovación en el interés por estos virus. Gracias a estos avances se logró clonar el genoma completo del virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB1) con lo que se identificaron las regiones reguladoras y las funciones de los diversos genes virales (Chen et al. 1982).

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA BOVINO (PVB)

1.2.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Históricamente los papilomavirus se incluyeron en la familia Papovaviridae, de la que también formaban parte los papilomavirus y el virus vacuolizante de los simios (SV-40) debido a que todos ellos son virus desnudos con ADN circular de doble hélice y cápside esférica. Se ha comprobado que los papilomavirus y los poliomasvirus son muy diferentes en el tamaño de su genoma y la organización del mismo, y que no comparten secuencias de aminoácidos, ni de nucleótidos, por lo que actualmente se los reconoce como dos familias diferentes (De Villiers et al. 2004; Bernard et al. 2006).

En la actualidad la clasificación taxonómica de estos virus se basa en algoritmos filogenéticos, que analizan las similitudes entre secuencias de nucleótidos. Los “tipos” son considerados los virus cuya secuencia de nucleótidos en *L1* difieren en al menos 10% con otros tipos; mientras que los “subtipos” solo varían en su secuencia en un 2-10%. Los virus aislados del mismo tipo y con mínimas diferencias, son conocidos como variantes. Este nuevo sistema taxonómico no afecta a la identificación y caracterización tradicionales de los tipos de PV; y clasifica a los subtipos y variantes de los virus, dentro de niveles menores al de “especies”. En el árbol filogenético las ramas mayores son consideradas como “géneros” y las ramas menores son consideradas como “especies”, y unen a tipos de PV que son genéticamente distintos sin exhibir diferencias biológicas. (Figura 1).

Durante las investigaciones se hizo claro que la comparación de genomas completos de PV, homología individual de genes de PV o incluso pequeños segmentos de genes de PV, llevaban a árboles filogenéticos muy similares. Se concluyó entonces que los genomas de los PV no se recombinan y que cada virus homólogo prueba la evolución histórica de cada virus (Nasir & Campo 2008; Bernard et al. 2010; Bishop et al. 2007).

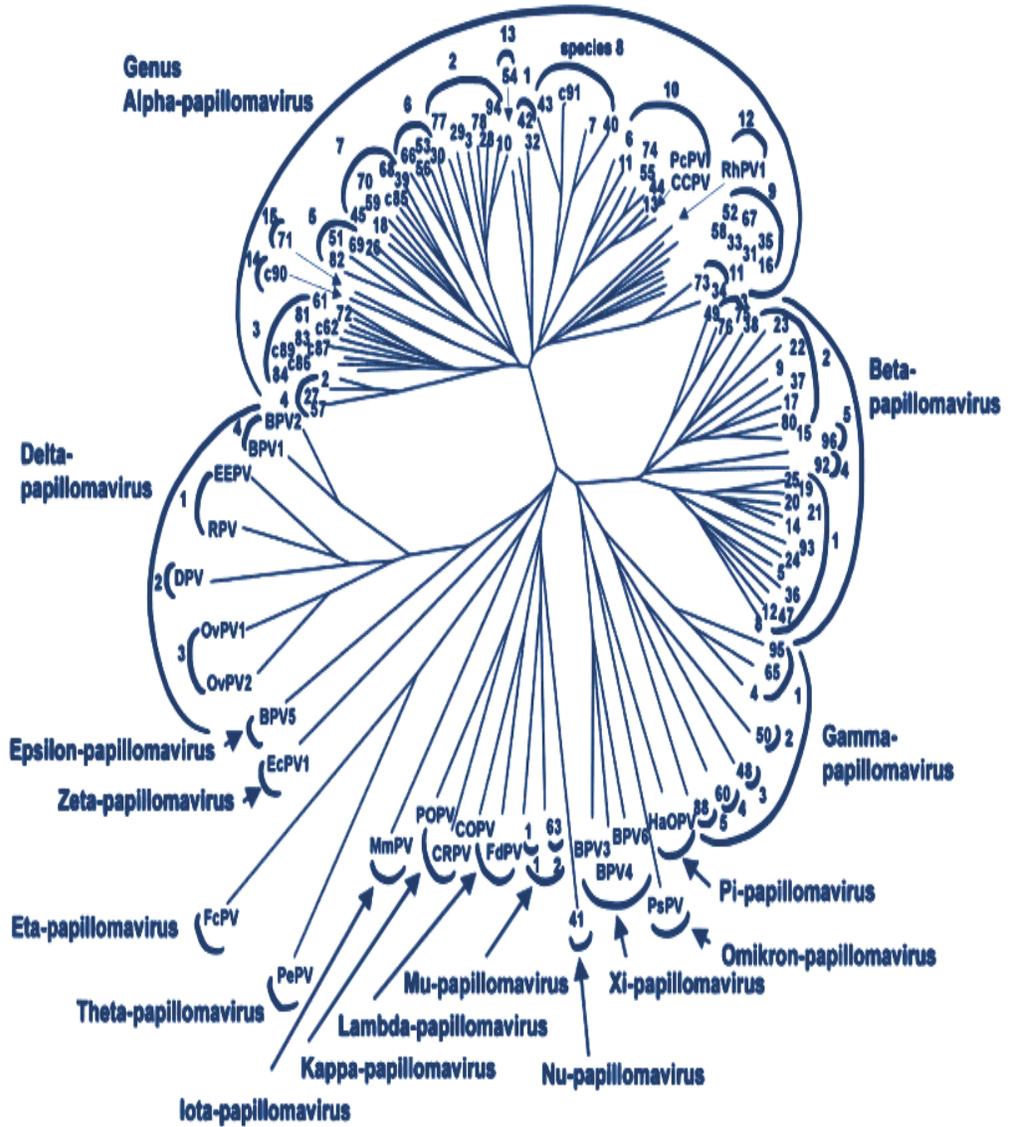


Figura 1. Árbol filogenético que contiene las secuencias de 118 tipos de virus del papiloma. (Tomado de: de Villiers et al. 2004).

1.2.1.- Géneros

Cuando compararon las secuencias de un número mayor de tipos de PV, se observó que la mayoría de los virus formaban ensamblajes jerárquicos, por lo que se empezó a usar expresiones como ramas mayores y menores, o supergrupos y grupos. Tomando como ejemplo los papilomavirus en humanos (PVH), una rama mayor estaba formada por todos los tipos de PVH que originalmente fueron descritos de lesiones genitales, y por lo tanto se lo llamó los PVH genitales; mientras que otro estaba formado de PV de animales ungulados que presentaban lesiones en células epiteliales y mesenquimáticas, y se los conocía como fibropapilomas. Sin embargo, con el tiempo se observó que esta clasificación no tenía mucha consistencia biológica, porque no todos los virus producían las mismas lesiones en los mismos lugares, por lo que los virus no podían clasificarse únicamente mediante una taxonomía fenotípica. (Saveira M, 2006; Garcea R, 2007).

Por esta razón, se decidió introducir “géneros” dentro de la clasificación taxonómica de los papilomavirus, para nombrar a los previamente conocidos como “supergrupos o ramas mayores; y debido a que dar un nombre específico a cada género resultaba complicado, se decidió utilizar letras griegas para nombrarlos.

1.2.1.2.- Especies y Tipos

Anteriormente, debido a que no se podía identificar, mantener y describir cultivos celulares de distintos PV, más que el aislamiento de sus genomas; aquellos cuyo ADN aislado era diferente se les conocía como tipos. Sin embargo, en la actualidad se considera que dos genomas de PV son de distintos tipos, cuando la secuencia de nucleótidos de su gene *L1*, que codifican las proteínas de la cápside, tienen menos del 10% de semejanza. Debido a las grandes variaciones tanto fenotípicas como genotípicas de

distintos tipos de virus, se determinó que cada tipo sea considerado como una especie (Nasir & Campo 2008; Bishop et al. 2007).

En condiciones naturales, un tipo de PV tiene un hospedero específico, aunque múltiples especies de animales ungulados pueden ser infectados por un mismo tipo de virus. Pero no se conoce todavía cuales son los factores que limitan la transmisión de un tipo de PV entre varias especies. En la actualidad existen más de 118 tipos de PV humanos y animales descritos, además de que hay observaciones de cientos de genomas de PV adicionales, que aún tienen que ser aislados y descritos formalmente para considerarse como tipos (De Villiers et al. 2004; Bernard et al. 2010; Bishop et al. 2007).

1.2.1.3.- Subtipos

Los subtipos son definidos como genomas de PV que difieren de otro tipo en su secuencia de nucleótidos en un 2-10%. No se conoce la razón exacta de por qué hay tan pocos subtipos, pero se sugiere, que muchos pueden haberse extinguido con los años, a la vez que las distintas especies continuaban evolucionando (Campo 2006; Bishop et al. 2007).

1.2.1.4.- Variantes

Las variantes se definen como genomas virales que tienen una variación menor al 2% comparada con los tipos virales originales. La diversidad genómica se presenta con mayor frecuencia en las regiones no codificantes, especialmente en la región de control larga (LCR). Se define la variación como un intercambio o supresión de nucleótidos, que ocurren en un corto segmento del genoma (Bernard et al. 2010; Bishop et al. 2007; Campo 2006).

1.2.2.- Morfología

Los PVB carecen de envoltura, presentan una estructura icosaédrica de alrededor de 55 a 56 nm de diámetro. La cápside se compone de 72 capsómeros prismoides pentagonales huecos, 60 en agrupación hexamérica y 12 en agrupación pentamérica (Figuras 2 y 3) (David Mahan Knipe 2001; Joan Murphy, Erin B. Kennedy, Sheila Dunn, C. Meg McLachlin, Michael Fung Kee Fung, Danusia Gzik, Michael Shier 2012; Parrish 2011).

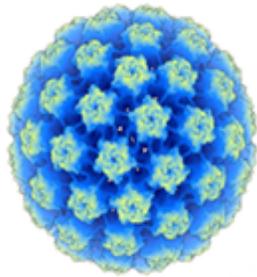


Figura 2. Cápside de PVB
http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/bpv_bovine-papilloma-3iyj_blue_yellow.jpg

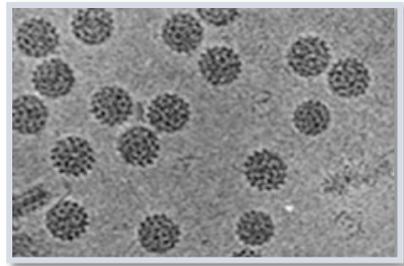


Figura 3: Partículas virales vistas mediante microscopía electrónica de PVB 1, con un tamaño de 55 nm de diámetro. Lunardi M. *et al.*, 2013

El virión está constituido por la proteína mayor L1 y la proteína menor de la cápside L2. La nucleocápside contiene una sola molécula de ADN bicatenario superenrollado y cerrado en círculo por enlaces covalentes, con histonas celulares asociadas. El genoma de PVB 1, PVB 2 y PVB 5 tiene aproximadamente 8000 nucleótidos, pero en PVB 3, PVB 4 y PVB 6 solamente hay 7300 nucleótidos aproximadamente (Bishop *et al.* 2007).

