

UNIVERSIDAD NACIONAL

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**Caracterización molecular, macroscópica y microscópica de genotipos de
papilomavirus bovino en Costa Rica**

Ramsés Alfaro Mora

Universidad Nacional, Heredia, febrero 2021

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en
Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar
por el grado de *Magister Scientiae***

**Caracterización molecular, macroscópica y microscópica de genotipos de
papilomavirus bovino en Costa Rica**

Ramsés Alfaro Mora

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en
Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar
por el grado de *Magister Scientiae***

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Jorge Herrera Murillo, Ph.D.
Representante del Consejo Central de Posgrado

Sandra Estrada Koenig, M.Sc.
Coordinador del posgrado o su representante

Gaby Dolz Wiedner, Ph.D.
Tutor de tesis

Julia Rodríguez Barahona, Ph.D.
Miembro del Comité Asesor

Ruth Castro Vásquez, M.Sc.
Miembro del Comité Asesor

Ramsés Alfaro Mora
Sustentante

DEDICATORIA

A mi familia:

A mi esposa Stephanie Guzmán, por la paciencia y el apoyo durante el tiempo dedicado a este trabajo.

A mis hijas Emma Alfaro y Alina Alfaro, por el tiempo que les debo y que utilicé para poder terminar este proyecto.

A mis padres Marco Alfaro y Lucía Mora, por la ayuda que me han brindado durante todos mis años de estudio.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gaby Dolz por ser guía en este proceso, por el tiempo, la paciencia, las enseñanzas y correcciones, y especialmente por haber aceptado ser mi tutora.

A la M.Sc. Ruth Castro, por su tiempo, disposición y compromiso durante la primera parte de este proyecto.

A la Dra. Julia Rodríguez por el tiempo, disposición y compromiso dedicado durante la segunda parte del proyecto.

Al Dr. Juan José Romero, por sus enseñanzas, su tiempo y los libros prestados para poder aprender un poco de epidemiología.

Al Dr. Alberto Alberti, por abrirme las puertas durante mi estancia en su laboratorio, por el tiempo y las enseñanzas que logró transmitirme durante el breve tiempo en Sassari.

A Rosanna Zobba, por su tiempo analizando ciertas muestras y su disposición durante mi estancia en Sassari.

Carlina Soto y Anthony Masis, por su colaboración durante el proceso de recolecta de muestras, ya que fueron de gran apoyo durante muchas de las giras realizadas.

A Luis Choc y Nelson Peña, compañeros de maestría, que estuvieron durante todo el proceso y que brindaron su colaboración cada vez que fue necesario.

Al personal del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales (PCVET), por las enseñanzas y ayudas brindadas durante todo el tiempo que duró la maestría.

INDICÉ GENERAL

	Página
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice general	vi
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Resumen general	x
Introducción general	xii
Referencias bibliográficas	xxii

ARTÍCULO 1

	Página
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	2
2. Materiales y Métodos	3
2.1. Población de estudio	3
2.2. Toma de muestra e información	4
2.3. Extracción, amplificación y secuenciación del ADN	4
2.4. Replicación de ADN circular (RCA)	5
2.5. Análisis de datos	5
3. Resultados	6
4. Discusión	10
5. Conclusiones	12
6. Recomendaciones	12
7. Referencias bibliográficas	12

ARTÍCULO 2

	Página
Resumen	16
Abstract	17
1. Introducción	18
2. Materiales y Métodos	19
2.1. Población de estudio	19
2.2. Toma de muestra e información	20
2.3. Extracción, amplificación y secuenciación del ADN	20
2.4. Histopatología	21
2.5. Análisis de datos	22
3. Resultados	22
4. Discusión	27
5. Conclusiones	30
6. Recomendaciones	31
7. Referencias bibliográficas	31
Discusión general	34
Conclusiones generales	39
Recomendaciones generales	40
Anexos	41

ÍNDICE DE CUADROS

INTRODUCCIÓN GENERAL

	Página
Cuadro 1. Secuencias codificantes de papilomavirus y sus principales funciones	xiii
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de papilomavirus bovinos de acuerdo con la homología de ORF L1	xv
Cuadro 3. Patrones de corte característicos de los BPV con diferentes enzimas de restricción	xxi

ARTÍCULO 1

Cuadro 1. Genotipos de BPV detectados en 30 papilomas bovinos analizados en Costa Rica	7
Cuadro 2. Ubicación de los genotipos de BPV detectados, según la provincia donde se recolectaron los papilomas	8
Cuadro 3. Patrones de corte por digestión enzimática de genotipos de BPV detectados en Costa Rica	10

ARTÍCULO 2

Cuadro 1. Descripción de los bovinos con papilomas PCR positivos a BPV	22
Cuadro 2. Morfología de los papilomas BPV positivos recolectados de bovinos, según género y ubicación anatómica en el animal	24
Cuadro 3. Relación de genotipos de BPV con morfología y ubicación anatómica de los papilomas en el animal	25
Cuadro 4. Descripción macro y microscópica de papilomas según genotipos de BPV identificados en Costa Rica	26

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

	Página
Figura 1. A. Diagrama de la disposición genómica del BPV-1. B. Genoma del BPV, donde se incluye la región LCR	xiii
Figura 2. Clasificación filogénica de 15 genotipos de BPV	xv
Figura 3. A. Papiloma cutáneo, en ubre (Grupo 1). B. Papiloma en epitelio plano no estratificado, en la base de la lengua (Grupo 2). C. Fibropapiloma en el vientre (Grupo 3)	xvi
Figura 4. Amplificación de ADN circular	xx

ARTÍCULO 1

Figura 1. Cantidad de papilomas recolectados de bovinos, según provincia, en Costa Rica, 2018.	6
Figura 2. Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud, utilizando el método del modelo Tamura-Nei, con soporte de Bootstrap para 1000 réplicas a partir de productos de PCR para el gen L1 de BPV encontrados en Costa Rica	7
Figura 3. Distribución de genotipos de BPV detectados en diferentes regiones de Costa Rica en 2018.	9

ARTÍCULO 2

Figura 1. Morfología de papilomas encontrada en los bovinos de Costa Rica	23
--	----

RESUMEN GENERAL

La papilomatosis es una condición crónica de origen viral que en muchos de los casos está asociada a la presencia de tumoraciones benignas y de naturaleza fibroepitelial. Los papilomavirus ocasionan lesiones proliferativas, que, si están localizadas en la ubre, pueden interferir con el ordeño y ocasionar pérdidas al ganadero. El objetivo del presente trabajo fue, por un lado, establecer los genotipos de BPV presentes en ganado bovino en diferentes zonas del país mediante técnicas moleculares, y por el otro lado, describir los tipos de papilomas bovinos a nivel macroscópico y microscópico, y relacionar la morfología de las lesiones con los genotipos de BPV encontrados en las lesiones. Se realizó un estudio descriptivo, con muestreo no probabilístico por conveniencia, en el cual se recolectó un total de 99 papilomas, provenientes de 63 animales y 32 fincas durante un año (2018). Se recopiló información sobre edad, género, raza, uso productivo del animal, grado de invasión, ubicación y morfología de los papilomas. Los papilomas se sometieron a análisis histopatológicos, además se analizaron mediante técnicas de diagnóstico molecular (reacción en cadena de la polimerasa, replicación circular de ADN, secuenciación) y digestión enzimática.