1.2.3.- Genoma

Los papilomavirus (PV) tienen una organización del genoma muy similar, pues al compararlos se encuentran al menos cinco genes homólogos, aunque la secuencia nucleotídica puede variar en más del 50%. Los estudios filogenéticos sugieren que normalmente estos virus han evolucionado junto con sus especies hospedadores mamíferas o aviares, no cambian de especie hospedadora, no se recombinan y han mantenido su organización genética básica por un periodo mayor de 100 millones de años (Bishop et al. 2007; Campo 2006).

En general el genoma está organizado en tres regiones:

Región temprana, contiene los marcos de lectura abiertos para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Estos genes son los primeros en expresarse durante el ciclo viral, sólo en el epitelio basal, parabasal e intermedio. Están relacionados con la replicación viral (E1, E2, E4 y E5) y con la estimulación de la división celular (E6 y E7), que puede conducir a la oncogénesis.

Región tardía: codifica las proteínas estructurales L1 y L2, que se expresan al final del ciclo viral, sólo en células superficiales.

Región no codificante: también conocida como LCR (Long Control Región) o URR (Upstream Regulatory Region). Presenta de 400 a 1000 pb de longitud en función del tipo de VP, y parece implicada en la regulación de la replicación del ADN viral. Posee tres regiones: (i) el segmento 5' que contiene señales de terminación de la transcripción; (ii) la región central, flanqueada por regiones de unión para E2 que contienen potenciadores específicos del epitelio; (iii) el extremo 3' que contiene también una región de unión a E2 y el promotor de los genes E6/E7 (David Mahan Knipe 2001; Parrish 2011; Joan Murphy et al., 2012).

El esquema genómico de PVB 1, PVB 2 y PVB 5 es similar a la mayoría de los Papilomavirus, pero el de PVB 3, PVB 4 y PVB 6 carecen del gen E6, el cual ha sido reemplazado por el gen E5. El LCR de PVB 1, PVB 2 y PVB 5 contienen 12 sitios de unión a E2 a diferencia de PVB 3, PVB 4 y PVB 6 que contienen solamente cuatro lugares de unión a E2 (Figura 4) (Campo 2006).

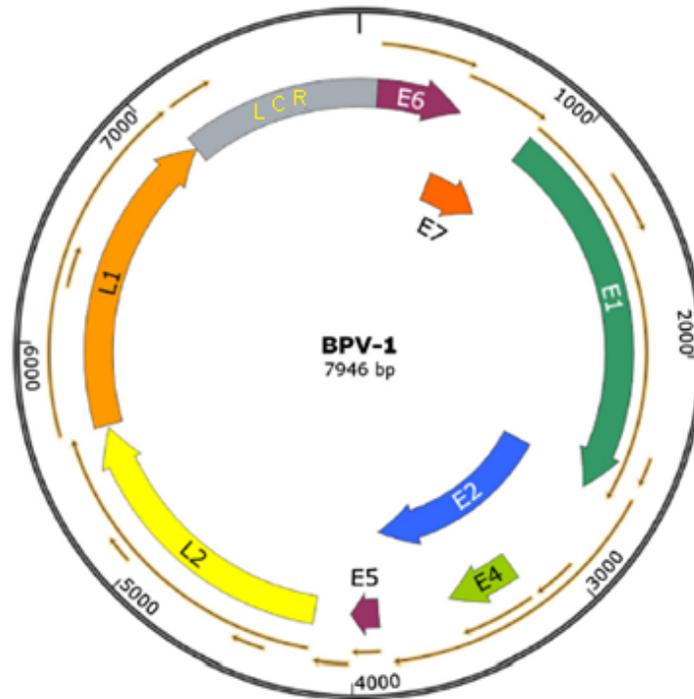


Figura 4. Mapa genómico de BPV 1.

Modificado de Christensen D.N. *et al.*, 2016

1.2.4.- Proteínas virales

Los Deltapapilomavirus codifican tres oncoproteínas, E5, E6 y E7, mientras que los Xipapilomavirus PVB no poseen el gen E6 y sólo codifican E5 y E7. La importancia relativa de cada proteína en la transformación celular varía entre los diferentes PVB. La E5 es la principal oncoproteína del PVB 1, seguido de la E6, con un rol más modesto de la E7.

Las proteínas de transformación del PVB 4 son la E5 y E7, siendo la E5 la que promueve la adquisición del crecimiento independiente de anclaje y la E7 la que induce la ventaja de crecimiento y el lapso de vida extendido (Campo 2006; Parrish 2011).

1.2.4.1.- Proteínas no estructurales:

Proteína E1:

Es una proteína reguladora que se une en forma específica al sitio de origen de la replicación contenido en la región larga de control (CLR, por sus siglas en inglés). Esta unión es de baja afinidad, pero cuando la proteína E2 se agrega, entonces la unión se hace de alta afinidad. Las mutaciones del gen E1 aumentan la transcripción viral y la capacidad transformadora e inmortalizadora del genoma viral. Se piensa que ello ocurre porque E1 es capaz de suprimir al gen p97 promotor de la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Wilson et al. 2005).

Proteína E2:

Posee dominios con diferentes funciones. El dominio carboxilo-terminal se une a la región iniciadora de la replicación en la LCR del DNA viral. El dominio amino-terminal representa el sitio que activa la transcripción del DNA viral, reclutando los factores celulares y estimulando la expresión de genes celulares que codifican proteínas necesarias para activar la maquinaria de transcripción viral. La proteína E2 en su total longitud actúa como estimuladora de la replicación y transcripción del DNA viral. Los fragmentos de proteína E2 actúan como represores de la transcripción viral, compitiendo con la proteína E2 completa para su unión con la RLC, impidiendo la acción estimuladora de la transcripción del DNA viral. El predominio de esta función represora explicaría por qué está reducida la expresión y replicación viral en los estratos inferiores de los epitelios (Wilson et al. 2005).

Proteína E4

La secuencia que codifica para la proteína E4, es de aproximadamente 260 pb, la cual está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4 tiene un peso molecular de alrededor de 10 a 44 kDa; es expresada a partir de un ARNm procesado (E1^{E4}) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral. La expresión de E4 precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza asociada con los filamentos intermedios de queratina, los cuales afectan la estabilidad mecánica de la red de queratina, lo que puede facilitar la liberación de los viriones. La expresión de E4 está en gran medida restringida al citoplasma de la célula del epitelio suprabasal, pero también se ha encontrado de manera difusa en regiones perinucleares (Wilson et al. 2005).

Proteína E5

Las proteínas E5 del PVB 1 y PVB 4 probablemente sean las oncoproteínas mejor estudiadas de estos virus. Ambas proteínas E5 se localizan en los compartimientos de endomembranas celulares, particularmente del aparato de Golgi, y ambas se unen a la 16k ductina/subunidad C de la H⁺ ATPasa. Esta interacción ocasiona la inhibición de la comunicación intercelular por las uniones estrechas y en la falta de acidificación de los endosomas y del aparato de Golgi. Las uniones estrechas son canales para mensajeros secundarios de bajo peso molecular, importantes en el control de la homeostasis de un tejido; si una célula transformada es liberada del control de las células normales circundantes, puede proliferar libremente y ocasionar una clona transformada expansiva. Por consiguiente, la falta de comunicación por las uniones estrechas en células transformadas por Papilomavirus probablemente sea un evento temprano de la transformación y, al aislar a las células recientemente infectadas de sus hermanas normales del alrededor, permite que se

establezcan otros eventos de transformación (Campo 2006; Bishop et al. 2007; Parrish 2011).

La inhibición de la acidificación de los endosomas y del aparato de Golgi conlleva a la alteración del procesamiento y arreglo proteico, lo que ocasiona la retención y reciclamiento de receptores de factores de crecimiento activados desde los compartimientos endosomales. Además, la E5 activa varias proteínas cinasas involucradas en el control del ciclo celular, causando así una desregulación general del programa normal muy controlado de proliferación celular (Robert & Daniel 2007; Parrish 2011).

Proteínas E6 Y E7:

Las proteínas E6 y E7 se unen a otras proteínas resultantes del producto de genes supresores de tumores, bloqueando su acción reguladora de la división celular. Los genes E6 y E7 se transcriben a partir de una región promotora, *p97* y *p103* respectivamente, localizadas en la LCR del genoma viral. La proteína E1 y posiblemente la E2 pueden interactuar con estos lugares específicos de la LCR y modular la actividad del promotor suprimiendo la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Campo 1997; Borzacchiello & Roberto 2008).

Interacción entre la proteína E6 y la proteína p53:

p53 es un factor de transcripción celular, es decir, un factor que controla la expresión de genes específicos. Actúa como un guardián del ciclo celular preservando la fidelidad de la replicación del DNA. Si el DNA celular es dañado, los niveles de *p53* aumentan y se produce una detención del ciclo celular en G1, permitiendo su reparación. Además, *p53* induce apoptosis en células con daño irreparable del DNA. La oncoproteína E6 del PVB se une a *p53* a través de una proteína llamada E6-AP, necesaria para la formación del complejo E6-*p53*. La formación de este complejo, a través de la activación del mecanismo proteolítico de la ubiquitina, produce la degradación de *p53*. La degradación de *p53* impide una adecuada reparación del DNA, lo cual lleva a inestabilidad del

genoma, mutaciones, alteraciones cromosómicas y formación de tumores (Munday 2014; Robert & Daniel 2007).

Se ha observado que en algunos tipos de PV no se requiere de la proteína E6 para que tenga un ciclo infeccioso exitoso, o para que el papiloma progrese a carcinoma en el caso del PVB 4. Esto conlleva a la pregunta de si las funciones de E6 no son requeridas por el PVB 4, o si estas funciones son proporcionadas por otra proteína viral o del hospedero. Por lo tanto, en ausencia de las funciones tipo E6, la actividad controladora del *p53* debe ser, ya sea pasada por alto o abolida por cofactores durante el desarrollo del papiloma y el progreso de la neoplasia a carcinoma. Esto es confirmado por la observación de que el gen *p53* está mutado en al menos algunos papiloma y carcinomas (Campo 2006; Parrish 2011).

Interacción entre E7 y pRb:

Durante la fase S, G2 y la mitosis temprana, la pRB es fosforilada por enzimas quinasas ciclino-dependientes y pasa a su forma inactiva, permitiendo la labor del factor de transcripción. La oncoproteína E7 se une a pRb en el mismo sitio de unión que el factor de transcripción E2F desplazando a este último de modo que queda libre para activar la replicación y transcripción del DNA. La inactivación funcional de, pRB, permite la progresión de la célula a la fase S del ciclo celular (fase de replicación del DNA) (Robert & Daniel 2007).