Se determinó por primera vez la presencia de siete genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11), en Costa Rica. El BPV genotipo 6 fue el que se detectó más frecuentemente en las muestras analizadas (33,3%), seguido del BPV-2 (26,7%) y BPV-1 (26,7%), mientras que los genotipos BPV-1 y BPV-2 fueron los que se encontró más ampliamente distribuidos en el país. En dos animales se determinó infección con dos genotipos de BPV, en un caso BPV-1 y BPV-2, y en otro caso BPV-4 y BPV-6. El método de digestión enzimática con las enzimas *Escherichia coli* RY13, *Bacillus amyloliquefaciens* HI y *Saccharomyces cerevisiae* I permitieron la diferenciación de los genotipos BPV-1, BPV-2, BPV-4, y BPV-7, pero no resultó ser un método útil para identificar los demás genotipos (BPV-6, BPV-10 y BPV-11).

El mayor número de animales con papilomas positivo se encontró en fincas lecheras (75,0%), afectando a hembras (95,0%), de raza Holstein (45,0%), y con edades superiores a los 24 meses (50,0%). La mayoría de los animales presentaron entre 1 y 15 papilomas (31,6%), y un único tipo de papiloma (79,4%). El papiloma que se encontró con mayor frecuencia fue el de tipo coliflor (48,5%), seguido del tipo plano (20,2%) y peduncular

(20,2%) y el menos frecuente fue el papiloma atípico (11,1%). La morfología coliflor fue encontrada principalmente en la ubre (14,4%), cabeza (10,0%) y cuello (10,0%) y se asoció a 5 genotipos (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10) mientras que los BPV-2 y BPV-6 se encontraron asociados a todas las morfologías (coliflor, plano, pedunculado o atípico). Se reporta por primera vez la presencia de BPV-11 en papilomas con morfología plana y BPV-6 en papilomas con morfología atípica. Los papilomas asociados a BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 mostraron hiperqueratosis, y en algunos casos la presencia de vacuolización. La morfología y los hallazgos histopatológicos no permitieron una diferenciación de los genotipos de BPV. Se recomienda realizar estudios más amplios y sistemáticos para determinar los genotipos más prevalentes en nuestro país, la morfología e histopatología de los papilomas producidos por los diferentes genotipos de BPV, y estudiar el posible rol de la inmunidad del huésped sobre morfología e histopatología de las lesiones. Es importante comunicar los resultados obtenidos a las autoridades y productores.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes históricos y etiología de la papilomatosis

La papilomatosis bovina es una patología ocasionada por un virus perteneciente a la familia Papillomaviridae, la cual se caracteriza, por hiperproliferación de tejidos epiteliales a nivel cutáneo, como en mucosas. Los papilomavirus (PV) se caracterizan por ser específicos de la especie animal a la que infectan, siendo los únicos casos reportados de transmisión interespecie el papilomavirus bovino (BPV, por sus siglas en inglés) tipo 1 y 2, que se han encontrado en animales de la familia de los équidos, especialmente caballos (Nair y Campo, 2008).

La papilomatosis posee una amplia distribución, por lo cual es posible encontrarla en mamíferos, aves y reptiles (Bernard et al., 2010). El primer reporte que se tiene de papilomatosis data del año 1933 por parte de Shope y Hurst, quienes observaron la presencia de protuberancias sobre la piel de conejos (Shope y Hurst, 1933). Desde entonces se han caracterizado más de 68 tipos de PV en mamíferos no humanos, aves y reptiles (Borzacchiello, 2007; Rector y Van Rast, 2013).

Estructuralmente estos virus no presentan envoltura y poseen una cápside icosaédrica, su tamaño es de 55-60 nm de diámetro. Los PV están conformados por ADN de doble hebra de tipo circular, cuyo genoma generalmente tiene un tamaño de 8kb y típicamente albergan alrededor de 8 genes (Nair y Campo, 2008). Casi todos los genomas de los diferentes tipos de PV son muy parecidos, siendo una de las dos cadenas de ADN el sitio donde se albergan todas las secuencias con potencial codificante (ORF, “Open Reading Frames” o marcos de lectura abiertos), presentándose como serie de fragmentos que son comunes en todos los PV.

Los ORF son clasificados en **ORF E** (“early” o temprano) y **ORF L** (“late” o tardío). La mayor parte de los ORF E se expresan en las primeras etapas del ciclo viral, mientras que los ORF L se expresan al final, justo en el momento del ensamblaje viral. Los genes que corresponden a los ORF E y L se disponen en dos bloques, separados por una región no codificante. En la Figura 1A se ejemplifica la disposición de las secuencias ORF dentro del genoma viral para el BPV-1, en la Figura 1B se muestra la región LCR (“long control region” o región larga de control), la cual es un área que no pertenece a los ORF y se encuentra en

todos los papilomavirus, en ella se controla el inicio de la replicación y los elementos para la transcripción. Las funciones asociadas a las diferentes regiones ORF se presentan en el Cuadro 1 (Rector y Van Rast, 2013).

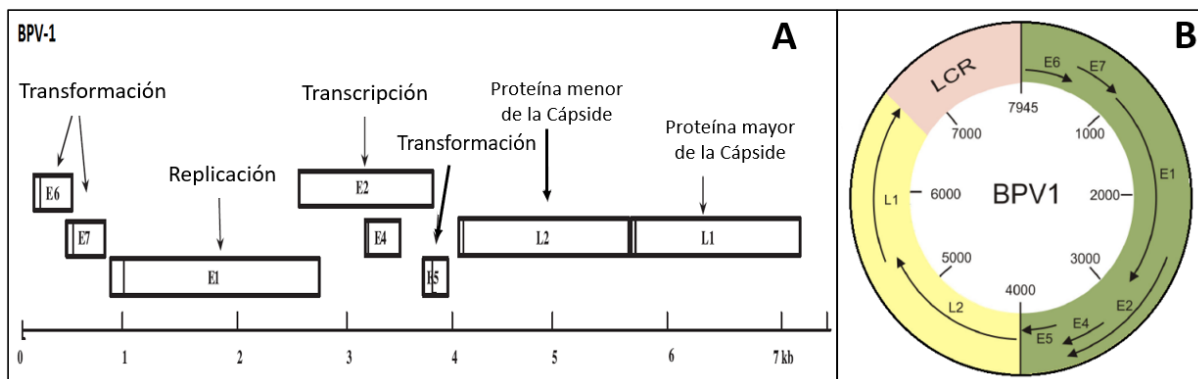


Figura 1 A. Diagrama de la disposición genómica del BPV-1. Los marcos de lectura abiertos están indicados según la letra que les corresponde, E (early) y L (late). Las líneas verticales indican los puntos del codón inicial. **B.** Genoma del BPV, donde se incluye la región LCR. Fuente: Nair y Campo, 2008; INTECH, 2013.