1.2.4.2.- Proteínas Estructurales

Proteína L1

Las diferencias genotípicas entre los tipos de papiloma virus se determinan por los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína L1 (proteína estructural del virus que posee además efecto antigénico). Cuando la proteína L1 es expresada en sistemas *in vitro*, tiene la capacidad de auto ensamblarse espontáneamente, adquiriendo una conformación estructural y antigénica

similar al virus nativo, pero sin ser infecciosa. Tales estructuras se conocen con el nombre de VLPs y hasta el momento los ensayos clínicos en humanos muestran que son inmunógenas, bien toleradas y proporcionan protección (Lowy & Schiller 2006).

L1 es la principal proteína estructural de la cápside debido a su participación en la entrada del virus a la célula hospedera. En la estructura tridimensional de esta proteína se distinguen tres regiones bien definidas: el núcleo y los extremos amino y carboxilo (Chen et al. 2000). La proteína L1 está compuesta por 504 aminoácidos. El extremo amino lo componen los primeros 19 aminoácidos que están marcadamente conservados entre los diferentes genotipos, lo que sugiere que cumplen un papel fundamental en el ensamblaje de la partícula viral (Robert & Daniel 2007).

En la región central o el núcleo de la proteína se encuentran ubicados los aminoácidos del 20 al 382 cuya estructura tiene forma de barril compuesto por 8 láminas β plegadas las cuales están conectadas entre sí por los lazos o bucles que están expuestos en la superficie del capsómeros (Chen et al. 2000).

Entre los lazos F-G y H-I y las láminas β -F y β -G1 respectivamente, se establecen puentes de hidrógeno que mantienen los monómeros de L1 juntos y confieren estabilidad a la estructura terciaria del barril. Los aminoácidos del 383 al 504 están en el extremo carboxilo y en él se ubican las hélices α (α 2, α 3, α 4 y α 5) que tiene esta proteína. La hélice α 1 interacciona con las láminas β -E y β -F en la parte central o núcleo de la proteína. Las hélices α 4 y α 5, albergan la lámina β -J y esta ancla el brazo C-terminal a la región terminal central o núcleo de la proteína (Figura 5). El brazo C-terminal es muy flexible gracias a que las posiciones de la 403 a la 413 son ricas en glicinas y prolina. Se ha postulado que este segmento actúa como una bisagra que facilita los reordenamientos espaciales que debe hacer el extremo carboxilo para

asegurar la estabilidad de la cápside viral. El extremo carboxilo, también es importante para mantener la integridad de L1, ya que cuando se introducen mutaciones en este extremo, la cápside es más susceptible a la digestión proteolítica por tripsina (Chen et al. 2000).

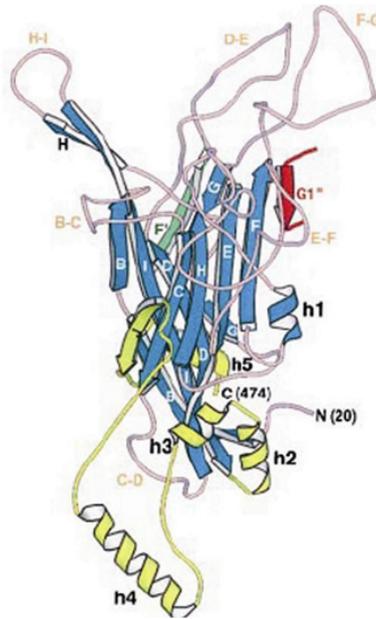


Figura 5. Monómero L1. La figura muestra residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a la 474. La región central de la proteína está conformada las hojas β y en rosa los bucles que las conectan. En amarillo se representa la región C-terminal de L1.

El conocimiento acerca de la estructura de la proteína L1 es importante porque permite determinar las regiones expuestas en la superficie de esta proteína, lo cual tiene implicaciones en la ubicación de epítopes neutralizantes que pueden ser determinantes importantes para la protección inmune mediada por anticuerpos, lo que constituye una información esencial para el desarrollo e implementación de futuras vacunas profilácticas. La secuencia de aminoácidos de la proteína L1 presenta regiones conservadas e hipervariables. Estas últimas están preferentemente ubicadas en zonas expuestas en la superficie del capsómero, dichas regiones son las que conforman los bucles o asas B-C, D-E, F-G y H-I (Robert & Daniel 2007).

Proteína L2

Es una proteína de unión a ADN, muy importante para la encapsulación del genoma viral. Es la proteína menor de la cápside de los PV, y tiene otras funciones además de papel estructural. Contribuye a la unión de los viriones a los receptores celulares, facilita el ingreso del virión y su transporte hacia el núcleo, entrega el ADN viral a los centros de replicación, ayuda a empaquetar el ADN viral dentro de las cápsides y, debido a que los L2 de varios PV tienen un epítipo común de neutralización, puede actuar como un instrumento para dar inmunidad hacia varios tipos de virus (IARC 2000; Freitas et al. 2011).

L2 interactúa con la superficie celular luego de que la cápside se ha unido. Esto sugiere, como ya se mencionó antes, que existen varios receptores celulares para el virus, y que luego de la interacción de baja especificidad entre L1 y los receptores celulares, ocurre un cambio en la conformación de la cápside, que le permite a L2 exponer sus epítopos e interactuar con el receptor secundario más específico (IARC 2000).

Después del ingreso del virus, la L1 permanece ampliamente distribuida en el citoplasma, mientras que L2 tiene una distribución radial alrededor del citoplasma y se acumula en la región perinuclear, lo cual sugiere que L2 ayuda en el transporte de las cápsides a través del citoplasma, por medio de filamentos de actina (IARC 2000).

La L2 deposita el ADN viral en los ND10s, acción muy importante para una transcripción y replicación del genoma viral eficiente; y recibe el apoyo de E2. En etapas más tardías del ciclo de vida del virus, la unión de la recién sintetizada L2 al ADN viral, y la dispersión de los ND10s por acción de E4 facilitan el ensamblaje de la cápside (IARC 2000).

1.2.5.- REPLICACIÓN VIRAL

Unión a la superficie celular

Los mecanismos de unión y entrada en la célula aún son objeto de investigación. La integrina α -6 fue la primera proteína candidata como receptora para los PV (David Mahan Knipe 2001; Joan Murphy, Erin B. Kennedy, Sheila Dunn, C. Meg McLachlin, Michael Fung Kee Fung, Danusia Gzik, Michael Shier 2012). Los PV también se pueden unir a heparán sulfato, y glucosaminoglucanos de la superficie celular (Robert & Daniel 2007; Vaccarella et al. 2010). La unión estaría mediada por los 15 últimos aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína L1 (Bousarghin et al. 2003). Los viriones entran en la célula por endocitosis mediante una vía dependiente de clatrina (Kamper et al. 2006; Parrish 2011).

El retraso en la internalización es acompañado por cambios en el modo de unión y posiblemente la transferencia a un receptor secundario, los viriones también utilizan la proteína menor de la cápside L2. Se ha demostrado que la proteína L2 interactúa específicamente con la subunidad de la S100A10 heterotetrámero de anexina A2 en la superficie de los queratinocitos que contribuye a la internalización HPV16 y la infección de las células epiteliales (Scheffer et al. 2014).

Pasaje al citosol y núcleo

Los virus aprovechan las estructuras y mecanismos celulares normales para la internalización de sustancias. Los viriones son internalizados vía un camino endocítico clatrin-dependiente, la cual inicialmente es dependiente de actina para la formación de vesículas, pero después requiere de microtúbulos para el transporte vesicular. La descapsidación tiene lugar en el endosoma, la reducción de los enlaces disulfuros intercapsoméricos y la acidificación de los endosomas probablemente desencadenen el desnudamiento del genoma viral

y liberación las proteínas de la cápside en las vesículas. La proteína L2 media la unión del genoma viral a los microtúbulos, facilitando de este modo el transporte intracitoplasmático y tal vez es la chaperona del genoma viral para que éste entre al núcleo (Kamper et al. 2006). Una vez en el núcleo el genoma viral no se integra al ADN celular y permanece como extracromosomal (David Mahan Knipe 2001; Parrish 2011).). Una característica peculiar de la infección por papilomavirus es que ocurre una lenta internalización. Viriones de PV 1, pudieron ser identificados en la superficie celular después de 8 horas, y la internalización completa puede tomar hasta 48 horas (Kamper et al. 2006).

Transcripción, regulación de la transcripción de los PV y liberación de los virus.

Siguiendo con la unión y entrada del virus; los viriones migran a los núcleos y establecen sus genomas como multicopias de plásmidos extracromosomales, que son mantenidos en aproximadamente 20 a 100 copias por célula basal infectada. El ADN viral se distribuirá entre las células hijas, y se postula que al mantenerse en bajo número de copias, impedirá la activación de la respuesta inmune (Lowy & Schiller 2006).

Todos los marcos de lectura abierta (ORF) están situados en una sola cadena, indicando que la transcripción ocurre solamente en una cadena. La transcripción es regulada por el estado de diferenciación de la célula infectada y es complejo, debido a la presencia de promotores múltiples, patrones de empalme alternos y múltiples, y producción diferenciada de RNAm en diversas células (Lowy & Schiller 2006). Las células basales proliferativas migrarán a los estratos parabasal e intermedio, iniciando el programa de diferenciación y con él la transcripción de los distintos genes virales tempranos, regulada a través de la región LRC (David Mahan Knipe 2001; Parrish 2011).

La replicación de PVB se basa en una interacción física entre el dominio helicasa de E1 y el dominio activador de E2 cuando las proteínas están sujetas al Ori. La unión de la proteína E1 y E2 a sus respectivas secuencias de reconocimiento en la RLC es requerida para el reclutamiento del ADN polimerasa y otras proteínas de replicación del ADN celular al origen de la replicación del ADN viral. La proteína E1 tiene actividad ATPasa y helicasa, que es necesario para el desenrollamiento del ADN viral, permitiendo de esta manera una eficiente replicación viral (David Mahan Knipe 2001; Parrish 2011).

La expresión de E4 ocurre en el estrato espinoso y granular simultáneamente a la replicación viral (Wilson et al. 2005), la cual ocurre en la fase S del ciclo celular a través de la acción de las proteínas virales E1 y E2 en cooperación con las proteínas de replicación celular (E5, E6, E7) y en sincronización con los cromosomas de la célula del hospedero. Mientras las células se diferencian, el programa de expresión génica tardía es activado y las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2 son expresadas en el estrato granular. Durante la morfogénesis del virión la L2 se liga al DNA favoreciendo su encapsidación. Finalmente, los viriones son ensamblados y liberados con las escamas de queratina (Wilson et al. 2005; Parrish 2011).

1.3.- PATOGENIA Y PATOGÉNESIS

Los papilomas se desarrollan después de la introducción del virus a través de abrasiones en la piel o por activación de virus que se encuentran latentes. La infección de células epiteliales resulta en hiperplasia con subsecuente degeneración e hiperqueratinización. Éstos cambios inician usualmente después de cuatro a seis semanas de la exposición. En general los papilomas persisten por uno a seis meses antes de la regresión espontánea, existe un patrón secuencial del desarrollo de papilomas:

En el primer estadio los papilomas aparecen como placas ligeramente aumentadas, ocurre aproximadamente a las cuatro semanas después de la exposición se presenta hiperplasia de la capa que se encuentra debajo de la dermis y proliferación epitelial temprana en asociación de fibromas nacientes.

En el segundo estadio los fibropapilomas se caracterizan por citopatología inducida por el virus, replicación del virus y agregados cristalinos de viriones en el epitelio queratinizado de las lesiones, ocurriendo a las ocho semanas. Durante este estadio la epidermis proliferante se extiende invasivamente en la capa debajo del fibroma.

En el tercer estadio los fibropapilomas se caracterizan por bases fibrosas, pedunculadas y rugosas, lobuladas o con superficies fungiformes, iniciando a las doce semanas.

En la fibropapilomatosis cutánea se observa la presencia de proliferaciones exofíticas de la epidermis y de la dermis subyacente. Se caracteriza por el crecimiento excesivo de fibroblastos del tejido conjuntivo, en contraste con el papiloma que tiene menor proporción fibroblástica (escaso tejido dérmico) y mayor cantidad de tejido epitelial (David Mahan Knipe 2001; Parrish 2011).

Papilomas y fibropapilomas pueden presentarse en diferentes órganos como piel, glándula mamaria, tracto gastrointestinal superior y genitales (vulva, pene y prepucio). Los diferentes genotipos de papilomavirus bovinos se relacionan con un tipo específico de lesión (David Mahan Knipe 2001).

Los PVB 1 y 2 se encuentran frecuentemente asociados a papilomas cutáneos, en glándula mamaria, pene y en casos de cáncer de vejiga urinaria. (Freitas et al. 2011). Los PVB 1 y 2 se encuentran frecuentemente asociados a papilomas cutáneos, en glándula mamaria, pene y en casos de cáncer de vejiga urinaria

(Tsimonaki et al. 2003). El PVB 6 se ha relacionado con la aparición de papilomas aplanados en forma de hoja en las ubres (Forslund et al. 2003). PVB 9 y 10 están asociados a papilomas de epitelio escamoso de la ubre (Hatama et al. 2008; Borzacchiello & Roperto 2008). En el caso de PVB 11, fue descubierto en lesiones de fibropapilomas en ubres de ganado bovino en Japón (Hatama et al. 2011).). La tumorigenicidad de este virus es actualmente incierta. El PVB 12 ha sido caracterizado en Japón a partir de un papiloma epitelial localizado en la lengua de una vaca infectada (Zimmermann et al. 2016). Los Epsilonpapillomavirus se han descrito asociados a fibropapilomas y papilomas epiteliales, PVB 5 induce fibropapilomas de tipo “grano de arroz”, PVB 8 y 13 generan papilomas cutáneos y se han detectado en piel sana. El único que no se encuentra clasificado en ningún género es PVB 7, que según Ogawa y colaboradores debe ser clasificado como un género nuevo de la familia Papillomaviridae ya que presenta una baja similitud con los tres géneros donde se sitúan los papillomavirus bovinos descritos hasta ahora. Este genotipo se aisló de un papiloma cutáneo y de piel de ubre sana, lo que indica que podría producir infecciones latentes o subclínicas con ausencia de signos clínicos de enfermedad (Tomita et al. 2007).

En general la expresión de los genes virales tempranos (E1, E2, E5, E6 y E7) es activada en el estrato basal y suprabasal del epitelio (O'Brien & Saveria Campo 2002). Las proteínas codificadas por los marcos E5, E6 y E7 aumentan la tasa de división y retrasan la maduración celular en el estrato germinal y sucesivos, cuyas células se acumulan y dan lugar al papiloma naciente (Campo 1997). La expresión de E4 y la replicación del ADN viral ocurre en el estrato espinoso y granular. La replicación del genoma viral se da a través de la acción de las proteínas virales E1 y E2 en cooperación con las proteínas de replicación celular. L1 y L2 son proteínas capsídicas, que son expresadas en el estrato granular. Finalmente, los viriones son ensamblados en el estrato

escamoso y son liberados con las escamas de queratina (O'Brien & Saveria Campo 2002).

1.3.1.- Hospedero

Especie:

Los papilomavirus bovinos se han descrito tradicionalmente en vacas y toros (*Bos taurus*). Aunque es conocido que los PV son virus específicos de especie, se ha descrito la existencia de infecciones por PVB en hospedadores filogenéticamente bastante distantes. Dentro del grupo de los artiodáctilos, los PVB 1 y 2 se han aislado en fibropapilomas cutáneos y vulvares en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y en yaks (*Bos mutus*), ambos en la India. Incluso se ha documentado la presencia de PVB en tumores de vejiga urinaria en búfalos de forma similar al vacuno (Kumar et al. 2013).

Raza y Sexo:

Según da Silva et al., el BPV no presenta predilección por sexo o raza. Sin embargo, Melo C. and Leite R. 2003 refieren que los animales de la raza holandesa de la variedad negro y blanco presentan una mayor ocurrencia de la enfermedad.

Edad

Los papilomas se presenta más frecuente en bovinos y equinos jóvenes, los animales más susceptibles son los becerros de menos de seis meses de edad (Radostits & Arundel 2002). Melo y colaboradores (2003) menciona que se ha observado preferentemente en bovinos receptivos, entre los 6 meses y 2 años de edad. La falta de susceptibilidad de los adultos para la infección natural se considera debido a la inmunidad adquirida por infección aparente o inaparente cuando eran jóvenes. Las lesiones en becerros tienden a involucionar en el plazo de un año o menos, en terneras menores a 2 años las lesiones se presentan con mayor frecuencia en la cabeza, en especial alrededor de los

ojos, así como en el cuello y los hombros, pero también pueden extenderse a otras partes del cuerpo (Murphy 1999; Radostits & Arundel 2002).

1.3.2.- Transmisión

El periodo de incubación puede ir de uno a seis meses. El virus entra a través de piel y la transmisión exitosa requiere de una abrasión en el sitio de exposición que subsecuentemente se vuelve el sitio de la lesión. El ganado bovino es el hospedero del virus, la transmisión del PVB ocurre vía contacto directo con animales infectados o vía contacto indirecto con objetos contaminados como pueden ser narigueras, descornadores, tatuadores, aretadores, postes de frotación, alambradas entre otros, el riesgo se incrementa si son punzocortantes, por ejemplo; tachuelas, clavos, agujas hipodérmicas (Parrish 2011).

La transmisión también puede ocurrir vía vertical de una madre infectada a la cría (Chow et al. 2010).

1.2.3.- Cuadro clínico

En principio las lesiones oscilan desde nódulos pequeños y consistentes hasta grandes masas con aspecto de coliflor, al tacto pueden ser espinoso o rugoso. Inicialmente son de una consistencia blanda, carnosa, con una coloración rosada o gris-rosada, más tarde se endurecen por queratinización del epitelio. Los papilomas tienden a sangrar por abrasiones, lo que les da una coloración más oscura además debido a la necrosis del tejido despiden un olor fétido. Papilomas con forma filiforme pueden presentarse en las aberturas naturales del cuerpo en los límites entre la piel y la mucosa. Los papilomas que se ubican en nariz, laringe, o boca (especialmente se ubican detrás de los dientes incisivos o en el paladar blando) en vulva o pene, tiene aspecto de tejido de granulación debido a su color gris-rojizo, superficie irregular y tendencia a sangrar; muchas veces son pediculados y pueden alcanzar el tamaño de un

puño. Según sea su dimensión pueden llegar a dificultar la respiración, la ingesta o la monta. (Rebhun 1999)

Los fibropapilomas de esófago o de la mucosa pre-estomacal son blanquecinos y coraliformes, muchas veces se observan durante la faena o al examen por endoscopia y rumenotomía exploratoria; pueden alterar la deglución, el eructo, la rumia o el pasaje de la digesta a través de los preestómagos. Las verrugas del tracto alimentario rara vez se observan clínicamente, excepto al examinar la boca, durante la endoscopia de esófago o durante la rumenotomía. Las lesiones generalmente se observan durante la examinación *post mortem*. La hematuria enzoótica conduce a la hematuria evidente y la disuria o a la estranguria en las vacas afectadas que se alimentan a base de pastos que contienen frondes de helecho (W. F. H. Jarrett et al. 1978; Borzacchiello et al. 2003).

Los papilomas y fibropapilomas que se presentan sobre la piel de pezones y ubre pueden ser filiformes; del tamaño de un grano de trigo, alargados, cuyo extremo está deflecado, redondeados u ovalados; tumores planos de las dimensiones de una arveja a una moneda, separados del resto del epitelio por un surco, o parecidos a un grano de arroz; inclusiones duras y blanquecinas de la piel del pezón. Al momento de la ordeña pueden generar dolor y malestar en el animal, cuando se ubican en el orificio del pezón pueden predisponer a infecciones bacterianas en el cuarto mamario. Las verrugas pueden impedir el ordeño eficaz o ser irritadas por el ordeño, pero rara vez causan problemas graves, a no ser que se encuentren el extremo de los pezones, en estos casos los riesgos son el impedimento en el ordeño eficaz y la mastitis (David Mahan Knipe 2001; Parrish 2011)

1.4.- EPIDEMIOLOGÍA

1.4.1.- Situación actual

La papilomatosis bovina es una enfermedad de distribución mundial (Hatama et al. 2008). A la fecha no se registran datos epidemiológicos que provengan de instituciones gubernamentales o internacionales, por lo que la información existente relacionada a la papilomatosis bovina se limita a los estudios realizados por particulares y reportados a través de artículos científicos.

En Egipto, la prevalencia de papilomatosis en los Oasis del Norte es del 4,86%; siendo mayor en hembras (2,99%) que en machos (1.87%), y también mayor en animales menores de un año de edad (2.99%). Se observó también que alrededor del 75% de los animales con la enfermedad presentaban infestación por garrapatas, el 30% presentaba fasciola hepática y el 38% tenía otros parásitos gastrointestinales principalmente nematodos. En cuanto a edad, el 61,5% de los animales era menor a un año; el 23% menor a 2 años y 15,4% era mayor a los dos años de edad. La mayor afección en animales jóvenes se relaciona con el desarrollo de su sistema inmune y debido al pH alcalino de la piel de los animales más jóvenes y a que son más susceptibles a la infestación por parásitos. (Salib & Farghali n.d.).