Cuadro 1. Secuencias codificantes de papilomavirus y sus principales funciones

Región	Función
E1	Función ATPasa y 3'-5' helicasa.
E2	Activa promotores virales a través de la unión a elementos de respuesta.
E3	No se conoce si este ORF llega a ser traducido.
E4	Inactivación de la citoqueratina. Regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas.
E5	Codifica una proteína de membrana que interacciona con los receptores del factor de crecimiento, lo cual estimula la división celular y la proliferación de células infectadas. Podría estar involucrada en la interrupción de función de los complejos de histocompatibilidad (MHC) de tipo I.

E6	Codifica proteínas de transformación celular y de unión al ADN. Puede inhibir la función del p53 mediante su degradación por la vía de la ubiquitina.
E7	Codifica una proteína transformadora relacionada con la integración del genoma viral en el ADN de la célula huésped y el establecimiento de un alto número de copias en las células infectadas persistentemente. También es capaz de promover la fase S del ciclo celular induciendo replicación celular.
E8	Proteína análoga de E6, que solo se encuentra presente en papilomavirus bovino y el papiloma virus humano 6b.
L1	Codifica la proteína más abundante en la cápside y su función es estructural.
L2	Su función es lograr la interacción virus-célula. Interactúa con proteínas citoplasmáticas de las células epiteliales. Modula el ciclo viral y la persistencia de la infección.
LCR	Contiene varios motivos de la replicación y transcripción viral. En esta región hay sitios de unión de factores de transcripción y elementos del promotor de la ADN polimerasa. Contiene el origen de la replicación.

Fuente: Van Doorslaer, 2013; Arroyo Andújar, 2015; Chambers et al., 2003; Nair y Campo, 2008

Clasificación de los papilomavirus bovinos

La clasificación filogénica original de todos los PV fue propuesta por De Villier y colaboradores (2004) y posteriormente actualizada por Ulrich (2010) tomando como base 189 de estos virus (Bernard et al., 2010; De Villier et al., 2004). En la actualidad se han descrito 32 géneros de PV no humanos incluidos dentro de la familia Papillomaviridae, de los cuales se encuentran secuencias depositadas en GenBank (Rector y Van Rast, 2013; Vázquez Díaz et al., 2012). La clasificación de los BPV se basa en las secuencias de nucleótidos del ORF L1. Dependiendo del nivel de homología de ORF L1, se clasifican nuevas especies, tipos, subtipos o variantes, como se muestra en el Cuadro 2 (zur Hausen y De Villier, 1994).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de Papilomavirus bovinos de acuerdo a la homología de ORF L1

Clasificación taxonómica	Porcentaje de homología en la secuencia L1 (%)
Género	< 60
Especie	60-70
Tipo	71-89
Subtipo	90-98
Variante	> 98

Fuente: zur Hausen y De Villier, 1994

Basándose en esto, podemos clasificar 15 genotipos de BPV, distribuidos en 3 géneros de los 29 existentes, Delta papillomavirus (BPV-1, BPV-2, BPV-13 y BPV-14), Xi papillomavirus (BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11, BPV-12 y BPV-15) y Epsilon papillomavirus (BPV-5, BPV-8) (Figura 2). De todos los genotipos, el BPV-7 aún no ha sido clasificados dentro de ningún género (De Villier et al., 2004; Bernard et al., 2010; Vázquez Díaz et al., 2012; Cardona-Álvarez et al., 2018).

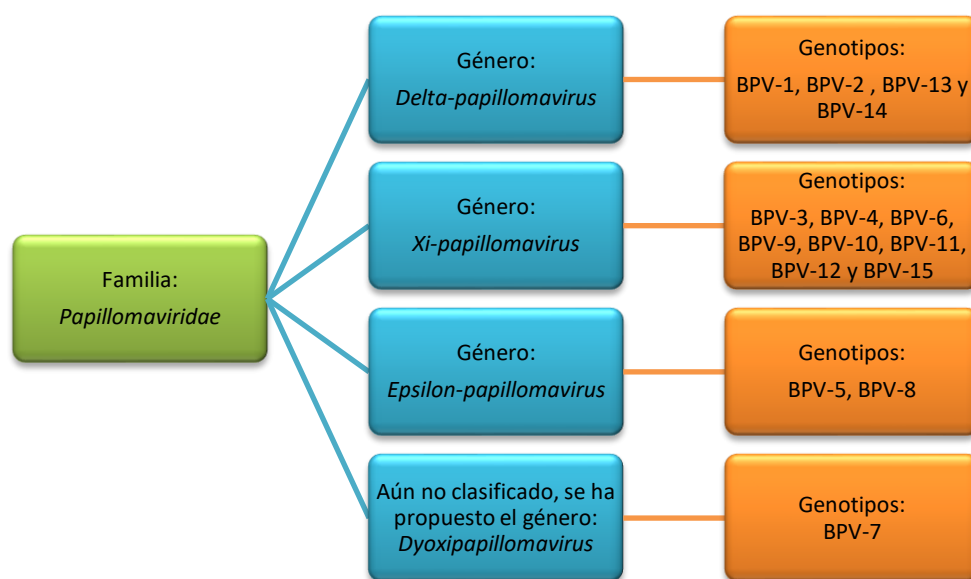


Figura 2. Clasificación filogenética de 15 genotipos de BPV

Los PV infectan el epitelio de los vertebrados donde pueden persistir de forma asintomática, o eventualmente generar neoplasias (Shafti-Keramat et al., 2009; Rodríguez Vivas et al., 2015). Debido a esta característica, se clasificaron en el pasado en tres grupos, basándose en el tropismo y respuestas del hospedero:

Grupo 1: Presentan neoplasia a nivel cutáneo en epitelio plano estratificado. Dentro de este grupo se encuentran el BPV-3 y BPV-6 (Figura 3A).

Grupo 2: Inducen hiperplasia en el epitelio plano no estratificado o una metaplasia en el epitelio plano estratificado. En este grupo se incluye únicamente el BPV-4 (Figura 3B).

Grupo 3: Conformado por aquellos PV que además de inducir el papiloma cutáneo, presentan además un fibroma subyacente del tejido conectivo. En este grupo se han incluido BPV-1, BPV-2 y BPV-5 (Figura 3C).

Los demás genotipos aún no se han incluido en categoría alguna (Lancaster y Olson, 1982; Murphy et al., 1999).

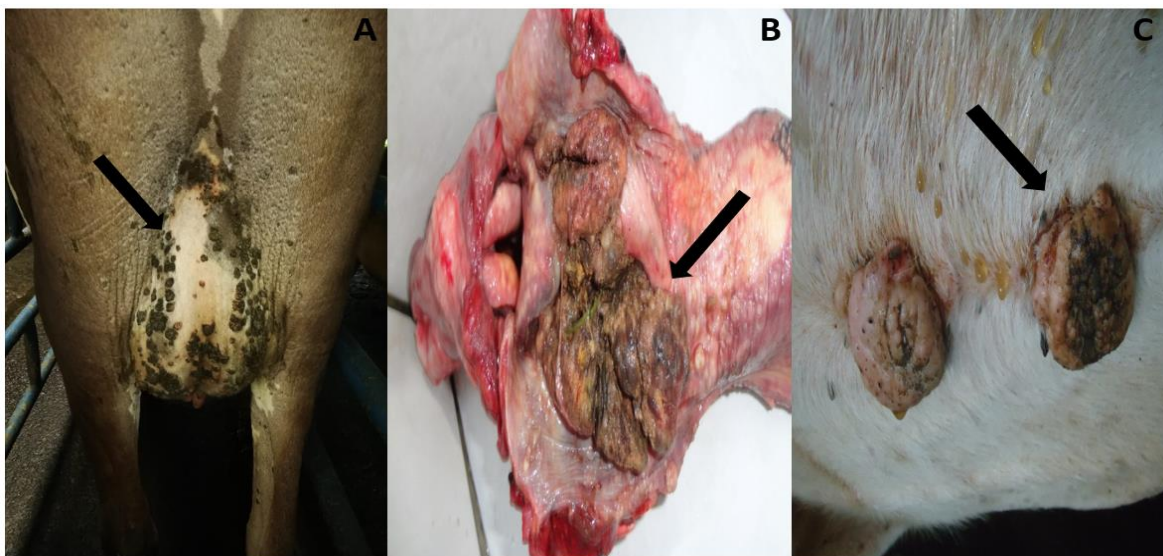


Figura 3 A. Papiloma cutáneo, en la ubre (Grupo 1). B. Papiloma en epitelio plano no estratificado, en la base de la lengua (Grupo 2). C. Fibropapiloma, en el vientre (Grupo 3).

Fuente: Ramsés Alfaro-Mora, 2016; Laboratorio de Patología da UFSC-Curitibanos, 2017; CONtextoganadero, 2016)

Las formas observadas sobre la piel suelen variar entre estructuras filiformes y pedunculadas, las cuales aparentan la forma de “granos de arroz” o tipo “coliflor”, con características algunas veces fibrosas y de diversos tamaños. El fibropapiloma es la forma más común a nivel del lomo, los pezones, la cabeza y el cuello. También es posible que ocurra una lesión conocida como papiloma invertido, donde la lesión se manifiesta hacia el estroma subyacente y no hacia el exterior (Murphy et al., 1999; Nair y Campo, 2008).

Epidemiología

Las infecciones por PV han sido descritas en todo el mundo; y se han encontrado en 54 especies no humanas (Rector y Van Rast, 2013). En bovinos se han reportado hasta la fecha 15 genotipos de BPV a nivel mundial (Vázquez et al., 2012; Lunardi et al., 2013; Munday et al., 2015; Roperto et al., 2016, Van Doorslaer et al., 2017), encontrándose coinfecciones de dos o tres genotipos de BPV (Brasil) y hasta cinco genotipos (Alemania) en una misma lesión (Carvalho et al., 2012; Schmitt et al., 2010). Los genotipos BPV-1 y BPV-2 parecen ser los más prevalentes en regiones como Sur- y Norteamérica, Sudáfrica, Europa, Medio Oriente, y el sur y este asiático; aunque aún se requieren más estudios para determinar la prevalencia de los genotipos menos frecuentes (Vázquez-Díaz et al., 2012).

Transmisión de papilomavirus

La transmisión del PV depende de la cercanía de tejidos cutáneos o mucosas entre quien posee la infección y el sujeto sano. Los PV presentan un tropismo muy definido por las células epiteliales llegando a infectar las células basales a través de heridas o abrasiones en el epitelio; a pesar de ello también se sugiere que algunos PV infectan lugares donde el acceso a capas basales se facilita de forma natural, como por ejemplo en la base del folículo piloso. Una vez que el virus está en el estrato germinativo, ingresa en las células, pierde su cápside y penetra en el núcleo de los queratinocitos basales, donde inicia su proceso de replicación, finalizando cuando éste muere a nivel del estrato corneo y con esto se facilita la liberación de partículas virales gracias al remplazo epitelial (Murphy et al., 1999; Doorbar y Raj, 2007).

Existen reportes de la presencia del virus en diferentes fluidos incluyendo la sangre, semen, leche y orina, lo que ha motivado el estudio de posibles fuentes de transmisión de tipo horizontal y vertical (Lindsey et al., 2009; Diniz et al., 2009). Tomando en cuenta la persistencia del virus en células sanguíneas como linfocitos, es que se logró demostrar la transmisión de BPV-1 al feto, además se ha establecido una carga viral de BPV-2 en sangre, que posibilita el paso del virus al feto (Lindsey et al., 2009; Freitas et al., 2003; Roperto et al., 2011; Yagui et al., 2006).

Finalmente, se ha propuesto que BPV-1 y BPV-2 son transmitidos por vectores en forma mecánica, por ejemplo, a través de moscas, lo que explicaría la transmisión del virus de un bovino a un equino. En concordancia con esto, recientemente se detectó BPV en moscas que rondaban la cabeza y cuello de equinos, siendo estas las áreas donde comúnmente se presentan los sarcoides ocasionados por BPV-1 y BPV-2 (Finlay et al., 2009).

Patogénesis del papilomavirus

Las infecciones ocasionadas por BPV pueden ser autolimitantes o persistentes, siendo este último más común en bovinos jóvenes. En el caso de infecciones persistentes se presenta un evento temprano relacionado con la inactivación de las proteínas p53 y proteína de retinoblastoma (pRb) como resultado de una expresión continua de E6 y E7, que conducen a un incremento de los procesos de desregulación del ciclo celular e inestabilidad genética (Borzacchiello y Roperto, 2008; Howie et al., 2009).

Las infecciones de tipo crónico son consecuencia de la capacidad del virus para infectar células que poseen capacidad proliferativa prolongada, localizadas en las capas basales del epitelio, que pueden desarrollarse en lesiones de tipo cancerígeno después de un largo periodo de tiempo (Vázquez-Díaz et al., 2012; Borzacchiello y Roperto, 2008). En caso de infectar un estrato estratificado, los virus deben llegar a las capas inferiores a través de microtraumas de las capas superiores. Una vez que la infección se ha establecido, las células basales portarán bajo número de copias de los genomas virales en forma episomal y presentarán bajos niveles de ARN viral (Borzacchiello, 2007; Doorbar, 2005).

El BPV-4 se relaciona con la aparición de tumoraciones malignas a nivel del tracto gastrointestinal superior en aquellos animales que consumen heleichos dentro de su dieta;

estos pueden inducir una inmunosupresión que progresa a cáncer oro- y nasofaríngeo (Campos, 2006). Un dato de importancia es la correlación que existe entre el consumo específico del helecho macho (*Pteridium aquilinum*) y la persistencia de papilomas ocasionados por BPV-2 para la aparición de cáncer en vejiga urinaria (Leishangthem et al., 2008; Borzacchiello y Roperto, 2008; Vázquez-Díaz et al., 2012; Roperto et al., 2008).