En la provincia de Ilam, Iran se realizó una investigación en una vaquería durante los meses de mayo a julio del 2009. En esta vaquería, de 120 vacas Holstein, se observaron 15 animales, con una edad promedio de 2 - 5 años, verrugas en las porciones distales de los pezones, tanto posteriores como anteriores reportándose una prevalencia del 12.5% (Ebrahim & Kamran 2011).

Las infecciones por BPV son comunes en el ganado bovino, donde se estima que alrededor del 50% del ganado tiene lesiones por BPV en el Reino Unido (Campo 1995). En Alemania se detectaron los PVB tipo 1, 6, 8 y 10 a partir de muestras de verrugas (Schmitt et al. 2010).

En Japón, se encontró que las novillas presentaban tumores benignos en los pezones causados por PVB tipo 6 (Maeda et al. 2007). (Ogawa et al. 2004) detectaron los tipos 1, 3, 5 y 6 en muestras de papilomas. En la India se encontraron PVB subtipo 1 y 2 de en verrugas cutáneas de bovinos y (Rai et al. 2011) identificaron el tipo 10 a partir de verrugas en los pezones de ganado en una granja lechera.

En el ganado que se encuentra en Brasil se han llevado cabo diversas investigaciones en relación a la presencia de PVB, se han identificado los subtipos 1, 2, 6 y 8 en las verrugas en piel de ganado al Sur de éste país (Sá Silva et al. 2010). En el noreste del mismo país, revelaron la presencia de los tipos BPV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 con la excepción de PVB 7 en las muestras de lesiones cutáneas de diversos sitios anatómicos de bovinos en una granja lechera (Carvalho et al. 2012). También en este país en muestras de lesiones cutáneas de equinos caracterizadas y diagnosticadas como sarcoma se identificaron los PVB 1, 2 y 13 (Alcantara et al. 2015).

Se ha detectado el PVB subtipo 4 asociado al desarrollo de tumores en el tracto gastrointestinal superior en Brasil, en el valle Nasampolai de Kenia, en las tierras altas del oeste de Escocia y en el sur de Italia (W. F.H. Jarrett et al. 1978; Borzacchiello et al. 2003).

En Europa continental, las Islas Azores, algunas regiones de Kenia, Brasil, Nueva Zelanda, India y China se ha detectado los PVB subtipo 1 y 2 en casos de cáncer de vejiga urinaria en el ganado (Borzacchiello & Roperto 2008).

En Estados Unidos de Norteamérica se ha demostró la presencia de los subtipos 1 y 2 asociados a sarcoide equino (Carr et al. 2001; Chambers et al. 2003; Wobeser et al. 2010; Jagu et al. 2011; Bocaneti et al. 2016)

En México hasta el momento existe un estudio único donde se reportaron los subtipos 1 y 2 de PVB en el ganado bovino en el estado de Tamaulipas (Rojas-Anaya et al. 2016).

En un estudio realizado en el estado de Yucatán se estimó la prevalencia de la papilomatosis en un hato bovino donde se encontró una prevalencia del 20% de PB (21/105). El examen clínico indicó que 47.6% de los animales presentó papilomas planos, 38.1% papilomas pedunculados y 14.3% ambos tipos de papilomas (Vivas et al. 2015).

En el estado de Veracruz en un estudio se evaluó la efectividad de un tratamiento aplicado en las verrugas de bovinos usando Ivermectina, se utilizaron 20 animales con lesiones cutáneas sugerentes a papilomas (Pulido Casas 2009), en este mismo estado se describió un caso clínico de una lesión sugerente a papilomavirus donde solo se reportó el caso y se realizó remoción quirúrgica de dicha lesión (De Jesús Arieta Román et al. 2014).

1.4.2.- Impacto económico

Las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad se deben a la depreciación en el valor de venta en pie y la calidad de la piel, crecimiento retardado de los animales, pérdida en la ganancia de peso, disminución de la producción de leche, las restricciones en la movilización de los animales y en el caso de toros prospectos a sementales si las lesiones son graves en la mucosa peniana e interfiere con la reproducción amerita el sacrificio del animal (Borzacchiello 2013).

En Tamaulipas, la papilomatosis representa un problema sanitario generando pérdidas económicas debido a la disminución en las ventas a Estados Unidos. El estado exportó de Enero a Junio 60, 374 cabezas de ganado

correspondientes a 50, 393 becerros y 9,981 vaquillas (SIAP 2017) Tomando en cuenta que esta enfermedad afecta a un 30% de la población de un hato se puede estimar que 18, 112 bovinos estarían afectados.

En baso a los datos de comercialización usados en el estado de Tamaulipas es posible realizar la siguiente inferencia:

Un becerro para exportación de 180kg se subasta en \$60/kg esto equivale a \$10,800.00 MN.

Un becerro para exportación con papiloma se subasta en \$40/kg equivalente a \$ 7,200.00 MN.

La diferencia obtenida sería de \$3,600.00 por animal infectado.

(Comunicación personal con el Dr. Antonio Cantú Covarrubias).

Esto causa pérdidas considerables en el ganado bovino y especialmente en las razas especializadas por limitar su movilización y venta como es el caso de hembras y toros prospectos a sementales que son ofertados en los programas de mejoramiento genético.

1.4.3.- Diagnóstico

Debido a su forma característica y su presentación clínica, los papilomas y fibropapilomas cutáneos son fáciles de reconocer, por lo que el diagnóstico mediante técnicas de laboratorio es requerido con poca frecuencia.

Tradicionalmente se utiliza la histopatología y la microscopía electrónica. También se puede realizar estudios serológicos como la prueba de ELISA, Fijación de Complemento así como la prueba de inmunodifusión (Murphy 1999; Radostits & Arundel 2002)

En humanos es común realizar ensayos de hibridación y PCR para detectar el ADN de los papilomavirus, dichas pruebas se pueden aplicar en la diagnóstico de la enfermedad en bovinos, sin embargo no se llevan a cabo.

1.4.4.- Tratamiento, prevención y control

La prevención y el tratamiento son difíciles de evaluar, debido a que la enfermedad es autolimitante y su duración es variable. No es posible el establecimiento de normas específicas de seguridad para el control de la papilomatosis, debido a la naturaleza tan impredecible de la misma, y debido a que esta enfermedad no se considera de importancia económica. Se han utilizado a lo largo de los años una gran variedad de tratamientos, pero ninguno completamente efectivo; por ejemplo, se ha utilizado el interferón alfa bovino, pero sin muchos efectos positivos. Otros tratamientos también incluyen el uso de terapias hemodinámicas y de la autovacuna mediante inoculación de tejidos de verrugas tratados con formalina. La vacunación con proteínas de la cápside viral ha sido más efectiva pero sólo para un tipo específico de virus (Murphy F, 2009), esta vacuna debería contener todos los tipos de BPV para ser completamente efectiva.

Es recomendable el evitar el contacto directo entre animales infectados y sanos, realizar cuarentenas para limitar la transmisión y que el equipo para manejo sea sanitizado adecuadamente (Radostits & Arundel 2002).

Debido a la presencia de ADN viral en fluidos corporales como mecanismo de prevención y control sería recomendable el análisis de los bancos de semen para evitar la transmisión del virus (Lindsey et al. 2009).

2.- JUSTIFICACIÓN

El estado de Tamaulipas ocupa el tercer lugar nacional en exportación de ganado bovino, la presencia de lesiones por papilomatosis bovina puede impedir la movilización y comercialización del animal a la inspección sanitaria.

En México a la fecha la información existente es muy limitada en cuanto al estudio de la papilomatosis bovina, por lo que es importante realizar este estudio para detectar e identificar los genotipos presentes en las verrugas del ganado bovino de dos regiones en el estado de Tamaulipas, lo cual permitirá establecer mejores técnicas de diagnóstico y de control de la enfermedad

3.- HIPÓTESIS

La caracterización del virus permitirá identificar los genotipos de papiloma bovino que se encuentran infectando a los bovinos de dos regiones en el Estado de Tamaulipas.

4.- OBJETIVOS

4.1.- General

Detectar una región del gen *L1* a partir de muestras de verrugas, obtenidas de bovinos de dos regiones del estado de Tamaulipas, mediante PCR y su secuenciación para realizar un estudio de filogenia, que permita determinar los genotipos de papilomavirus presentes.

4.2.- Específicos

Estandarizar la PCR con iniciadores, que amplifiquen una región del gen *L1* de los virus de papiloma bovino.

Detectar una región del gen *L1*, a partir de muestras de papilomas obtenidas de bovinos.

Analizar las secuencias genéticas amplificadas, para determinar los tipos de papiloma bovino.

5.- METODOLOGÍA

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología en Salud Animal, del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias y Microbiología Animal, ubicado en la Carretera Federal México-Toluca.

5.1.- Población de estudio

Se utilizaron 45 muestras de verrugas de bovino, con morfología correspondiente a “coliflor”, de tamaño variable de 0.5 a 1 cm, las cuales fueron remitidas al laboratorio provenientes del Estado de Tamaulipas, específicamente de los municipios Díaz Ordaz, Reinososa, Soto La Marina, y Aldama.

5.2.- Procesamiento de las muestras

De cada muestra se extrajo ADN genómico, de acuerdo a las indicaciones del Kit Comercial QIAmp Mini kit 50®, marca Quiagen con Número de Catálogo 51304. El ADN fue cuantificado a una absorbancia de 260 nm, en un espectrofotómetro (Nanodrop) y almacenado a una temperatura de -70°C, en un ultracongelador hasta su uso.

5.3.- Diseño de iniciadores y estandarización de la prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa.

El diseño de los iniciadores a utilizar en la PCR, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del CENID-MA (INIFAP), y se sintetizaron por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo un pedido comercial.

Cada PCR fue realizada con una mezcla de reacción la cual contuvo: 1.8 mM Mg Cl₂ de amortiguador de reacción con Mg Cl₂ (10 X), .2 µM de mezcla de nucleótidos grado PCR, .2 µM de cada iniciador, 3.7 Unidades/reacción de

enzima Taq polimerasa de alta fidelidad y 750 ng por reacción de ADN en un volumen final de 50 µL. Las condiciones encontradas para la amplificación por PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos en tres etapas cada uno; Desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 30 segundos, finalizando con la extensión final a 72°C por 3 minutos mediante un termociclador PCR BioRad. Al finalizar la PCR, el producto fue analizado mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo 10 µl de bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador con luz UV.

Las amplificaciones que comparadas con el marcador de pares de bases correspondieran con el amplicón de 196 pb, se consideraron positivas.

5.4.- Purificación y secuenciación

Veintisiete productos de PCR positivos de interés, fueron recuperados del gel y purificados siguiendo las indicaciones del Kit comercial extracción en gel QUIAQuick® (250) marca Quiagen con número de catálogo 28706. El Amplicón purificado fue almacenado a -20°C hasta su posterior secuenciación nucleotídica, la cual fue realizada mediante el método de Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM ubicado en Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CDMX 62210, bajo una solicitud de servicio.

Los cromatogramas recibidos fueron analizados y editados mediante el uso de la paquetería del Software Bioedit®, para la obtención de secuencias limpias, así mismo cada una de las secuencias fue analizada con la herramienta BLAST para determinar identidad genética.

5.5.- Análisis filogenético

Las veintisiete secuencias obtenidas fueron sometidas a un alineamiento múltiple, usando el algoritmo MUSCLE mediante el Software Mega versión 6, y comparadas con 36 secuencias tomadas de la base de datos del GenBank, de los cuales catorce son representativos de todos los genotipos reportados hasta la fecha del PVB.

Para el análisis filogenético se usó el software MEGA 6® (Tamura et al. 2013) para el cual se consideraron los siguientes parámetros: Como modelo de sustitución nucleotídica se utilizó el método de Kimura dos parámetros (Kimura 1980), elegido con base en el valor obtenido por el criterio de información bayesiana. Como método de reconstrucción filogenética se utilizó el método de Máxima Verosimilitud (Guindon & Gascuel 2003), como método de soporte estadístico se utilizaron 1000 réplicas de bootstraps (Felsenstein 2008).

Posteriormente, con la finalidad de conocer la relación filogenética de las secuencias encontradas en el estudio, con otros previamente publicados en otros países, se realizó una reconstrucción filogenética con secuencias procedentes del GenBank.

6.- RESULTADOS

6.1.- Detección molecular.

6.1.1.- Características de los iniciadores diseñados

Cuadro 1. Características de los iniciadores diseñados.

| Iniciador | Secuencia 5' | Tamaño | % GC | Tm ^a | Amplicón |
|----------------|---------------------|--------|------|-----------------|----------|
| L1Efor 3291 | TCTATCGGGGCCAAACTGT | 20 | 50 | 60°C | 196 pb |
| L1Erev 3292 | GGTGCCAGTTACAGTACCT | 20 | 55 | 60°C | |

^a Tm propuesta por el fabricante posterior a la síntesis de los iniciadores (IBT-UNAM)

6.2.- Amplificación mediante PCR

Una vez que se estandarizó la técnica de PCR para detectar el ADN viral del PVB, los productos positivos amplificaron bandas de 196 pares de bases (pb) de nucleótidos (Figura 6). Los resultados para las 45 muestras analizadas se muestran en el (Cuadro 2).

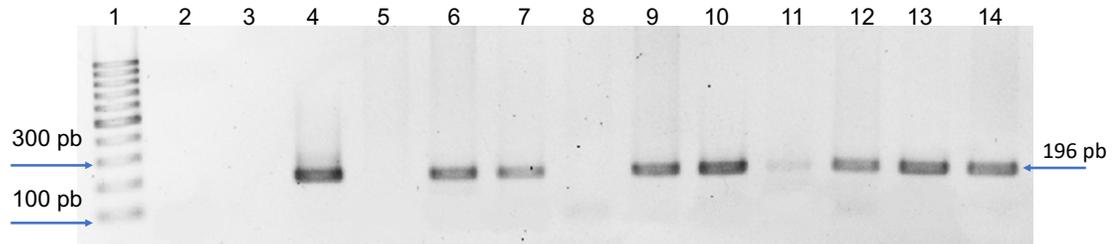


Figura 6. Visualización de productos de amplificación de 196 pb de un fragmento del gen *I1* de PVB. Gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y separados mediante electroforesis. El carril 1 contiene marcador de pares de bases (100 pb). Los carriles 2 y 4 contienen el control negativo y positivo respectivamente. Del carril 5 al 14 contiene productos de amplificación de las muestras de campo de bovinos del estado de Tamaulipas.

De un total de 45 muestras evaluadas mediante la prueba de PCR, se detectaron 27 (60 %) muestras positivas al PVB y 18 (40%) resultaron negativas a la prueba. De este modo, se puede deducir que se detectó el 100% en el total de bovinos evaluados para la región Noreste y un 56 % para la región Sureste.

Cuadro 2. PCR positivo a un fragmento del gen *L1* del PVB, correspondiente a muestras de tres regiones diferentes del Estado de Tamaulipas

| Región | Municipio* | n | Positivos (%) | Negativos (%) |
|------------------------|--------------|-----------|------------------|------------------|
| Noreste | A | 3 | 3 (100.0) | 0 (0.0) |
| | B | 1 | 1 (100.0) | 0 (0.0) |
| | Total | 4 | 4 (100.0) | 0 (0.0) |
| Sureste | C | 15 | 9 (60.0) | 6 (40) |
| | D | 26 | 14 (53.8) | 12 (46.6) |
| | Total | 41 | 23 (56.0) | 18 (44.0) |
| Total Evaluados | | 45 | 27 (60.0) | 18 (40.0) |

* A: Reynosa; B: Díaz Ordaz; C: Aldama; D: Soto La Marina

6.3.- Secuenciación nucleotídica.

A partir de las muestras positivas a 196 nt. el ADN de cada una de ellas se purificó y se secuenció, para posteriormente editarlas quedando 131 nt. por muestra.

6.4.- Análisis filogenético

La inferencia del árbol filogenético se realizó a partir las secuencias de diferentes subtipos y regiones del mundo publicadas en el GenBank. Los datos de las secuencias se muestran en el Cuadro 3.

Las secuencias de las muestras analizadas, así como las correspondientes a los números de acceso X02346, AB626705, X0246 Y KC595244 se agruparon en el mismo clado dentro del subtipo 1 de PVB que corresponde a la clasificación *Deltapapilomavirus*, como se puede observar que el valor de la distancia entre las diferentes muestras de este estudio es “cero” (Figura 7).

Cuadro 3. Distribución de subtipos basados en secuencias del gen L1 del PVB referidas.

| País | No.acceso GenBank | Subtipo | Especie | Referencia |
|-------------|--------------------------|----------------|------------------|--------------------------------|
| E.U.A | X02346 | PVB1 | Bovino | <u>Chen Ellson,1982</u> |
| E.U.A | M20219 | PVB2 | Bovino | * |
| Reino Unido | AJ620207 | PVB3 | Bovino | * |
| Reino Unido | X05817 | PVB4 | Bovino | <u>Campo Saveria,1987</u> |
| E.U.A | AJ620206 | PVB5 | Bovino | * |
| Alemania | AJ620208 | PVB6 | Bovino | * |
| Japón | DQ217793 | PVB7 | Bovino | <u>Owaga Tomika,2004</u> |
| Japón | DQ098913 | PVB8 | Bovino | <u>Yoshimi Tomita 2007 (1)</u> |
| Japón | AB331650 | PVB9 | Bovino | <u>Shinichi Hatama 2008</u> |
| Japón | EU360723 | PVB10 | Bovino | <u>Owaga Tomika 2004</u> |
| Japón | AB543507 | PVB11 | Bovino | <u>Hatama Sichini 2011</u> |
| Japón | JF834523 | PVB12 | Bovino | <u>Zhu Wei 2011</u> |
| Brasil | JQ798171 | PVB13 | Bovino | <u>Lunardi Michele 2012</u> |
| E.U.A | KP276343 | PVB14 | Felino (S) | <u>Munday John 2014</u> |
| Japón | AB626705 | PVB1 | Bovino | * |
| Reino Unido | JX678969 | PVB1 | Equino (S) | <u>AD Wilson 2012</u> |
| Brasil | KU674833 | PVB2 | Bovino | <u>Claudio W Canal 2016</u> |
| Japón | AB845589 | PVB6 | Bovino | * |
| E.U.A | NC004197 | PVB3 | Bovino | <u>Robert D Burk 2017</u> |
| Japón | AB331651 | PVB10 | Bovino | <u>Shinichi Hatama 2008</u> |
| Japón | KF017607 | PVB10 | Bovino | <u>Takeshi Haga 2014</u> |
| Japón | NC028126 | PVB12 | Bovino | <u>Takeshi Haga 2012</u> |
| Japón | NC007612 | PVB7 | Bovino | <u>Yoshimi Tomita 2007 (2)</u> |
| E.U.A | AF457465 | PVB5 | Bovino | <u>Robert D Burk 2017</u> |
| E.U.A | NC004195 | PVB5 | Bovino | <u>Robert D Burk 2017</u> |
| Japón | DQ098917 | PVB8 | Bison europeo | <u>Yoshimi Tomita 2007 (1)</u> |
| China | KM258443 | PVB2 | Bovino | <u>Feng Pang 2014</u> |
| China | KM455051 | PVB13 | Bovino | * |
| China | KC878306 | PVB2 | Bovino | * |
| Brasil | KP701430 | PVB2 | Bovino | <u>Cláudio W. Canal 2015</u> |
| Polonia | KF284153 | PVB2 | Bovino | * |
| Brasil | KC595244 | PVB1 | Equino (S) | * |
| Suecia | AF485377 | PVB | Bovino | <u>Bengt G. Hansson 2002</u> |
| Japón | AY426555 | PVB | Bovino | <u>Yoshimi Tomita 2004</u> |
| Reino Unido | U23379 | PVB1 | Equus asinus (S) | * |

(S) Sarcoide.