Los hallazgos histopatológicos de lesiones causadas por PV muestran un crecimiento epitelial diferenciado, que genera hiperplasia, además acantosis e hiperqueratosis con tendencia al crecimiento de formaciones tubulares de queratina. Otro hallazgo común es la vacuolización nuclear en el estrato espinoso de la dermis (coilocitosis), con presencia de núcleos vacíos y otros cuerpos de inclusión (Vázquez-Díaz et al., 2012).

Detección de papilomavirus

Los PV no se pueden aislar en cultivos celulares, debido a que éstos sólo proliferan en células diferenciadas permisivas y éstas no pueden mantenerse en cultivo (Rowen, 1998). En la actualidad la técnica de identificación de PV más utilizada a nivel mundial es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación de círculo rodante (RCA) (Silva et al., 2013; Carvalho et al., 2012; Reagin et al., 2003). El virus ha sido detectado en epitelio, así como en gametos y fluidos (semen y sangre), siendo esto base para la hipótesis de que es quizá la sangre quién lo transporta a varias zonas del cuerpo (Vázquez-Díaz et al., 2012).

La detección basada en la técnica de PCR se realiza amplificando el ADN vírico en la región L1 mediante el uso de los iniciadores FAP59/FAP64 y MY09/MY11, los cuales fueron diseñados para amplificar dos regiones conservadas del gen que codifica para la proteína L1 del papilomavirus humano (HPV L1), y que son ahora ampliamente utilizados para detectar tanto PV humanos como PV animales (Silva et al., 2013). Con el uso de la técnica de RCA se busca la amplificación completa del genoma viral (Figura 4); posteriormente se realiza una digestión enzimática del genoma amplificado, el cual a la hora de ser visualizado a través de una electroforesis puede presentar una serie de bandas características para los diferentes genotipos de PV o es secuenciado para obtener la información del genoma completo (Rector et al., 2004).

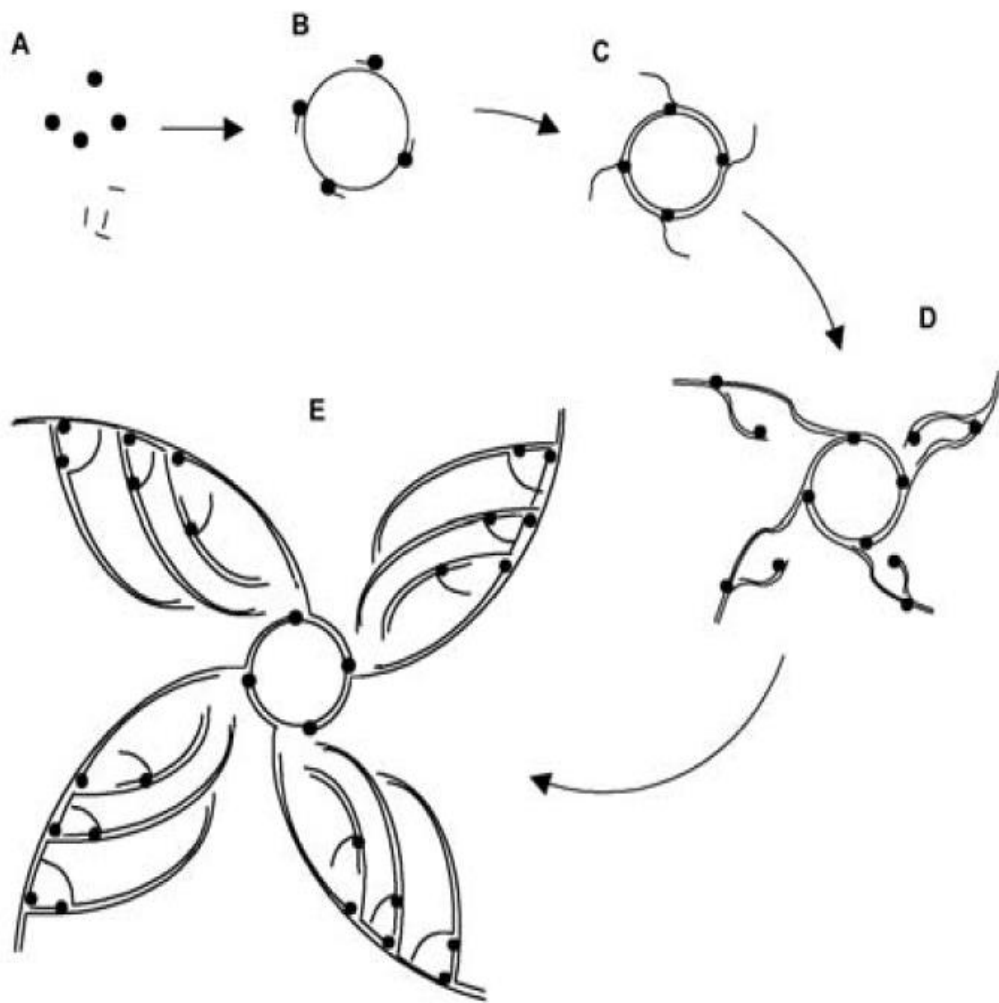


Figura 4. Amplificación de ADN circular. **A)** Reconocimiento y desnaturalización de la hebra simple de ADN circular por Phi29 ADN polimerasa, **B)** Inicio de la síntesis desde la plantilla, **C)** La replicación continua da repeticiones en tándem de la plantilla original, **D)** y **E)** Continúa el desplazamiento generando un incremento exponencial de la doble hebra de ADN. Adaptada de Reagin et al. (2003).

En el caso de los BPV existen cinco genotipos que se han logrado identificar a través de la técnica de RCA y digestión enzimática (Cuadro 3), sin embargo, se desconocen los patrones de corte de los genotipos restantes (Lancaster y Olson, 1982).

Cuadro 3. Patrones de corte característicos de los BPV con diferentes enzimas de restricción

Genotipo	Número de Sitios Cortados			
	BamHI	EcoRI	HindII	HindIII
BPV-1	1	1	3	1
BPV-2	2	0	4	1
BPV-3	3	1	4	4
BPV-4	1	2	3	3
BPV-5	1	0	4	4

BamHI: *Bacillus amyloliquefanciens* HI; EcoRI: *Escherichia coli* RI; HindII: *Haemophilus influenzae* II; HindIII: *Haemophilus influenzae* III. Fuente: Elaboración propia (Lancaster y Olson, 1982)

Otra técnica utilizada para identificar la presencia del virus, sin especificar genotipo, es la histología. En esta se describe la presencia de lesiones características provocadas por la infección como lo es la proliferación de células del estrato basal, espinoso y granular con núcleos ovales hipercromáticos y nucleolos prominentes (Williams et al., 2011; Vázquez-Díaz et al., 2012).

En Costa Rica el diagnóstico de la papilomatosis en bovinos se lleva a cabo de forma clínica (por observación). A pesar de que en el país se encuentra disponible los métodos moleculares e histológicos, no es común que se utilicen por parte de los clínicos involucrados en el diagnóstico.