* Registrado directo en GenBank

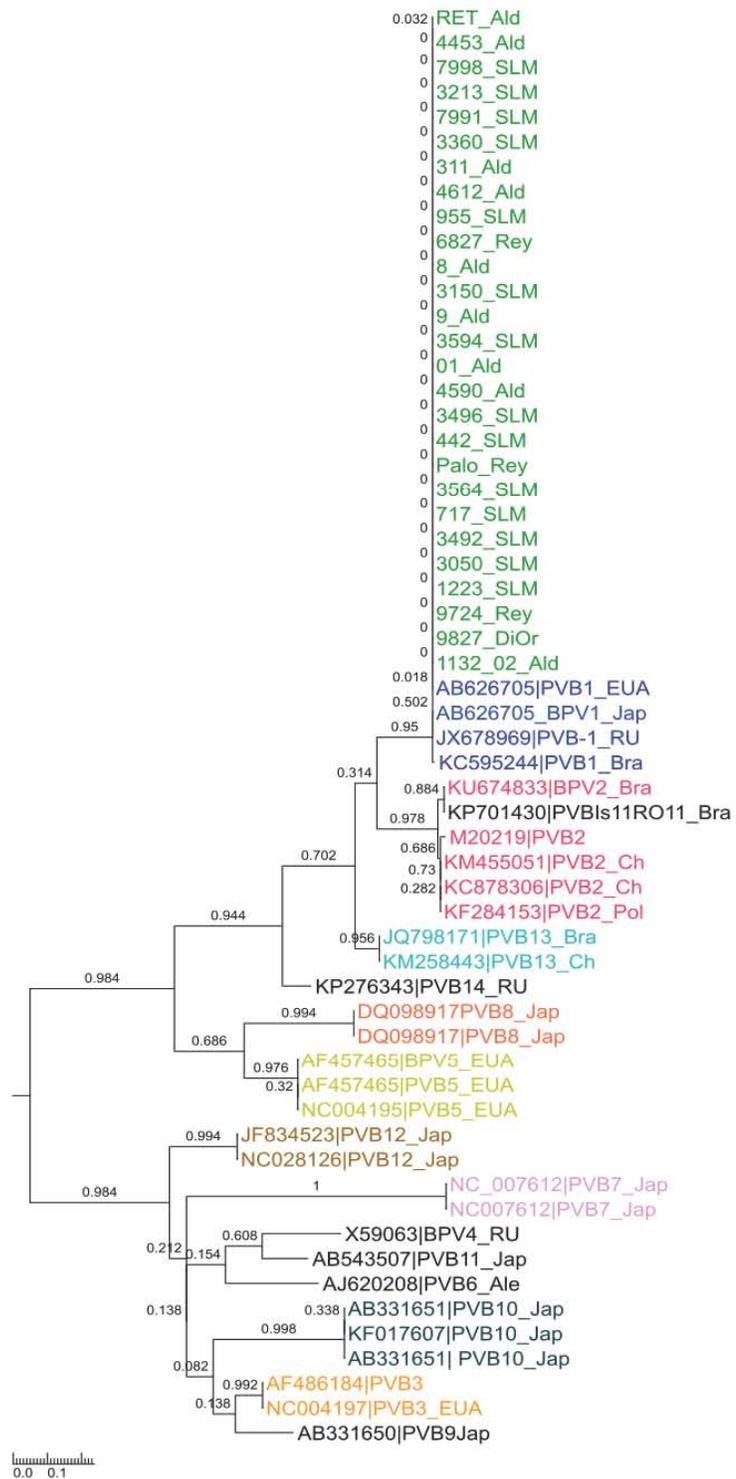


Figura 7. Árbol filogenético de un fragmento de 196 pb del gen *L1* del PVB. La inferencia se realizó utilizando la paquetería MEGA versión 6.0, mediante el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas.

7.- DISCUSIÓN

Como ya se mencionó, esta enfermedad induce a la presentación de papilomas del epitelio cutáneo y mucoso del ganado. Los papilomas son considerados tumores benignos, y muchos de ellos presentan regresión espontánea antes de causar problemas al huésped. Una de las razones principales para que la infección persista es la baja respuesta inmune hacia los PVB. El virus evade la respuesta inmune gracias a que su ciclo de vida está confinado al epitelio, donde infectan a las células epiteliales basales y después prolifera. El genoma viral se mantiene como material extracromosomal dentro del núcleo, razón por la cual, la ausencia del papiloma no es indicativo de que el animal esté sano. Se ha detectado ADN viral que se encuentra latente en el epitelio de piel sana (W. F.H. Jarrett et al. 1978; Ogawa et al. 2004), por lo que mediante el uso de la técnica de la PCR el ADN viral puede amplificarse selectivamente para obtener las secuencias virales presentes en la muestra biológica.

La detección de la enfermedad se ha reportado en los estados de Yucatán y Veracruz de manera clínica, y solo se determina mediante histopatología o de manera cualitativa (Vivas et al. 2015; De Jesús Arieta Román et al. 2014). Este tipo de técnicas no detectan la presencia directa del virus, sino que indirectamente detectan las secuelas clínicas de la infección viral (IARC, 2007).

Hasta el año 2016, no existían reportes científicos identificando los subtipos de PVB presentes en México. En un estudio realizado por Rojas-Anaya y colaboradores (2016), en donde utilizaron muestras de verrugas de bovinos del Estado de Tamaulipas, detectaron el gen *E7* del genoma viral, se identificaron así los subtipos 1 y 2 de PVB por primera vez en México.

El árbol filogenético demostró una relación estrecha, entre las muestras de origen mexicano con muestras del mismo tipo aisladas en los Estados Unidos. Los resultados obtenidos coinciden con el hecho de que los subtipos 1 y 2, parecen ser los más frecuentemente identificados en el mundo (Pathania et al. 2012; Araldi et al. 2014; Santos et al. 2016; Alcantara et al. 2015).

En el presente trabajo se detectó un fragmento de 196 pb, correspondiente al gen *L1* del genoma del virus de papiloma bovino, utilizando la técnica de PCR obtenido en muestras de verrugas en el ganado vacuno, de dos regiones del estado de Tamaulipas, México.

La mayoría de los protocolos utilizan cebadores dirigidos a una región altamente conservada del gen *L1*, lo que ha permitido que sean utilizados para la identificación de diferentes tipos de PV en los últimos 15 años (De Villiers et al. 2004; IARC 2007).

Los iniciadores utilizados en esta investigación, fueron diseñados en el Departamento de Biotecnología en Salud Animal del CENID-MA (INIFAP), y son capaces de detectar los PVB 1, 2, 13 y 14. El diseño de éstos fue necesario, ya que al utilizar unos iniciadores reportados previamente en la literatura (Forsslund et al. 1999), no se obtuvo amplificación del fragmento de interés. Por otro lado, en Brasil (Stocco dos Santos et al., 1998; Freitas et al., 2003; Lunardi et al., 2010), Japón (Ogawa et al. 2004; Ogawa et al. 2007; Maeda et al. 2007; Tomita et al. 2007) y Suecia (Ahola et al. 1986) se ha detectado PVB 1 mediante la utilización de distintos iniciadores, que amplifican otras regiones del gen *L1* diferentes a la región detectada en nuestro estudio.

De los municipios de Reynosa, Díaz Ordaz, Aldama y Soto La Marina se obtuvieron muestras de bovinos con manifestación clínica de papilomatosis, éstos no mostraron alteraciones clínicas graves ni específicas, manteniendo

sus constantes fisiológicas normales, sin presentar anorexia ni decaimiento. Las verrugas fueron tomadas de la región de la cabeza, cuello y extremidades, las cuales presentaban morfología en coliflor. En la literatura se reporta que papilomas con estas características y en estas regiones anatómicas son ocasionados por los tipos de PVB 1 y 2 (R. Haskell 2011; Bradford P. 2007; Grant Maxie 2016).

Como se mencionó previamente en este trabajo, se determinó el porcentaje de muestras positivas y negativas. Se realizó un estudio epidemiológico no probabilístico por conveniencia, ya que se trabajó con productores que cooperaron y por tanto no fue posible determinar una prevalencia. De las muestras analizadas 18 resultaron negativas, esto puede justificarse por lo que menciona Rocha et al. (1998) quien afirma que, si la muestra presenta una baja carga viral, mediante la PCR puede no detectarse la presencia del virus. Además, con el uso de la PCR, diferentes factores influyen en la sensibilidad de la prueba, como el método de extracción del ADN, el tamaño del fragmento amplificado, la calidad del tejido del que se llevó a cabo la extracción, la cantidad y la calidad de ADN utilizado, así como las condiciones de la PCR (Gebara, 2004).

En el árbol filogenético obtenido en este estudio, se identifica un fragmento del gen *L1* y se observa que no hay distancia filogenética entre la mayoría de las muestras, con excepción de una. Lo anterior sugiere que es el mismo virus el que está circulando entre los hatos muestreados, esto tiene un sentido lógico, ya que existe el intercambio intracomunitario de animales entre los productores, influye también el hecho de utilizar un mismo semental o lote de semen para el empadre e inseminación artificial, en hembras en distintas unidades ganaderas.

Se puede observar que en el clado donde se agrupan los aislamientos del presente trabajo, se encuentran cepas de distintas partes del mundo, lo cual parece indicar que la distribución viral es muy amplia y probablemente México, se encuentre en una situación similar en cuanto a la presencia de papilomavirus del subtipo 1.

La detección del papilomavirus subtipo 1 en este estudio, concuerda con trabajos anteriores (Rojas-Anaya et al. 2016) en donde se detectó el mismo subtipo, aportando información base para continuar documentando la situación de esta enfermedad en México y no solamente algunas regiones. Es necesario que este tipo de estudios se extienda a las regiones ganaderas de importancia económica.

El BPV1 es el prototipo molecular de los PV, pues tiene ventajas para servir como un modelo de estudio del ciclo viral; por ejemplo, producen grandes lesiones proliferativas, de las que pueden aislarse grandes cantidades de viriones, que son utilizados experimentalmente.

El desarrollo de vacunas tanto terapéuticas como preventivas, es uno de los principales objetivos del estudio de la papilomatosis. Se ha observado, que a pesar de la baja respuesta hacia la infección por BPV, se puede provocar una respuesta inmune rápida y prolongada, si se inmuniza al ganado con proteínas virales. (Saveira M, 2006). En el ganado, las autovacunas preparadas de tejidos afectados de los animales infectados suelen ser efectivas en algunos casos, aunque también se ha comprobado que la administración de una doble dosis de la vacuna ayuda a prevenir nuevos casos de verrugas, y sirve como tratamiento en animales enfermos. La autovacuna tiene la ventaja de ser preparada a partir del tipo de virus específico que infecta al ganado enfermo. (Radostits & Arundel 2002); Salib F y Farghali H, 2011).

La exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América es una de las actividades pecuarias más importantes en nuestro país (SIAP 2017), las lesiones papilomatosas son un problema importante para los estados que comercializan su ganado hacia dicho país, ya que el valor económico de venta de los animales se deprecia o bien, no se realiza.

Por tal motivo, esta investigación forma parte de los inicios en promover esfuerzos para el estudio de la papilomatosis bovina, con el fin de contar con métodos de diagnóstico sensibles y específicos, que coadyuven en la toma de decisiones tanto a nivel gubernamental, como de la incitativa privada para la mejora en la producción de bovinos en México. La caracterización genética de este virus es un conocimiento básico importante para el posterior desarrollo de futuras vacunas, tal como se ha hecho con el virus de papiloma humano.

8.- CONCLUSIONES

I.- Se estandarizó la técnica de la PCR con iniciadores diseñados en el CENID-Microbiología, que amplifican una región del gen *L1* de los virus de papiloma bovino.

II.- La región del gen *L1*, fue detectada a partir de muestras de papilomas obtenidas de bovinos.

II.- Mediante el análisis filogenético, se detectó el virus de papiloma bovino subtipo 1 en las muestras de verrugas analizadas.

9.- PROSPECTIVAS

1.- Diseñar un par de iniciadores que amplifiquen el gen *L1* completo, para realizar un análisis de la proteína y verificar la presencia de otros subtipos virales.

2.- Debido a que se ha documentado la presencia de papilomavirus bovino en muestras no epiteliales, sería conveniente analizar muestras como leche, suero, orina y semen.