Control y tratamiento

Los abordajes dirigidos al control de los animales afectados por BPV van de la mano con el aislamiento del bovino enfermo y la desinfección o descarte de aquellos utensilios que han sido usados en estos. De forma empírica los productores también recurren a un mayor control de ectoparásitos, previniendo así una posible transmisión mecánica.

Diferentes tipos de tratamientos se han probado con resultados diversos. En el caso de los tratamientos farmacológicos se ha recurrido a la administración de levamizol, la

ivermectina y el cobre, así como también la aplicación tópica de ácido salicílico, yodo y formaldehído (Valencia et al., 2013; Fufa, 2018). A nivel de terapias inmunológicas se han probado la autohemoterapia y la autovacuna (Ñumbay et al., 2016). Además, se ha recurrido a métodos quirúrgicos, en algunos casos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araldi, R., Reis, S., Carvalho, R., Caldas, M., Mazzuchelli, J., Fiusa, R., Grando, D., Peppino, F., de Cassia, Rita. y Beçak W. (2017). Papillomaviruses: a systematic review. *Genetics and Molecular Biology*, 40(1): 1-21.

Arroyo, J.D. (2015). Detección e identificación de los virus del papiloma humano, caracterización de dos nuevas variantes. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

Bernard, H., Burk, R., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. y de Villiers, E. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401(1): 70-79.

Borzacchiello, G. (2007). Bovine papillomavirus infections in animals. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 673-679.

Borzacchiello, G. y Roperto, F. (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research*. 39(5):45.

Campos, M.S. (2006). Bovine papillomavirus: old system, new lessons?. En: *Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond*. Wymondham: Caister Academic Press. 1-33.

Carvalho, C., Btista M., Silva, M., Balbino, A. y Freitas A. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59(5): 441-447.

Chambers, G., Ellsmore, V., O'Brien, P., Reid, S., Love, S., Campo, M. y Nasir, L. (2003). Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology*. 84: 1055-1062.

CONtextoganadero (2016). <http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/la-papilomatosis-una-enfermedad-que-ataca-al-ganado-joven>. [En línea] Disponible en: <http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/la-papilomatosis-una-enfermedad-que-ataca-al-ganado-joven> [Último acceso: 7 Julio 2017].

De Villier, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H. y zur Hausen, H. (2004). Classification of Papillomaviruses. *Virology*. 324(1): 17-27.

Diniz, N., Melo, T, Santos, J., Mori, E., Brandão, P., Richtzenhain L., Freitas, A., Beçak W., Carvalho R. y Stocco, R. (2009). Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte culture from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 8(4): 1474-1480.

Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 32S: S7-S15.

Doorbar, J. y Raj, K. (2007). Biology of papillomavirus replication in infected epithelium. *Future Virology*. 2(6): 573-586.

Finlay, M., Yuan, Z., Burden, F., Trawford, A., Morgan, I., Saveira, M. y Nasir, L. (2009). The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Research*. 144(1-2): 315-315.

Freitas, A., de Carvalho, C., Brunner, O., Birgel-Junior, E., Melville, A., Benesi, F., Gregory, L., Beçak W. y Stocco, R. (2003). Viral DNA Sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(1): 76-78.

Fufa, A. (2018) Cutaneous bovine papillomatosis (Warts) treatment outcome using ivermectin: A case of crossbred heifer and Calf. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 9(2):544.

Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A. y Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 384(2): 324-334.

INTECH. (2013). Bovine Papillomaviruses — Taxonomy and Genetic Features. En: Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications. s.l. INTECH. 113-136. <http://dx.doi.org/10.5772/56195>

Laboratório de Patologia da UFSC-Curitiba. (2017). <http://patologiaveterinaria.paginas.ufsc.br/2016/05/16/intoxicacao-por-samambaia/>. [En línea]. Disponible en: <http://patologiaveterinaria.paginas.ufsc.br/2016/05/16/intoxicacao-por-samambaia/> [Último acceso: 7 Julio 2017].

Lancaster, W.D. y Olson, C. (1982). Animal Papillomaviruses. *Microbiological Reviews*. 46(2): 191-207.

Leishangthem, G.D., Somvanshi, R. y Lauren, D.R. (2008). Pathological studies on Bovine papilloma virus-fern interaction in hamsters. *Indian J. Exp. Biol.*, 46(2): 100-107.

Lindsey, C., Almeida, M., Vicari, C., Carvalho, C., Yagui, A., Freitas, A., Beçak W. y Stocco, R. (2009). Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetic and Molecular Research*, 8(1): 310-318.

Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A.A., de Alcântara, B.K., Rodrigues, W.B., de Miranda, A.B. y Alfieri, A.F. (2013). Genetic characterization of novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* 162: 207-213.

Munday, J.S., Thomson, N., Dunowska, M., Knight, C.G. Laurie, R.E. y Hills, S. (2015). Genomic characterisation of the feline sarcoide-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos Taurus papillomavirus type 14*. *Vet. Microbiol.* 177: 289-295.

Murphy, F., Gibbs, P., Horzinek, M. y Studdert, M. (1999). *Veterinary Virology*. Oxford: Elsevier.

Nair, L. y Campo, M. S. (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Journal compilation*. 19(5): 243-254.

- Ñumbay, T., Fernández, S., Pérez, O, Nuñez, I., Escalante, B. y Castro, G. (2016). Comparación de los efectos de la autovacuna, la autohemovacuna, y la terapia combinada en el tratamiento de la papilomatosis bovina. *Comped. Cienc. Vet.* 6(2): 36-41
- Reagin, M., Giesler, T., Merla, A., Resetar-Gerke, J., Kapolka, K. y Mamone, J. (2003). TempliPhi: A sequencing Template Preparation Procedure That Eliminates Overnight Cultures and DNA Purification. *Journal of Biomolecular Techniques*, 14(2): 143-148.
- Rector, A., Tachezy, R. y Van Ranst, M. (2004). A Sequence-Independent Strategy for Detection and Cloning of Circular DNA Virus Genomes by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification. *Journal of Virology*, 78(10): 4993-4998.
- Rector, A. y Van Rast, M. (2013). Animal papillomaviruses. *Virology*. 445(1-2): 213-223.
- Rodríguez, R., Cordero, L., Gutiérrez, E., Castro, M., Ojeda, M., Tzab, R. y Castro, J. (2015). Papilomatosis bovina en el trópico de mexicano: presentación clínica y control. *Bioagrociencias*, 8(1): 45-52.
- Roperto, S., Brun, R., Paolini, F., Urraro, C., Russo, V., Borzacchiello, G., Pagnini, U., Raso, C., Rizzo, C., Roperto, F. y Venuti, A. (2008). Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. *Journal of General Virology*. 89(Pt 12): 3027-3033.
- Roperto, S., Comazzi, S., Ciusani, E., Paolin, F., Borzacchiello, G., Esposito, I., Lucà, R., Russo, V., Urraro, C., Venuti, A. y Roperto, F. (2011). PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *Journal of General Virology*. 92: 1787-1794.
- Roperto, S., Munday, J.S., Corrado, F., Gorla, M. y Roperto, F. (2016). Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Vet. Microbiol.* 190:1-4.
- Rowen, L. (1998). Toward a human papillomavirus vaccine. *Dermatologic Clinics*. 16(4): 835-838.

Schmitt, M., Fiedler, V. y Muller, M. (2010). Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPC genotyping assay. *Journal of Virology Methods*. 170(1-2): 67-72. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.020.

Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Handisurya, A., Chistensen, N., Reininger, B., Brandt, S. y Kirnbauer, R. (2009). Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. *Virology*. 393(1): 1-6. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.036.

Shope, R. E. y Hurst, W. E. (1933). Infectious Papillomatosis of Rabbits. *Journal of Experimental Medicine*. 58(5): 607-624.

Silva, M., Batista, M., Pont, N., Santos, E., Coutinho, L., Castro, R., Balbino, V. y Freitas, A. (2013). Comparison of two strategies for detection of bovine papillomavirus. *Journal of Virological Methods*. 192(1-2): 55-58

Valencia, C., Payan, J., Appel, V. y Slazar, H. (2013) Valoración de la eficacia del cobre contra la papilomatosis bovina en el departamento del Cauca. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 11(1): 218-224

Van Doorslaer, K. (2013). Evolution of the Papillomaviridae. *Virology*. 445(1-2): 11-20.

Van Doorslaer, K., Li, Z., Xirasagar, S., Kaminsky, D., Liou, D., Liou, D., Sun, Q., Kaur, R., Huyen, Y. y McBride, A. (2017). The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Research*. 45: D499-D506.

Vázquez, R., Escudero, C., Doménech, A., Gómez-Lucía, E. y Benitez, L. (2012). Papilomatosis Bovina: Epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 6(2): 19-57.

Williams, J., van Dyk, E., Nel, P., Van Wilpe, E., Bengis, R., de Klerk-Lorist, L. y van Heerden, J. (2011). Pathology and immunohistochemistry of papillomavirus-associated cutaneous lesions in Cape mountain zebra, giraffe, sable antelope and African buffalo in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. 82(2): 97-106.

Yagui, A., Carvalho, C., Freitas, A., Bentim, L, Zaidan, M., Birgel, E., Beçak W. y Stocco, R. (2006). Papillomatosis in cattle: In situ detection of bovine papillomavirus DNA

sequences in reproductive tissues. *Brazilian Journal of morphological sciences*. 23(3-4): 525-529.

zur Hausen, H. y De Villier, E.-M. (1994). Human Papilloma Viruses. *Annual Review of Microbiology*. 48: 427-447.

ARTICULO 1

Genotipos de papilomavirus bovino presentes en Costa Rica

Resumen

Los papilomavirus bovinos ocasionan proliferaciones fibroepiteliales en piel y mucosa que pueden ocasionar pérdidas económicas al ganadero debido al retraso en el desarrollo, la mala condición corporal y la reducción en la producción de leche, si están localizados en la ubre en donde interfieren con el ordeño. El presente estudio tuvo como objetivo establecer los genotipos de papilomavirus bovino (BPV) presentes en ganado bovino en diferentes zonas del país mediante técnicas moleculares. Se realizó un estudio descriptivo, con muestreo no probabilístico por conveniencia. Durante un año (2018) se recolectó un total de 99 papilomas, provenientes de 63 animales y 32 fincas, los cuales se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa, replicación circular de ADN, secuenciación y digestión enzimática. Se determinó por primera vez la presencia de siete genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11) en Costa Rica. El BPV genotipo 6 fue el que se detectó más frecuentemente en las muestras analizadas (33,3%), seguido del BPV-2 (26,7%) y BPV-1 (26,7%), mientras que los genotipos BPV-1 y BPV-2 fueron los que se encontró más ampliamente distribuidos en el país. En dos animales se determinó infección con dos genotipos de BPV, en un caso BPV-1 y BPV-2, y en otro caso BPV-4 y BPV-6. El método de digestión enzimática con las enzimas *Escherichia coli* RY13, *Bacillus amyloliquefaciens* HI y *Saccharomyces cerevisiae* I permitieron la diferenciación de los genotipos BPV-1, BPV-2, BPV-4, y BPV-7, pero no resultó ser un método útil para identificar los demás genotipos (BPV-6, BPV-10 y BPV-11). Se recomienda realizar estudios más amplios, para determinar los genotipos más prevalentes en nuestro país, y comunicar los resultados obtenidos a las autoridades y productores.

Palabras claves: Reacción en cadena de la polimerasa, amplificación en círculo rodante, ácidos nucleicos, diagnóstico.

Abstract

Bovine papillomaviruses cause fibroepithelial proliferations in the skin and mucosa that can cause economic losses to the farmer due to delayed development, poor body condition and reduced milk production, if they are in the udder where they interfere with milking. The present study aimed to establish the genotypes of bovine papillomavirus (BPV) present in cattle in different areas of the country using molecular techniques. A descriptive study was carried out, with a non-probability convenience sampling. For one year (2018) a total of 99 papilloma's, from 63 animals and 32 farms, were collected and analyzed by polymerase chain reaction, circular DNA replication, sequencing, and enzymatic digestion. The presence of seven BPV genotypes (BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 and BPV-11) was determined for the first time in Costa Rica. BPV genotype 6 was the most frequently detected in the analyzed samples (33.3%), followed by BPV-2 (26.7%) and BPV-1 (26.7%), while the BPV genotypes 1 and 2 were the most widely distributed in the country. In two animals, infection with two BPV genotypes was determined, in one case BPV-1 and BPV-2, and in another case BPV-4 and BPV-6. The enzymatic digestion method with the enzymes *Escherichia coli* RY13, *Bacillus amyloliquefaciens* HI and *Saccharomyces cerevisiae* I allowed the differentiation of the genotypes BPV-1, BPV-2, BPV-4, and BPV-7, but not for identifying the other genotypes (BPV-6, BPV-10 and BPV-11). It is recommended to carry out larger studies to determine the most prevalent genotypes in our country, and to communicate the results obtained to the authorities and producers.