3.- Para tener una visión más completa de la situación actual de la enfermedad, es conveniente realizar un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia, así como, evaluar el impacto económico que produce esta afección en regiones ganaderas de México.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahola, H. et al., 1986. Organization and expression of the transforming region from the European elk papillomavirus (EEPV). *Gene*, 50(1–3), pp.195–205.
- Alcantara, B.K. et al., 2015. Molecular characterization of bovine Deltapapillomavirus (BPV1, 2, and 13) DNA in equine sarcoids. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(5), pp.431–436.
- Araldi, R.P. et al., 2014. Bovine papillomavirus isolation by ultracentrifugation. *Journal of Virological Methods*, 208, pp.119–124.
- Bernard, H.U. et al., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), pp.70–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>.
- Bernard, H.U., Calleja-Macias, I.E. & Dunn, S.T., 2006. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *International Journal of Cancer*, 118(5), pp.1071–1076.
- Bishop, B. et al., 2007. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: Understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), pp.31803–31811.
- Bocaneti, F. et al., 2016. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(1), pp.14–23.
- Borzacchiello, G., 2013. Bovine papillomavirus on the scene of crime: is E5 oncogene the only guilty party? *Infectious agents and cancer*, 8(1), p.26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829702> [Accessed December 12, 2017].
- Borzacchiello, G. et al., 2003. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *Journal of General Virology*, 84(11), pp.2921–2926. Available at: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19412-0>

- [Accessed December 12, 2017].
- Borzacchiello, G. & Roperto, F., 2008. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research*, 39(5), pp.1–19.
- Bousarghin, L. et al., 2003. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *Journal of General Virology*, 84(1), pp.157–164.
- Bradford P., S., 2007. *Large Animal Internal Medicine 3rd ed.*, Elsevier Science Health Science Division.
- Campo, M.S., 1997. Bovine papillomavirus and cancer. *Veterinary Journal*, 154(3), pp.175–188.
- Campo, M.S., 1995. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends in Microbiology*, 3(3), pp.92–97. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X00888897?via%3Dihub> [Accessed December 12, 2017].
- Campo, M.S., 2006. *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond* M. Saveria Campo, ed., Horizon Scientific Press.
- Carr, E.A. et al., 2001. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. *American journal of veterinary research*, 62(5), pp.741–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11341396> [Accessed December 13, 2017].
- Carvalho, C.C.R. et al., 2012. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(5), pp.441–447.
- Chambers, G. et al., 2003. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology*, 84(5), pp.1055–1062.
- Chen, E.Y. et al., 1982. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature*, 299(7), pp.529–534.

- Chen, X.S. et al., 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular cell*, 5(3), pp.557–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882140>.
- Chow, L.T., Broker, T.R. & Steinberg, B.M., 2010. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis*, 118(6–7), pp.422–449.
- David Mahan Knipe, P.M.H. ed., 2001. *Fields' Virology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Ebrahim, B. & Kamran, T., 2011. Verrugas en los pezones de vacas lecheras. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12(6), pp.1–6.
- Felsenstein, J., 2008. Comparative Methods with Sampling Error and Within - Species Variation: Contrasts Revisited and Revised. *The American Naturalist*, 171(6), pp.713–725. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419518> [Accessed December 12, 2017].
- Forslund, O. 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), pp.2437–2443.
- Forslund, O. et al., 2003. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of candidate human papilloma virus type 92. *Virology*, 312(2), pp.255–260.
- Freitas, A.C. et al., 2011. Recent insights into Bovine Papillomavirus. *African Journal of Microbiology Research*, 5(33), pp.6004–6012. Available at: [http://www.academicjournals.org/AJMR%5Cnhttp://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract 2011/December Special Review/Freitas et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJMR%5Cnhttp://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract%202011/December%20Special%20Review/Freitas%20et%20al.htm).
- Grant Maxie, M., 2016. *Pathology of domestic animals 6th ed.* Jubb, Kennedy, & Palmer, eds., Elsevier.
- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5),

- pp.696–704. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530136> [Accessed December 12, 2017].
- Hatama, S. et al., 2011. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Archives of Virology*, 156(7), pp.1281–1285.
- Hatama, S., Nobumoto, K. & Kanno, T., 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology*, 89(1), pp.158–163.
- IARC, 2000. Studies of Animal Papillomaviruses. IARC monographs, 90(Bpv 1), pp.412–432.
- Jagu, S. et al., 2011. A multimeric L2 vaccine for prevention of animal papillomavirus infections. *Virology*, 420(1), pp.43–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.07.020>.
- Jarrett, W.F.H. et al., 1978. Virus-induced papillomas of the alimentary tract of cattle. *International Journal of Cancer*, 22(3), pp.323–328. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910220316> [Accessed December 12, 2017].
- Jarrett, W.F.H. et al., 1978. Virus - induced papillomas of the alimentary tract of cattle. *International Journal of Cancer*, 22(3), pp.323–328. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910220316> [Accessed December 12, 2017].
- De Jesús Arieta Román, R. et al., 2014. Terapeutica quirurgica de un caso clinico de papiloma en bovino del tropico Mexicano. *Revista Electronica de Veterinaria*, 15(10), pp.70–79.
- Joan Murphy, Erin B. Kennedy, Sheila Dunn, C. Meg McLachlin, Michael Fung Kee Fung, Danusia Gzik, Michael Shier, L.P., 2012. HPV Testing in Primary Cervical Screening: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 34(5), pp.443–452.
- Kamper, N. et al., 2006. A Membrane-Destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 Is Required for Egress of Papillomavirus Genomes from Endosomes. *Journal of Virology*, 80(2), pp.759–768. Available at: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.80.2.759-768.2006>.

- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), pp.111–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7463489> [Accessed December 12, 2017].
- Kumar, P. et al., 2013. Co-infection of bovine papillomavirus type-1 and -10 in teat warts of dairy cattle. *Veterinarni Medicina*, 58(12), pp.605–608.
- Lindsey, C.J. et al., 2009. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetics and Molecular Research*, 8(1), pp.310–318.
- Lowy, D.R. & Schiller, J.T., 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*, 116(5), pp.1167–1173. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16670757.
- Maeda, Y. et al., 2007. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Veterinary Microbiology*, 121(3–4), pp.242–248.
- Melo C, B. & Leite R, C., 2003. Papilomatose Bovina. *Cienc. Vet. Trop*, 6(1), pp.1–12.
- Munday, J.S., 2014. Bovine and Human Papillomaviruses. *Veterinary Pathology*, 51(6), pp.1063–1075. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985814537837>.
- Murphy, F.A., 1999. *Veterinary virology*, Academic Press.
- Nasir, L. & Campo, M.S., 2008. Bovine papillomaviruses : their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. , pp.243–254.
- O'Brien, P.M. & Saveria Campo, M., 2002. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research*, 88(1–2), pp.103–117.
- Ogawa, T. et al., 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *Journal of General Virology*, 85(8), pp.2191–2197.
- Ogawa, T. et al., 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine

- papillomavirus type 7. *Journal of General Virology*, 88(7), pp.1934–1938.
- Parrish, C.R., 2011. Fenner's Veterinary Virology. In E. J. Maclachlan, N. J. and Dubovi, ed. Fenner's Veterinary Virology. Elsevier, Oxford, pp. 213–223.
- Pathania, S. et al., 2012. Detection and Quantification of Bovine Papilloma Virus Type 2 (BPV-2) by Real-time PCR in Urine and Urinary Bladder Lesions in Enzootic Bovine Haematuria (EBH)-Affected Cows. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), pp.79–84. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1865-1682.2011.01248.x> [Accessed December 13, 2017].
- Pulido Casas, O.J., 2009. Comparación de tres tratamientos para papilomatosis bovina. Universidad Veracruzana.
- R. Haskell, S.R., 2011. Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Ruminant, John Wiley & Sons.
- Radostits, O.M. & Arundel, J.H., 2002. Medicina veterinaria : tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino, McGraw Hill Interamericana.
- Rai, G.K. et al., 2011. Identification of bovine papilloma virus 10 in teat warts of cattle by DNase-SISPA. *Veterinary Microbiology*, 147(3–4), pp.416–419. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510003500> [Accessed December 12, 2017].
- Rebhun, W.C., 1999. Enfermedades del ganado vacuno lechero, Zaragoza: Acribia.
- Robert, G. & Daniel, D., 2007. The Papillomaviruses 1st ed., Available at: Springer US.
- Rojas-Anaya, E. et al., 2016. Detection and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus in cutaneous warts in cattle in Tamaulipas, Mexico. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 80(4), pp.262–268. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733780><http://www.pubmedcentral>.

nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5052877.

- Sá Silva, M. et al., 2010. Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, pp.603–606.
- Salib, F.A. & Farghali, H.A., Clinical, epidemiological and therapeutic studies on Bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt in 2008. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.301.6390&rep=rep1&type=pdf> [Accessed December 12, 2017].
- Santos, E.U.D. et al., 2016. Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(1), pp.e103–e108. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12237> [Accessed December 13, 2017].
- Scheffer, K.D., Berditchevski, F. & Florin, L., 2014. The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. *Viruses*, 6(2), pp.893–908.
- Schmitt, M., Fiedler, V. & Müller, M., 2010. Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *Journal of Virological Methods*, 170(1–2), pp.67–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.020>.
- Shope, R.E. & Hurst, E.W., 1933. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *The Journal of experimental medicine*, 58(5), pp.607–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870219><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2132321>.
- SIAP, S. de I.A. y P., 2017. Exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América 2017. Available at: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244433/Exportaci_n_de_Bovinos-Junio__2017.pdf [Accessed December 14, 2017].
- Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), pp.2725–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132122> [Accessed December 12,

2017].

- Tomita, Y. et al., 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes*, 35(2), pp.243–249.
- Tsirimonaki, E. et al., 2003. Extensive papillomatosis of the bovine upper gastrointestinal tract. *Journal of comparative pathology*, 129(2–3), pp.93–99.
- Vaccarella, S. et al., 2010. Seroprevalence of antibodies against human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in four continents: The International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 19(9), pp.2379–2388.
- de Villiers, E.-M. et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), pp.17–27. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268220400220X?via%3Dihub> [Accessed December 13, 2017].
- De Villiers, E.M. et al., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), pp.17–27.
- Vivas, R. et al., 2015. Papilomatosis bovina en el trópico mexicano: presentación clínica y control. *Bioagrocências*, 8(1), pp.45–52.
- Wilson, R., Fehrmann, F. & Laimins, L. a, 2005. Role of the E1 \wedge E4 Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31 Role of the E1 \wedge E4 Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. *Society*, 79(11), pp.6732–6740.
- Wobeser, B.K. et al., 2010. Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 51(10), pp.1103–1108.
- Zimmermann, H. et al., 2016. Interaction with CBP / p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP / p300-mediated transactivation by p53. , (2000), pp.2617–2623.