Keywords: Polymerase chain reaction, rolling circle amplification, nucleic acids, diagnosis

1. Introducción

El papilomavirus bovino (BPV) pertenece a la familia Papillomaviridae, un virus ADN de doble hebra circular y un tamaño de 8kb que alberga ocho genes (Nair y Campo, 2008). A nivel mundial se han establecido 15 genotipos de BPV ubicados en los géneros Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus y Epsilon papillomavirus, a excepción del BPV-7 que aún no ha sido clasificado (Vázquez et al., 2012; Lunardi et al., 2013; Munday et al., 2015; Roperto et al., 2016; Araldi, et al. 2017; Cardona-Álvarez et al., 2018). La clasificación en

genotipos se basa en las secuencias de nucleótidos del gen que codifica para la proteína de cápside L1. Dependiendo del nivel de homología, se clasifican nuevas especies, genotipos, subtipos o variantes (zur Hausen y De Villier, 1994). En Sur- y Norteamérica se han reportado 13 genotipos (BPV-1 a BPV-13), BPV-1 y BPV-2 parecen ser los más prevalentes, mientras que el BPV-14 se ha reportado hasta la fecha solamente en Australia, Norte América y Nueva Zelanda (Vázquez et al., 2012; Munday et al., 2015)

La papilomatosis bovina se caracteriza por hiperproliferación de tejidos epiteliales en la piel y en las mucosas, ocasionando las verrugas o gabarros. Las lesiones pueden ser pocas o múltiples, y se ubican generalmente en la cara, el cuello, la espalda y el tronco del animal (Cruz-Ceballos, 2001). Los papilomas pueden ocasionar pérdidas económicas al ganadero debido al retraso en el desarrollo, la mala condición corporal y la reducción en la producción de leche, si las lesiones están localizadas en la ubre, en donde interfieren con el ordeño y pueden producir mastitis (Wellenberg et al., 2002; Vázquez et al., 2012).

El diagnóstico del papilomavirus bovino se realiza principalmente a través de observación clínica, las lesiones se muestran con morfologías de tipo coliflor, pedunculadas, planas y atípicas (Bastita et al., 2013). También es posible utilizar técnicas moleculares, como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del gen L1 (Lunardi et al., 2013; Araldi et al., 2014), o amplificación de círculo rodante (RCA) y digestión enzimática o secuenciación del genoma completo del virus (Rector et al., 2004).

En Costa Rica no se ha realizado ningún estudio molecular sobre papilomatosis bovina, por lo que se desconocen los genotipos presentes en el país. El presente estudio tiene como objetivo establecer los genotipos de BPV presentes en ganado bovino de diferentes zonas del país mediante técnicas moleculares.

2. Materiales y Métodos

2.1. Población de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, con un muestreo no probabilístico y por conveniencia, para determinar la presencia de genotipos de BPV en ganado bovino costarricense. Se utilizó un muestreo por bola de nieve (se identifica sujetos potenciales en la población y se pide a estos que recluten a otros) para analizar lesiones papilomatosas recolectadas durante un año.

Los bovinos provenían de fincas de diferentes usos productivos. A los productores se les explicó el proyecto y se obtuvo su consentimiento (Anexo 1).

2.2. Toma de muestra e información

Antes de la toma de muestras se recopiló la siguiente información: localización de la finca (mediante georreferenciación), e identificación del animal. La información obtenida se guardó en una base de datos (Anexo 2).

Las muestras de papilomas en bovinos se tomaron de diferentes zonas anatómicas en un animal o de diferentes animales en un hato, siempre y cuando mostraran diferente morfología, recolectando papilomas en un máximo de tres bovinos por finca, y no más de tres lesiones distintas por animal. La recolecta de las muestras se realizó utilizando un bisturí estéril, luego de limpiar la zona afectada con alcohol yodado al 2%. Una vez tomada la muestra se procedió a aplicar un antibiótico en spray en el lugar donde se sustrajo el papiloma para evitar algún tipo de infección posterior a la recolecta. Las muestras se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 1,5 ml con alcohol al 70% y una vez en el laboratorio se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

2.3. Extracción, amplificación y secuenciación del ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo las especificaciones del Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany). Inicialmente se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una región conservada de 478pb del gen que codifica para la proteína estructural L1 (Araldi et al., 2014), usando los cebadores FAP59/FAP64 (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3' y 5'CWATATCWVHCATITCICCATC-3'). La reacción de PCR se realizó con DreamTaq master mix 1X (Thermo Scientific, USA), 0,25 µM de cada cebador, 1,25 µL de ADN (100 ng/uL) y agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, USA) en un volumen de 25 µL. Las condiciones para la amplificación fueron una desnaturalización inicial a 94°C de 10 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 90 segundos, hibridación a 50°C por 90 segundos, extensión 90 segundos a 72°C; y una extensión final a 72°C de 5 minutos (Roperto et al., 2008; Ogawa et al., 2004). La visualización del producto amplificado se llevó a cabo

por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% teñido con 1 μ L de GelRed (Thermo Scientific, USA) en donde se cargó 5 μ L del amplicon. La cámara de electroforesis (Cleaver Scientific, MSMIDI) utilizó condiciones de 75 voltios por un lapso de una hora. El marcador de peso molecular usado fue de 100 pb (Thermo Scientific, USA).

Finalmente, se envió a secuenciar los mejores productos de PCR para cada morfología (coliflor, pedunculado, plano y atípico). La identificación de los genotipos se realizó a través de la edición de las secuencias en el software Bioedit 7.2.5 y comparación con las secuencias reportadas en el GenBank por medio del algoritmo BLAST.

2.4. Replicación de ADN Circular (RCA)

Cada genotipo de BPV identificado en el presente trabajo se sometió a una amplificación del genoma completo a través del uso del kit de RCA TempliPhi Amplification Kit (GE) (Rector *et al.*, 2004). Para eso se utilizó 10 μ L del tampón de ensayo TempliPhi y 5 μ L del ADN muestra. En un primer tubo se desnaturalizó la muestra a 95° por 3 minutos y se colocó en hielo. En un segundo tubo se agregó 10 μ L del tampón de reacción TempliPhi, 0,4 μ L de la mezcla enzimática TempliPhi, 0,4 μ L de dNTP (10mM). Se mezcló el contenido de los dos tubos, dejándose incubar por 18 horas a 30°C en el termociclador. Terminada la reacción se colocó el producto a 65°C por 10 minutos para inactivar la ADN polimerasa y se guardó a -20°C (Rector *et al.*, 2004). Los productos de RCA se digirieron con enzimas de restricción de tipo *Escherichia coli* RY13 (EcoRI), *Bacillus amyloliquefaciens* HI (BamHI) y *Saccharomyces cerevisiae* I (SacI). Se adicionó 25 μ L de la mezcla de reacción de cada una de las enzimas junto a 5 μ L del producto de RCA y se incubó a 37°C por 2 horas. Se utilizó 5 μ L de cada muestra digerida para visualizar los patrones de corte mediante electroforesis, utilizando gel de agarosa al 1% bajo las condiciones descritas previamente para el PCR. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific, USA).

2.5. Análisis de datos

Los resultados del PCR y RCA se incluyeron en una base de datos. Se determinó la presencia de genotipos por provincia y se georreferenció la distribución de los genotipos. Adicionalmente se investigó los patrones de corte de los diferentes genotipos identificados

ante el uso de las enzimas de restricción sobre los productos de RCA. Se realizó árboles filogenéticos de los BPV encontrados según procedencia mediante el uso del software MEGA7. Los números de acceso del GenBank usados como referencia para la creación del árbol filogenético fueron BPV-1 (JX678969.1), BPV-2 (M20219.1), BPV-3 (AF486184.1), BPV-4 (X05817.1), BPV-5 (AF457465.1), BPV-6 (AJ620208.1), BPV-7 (DQ217793.1), BPV-8 (DQ098913.1), BPV-9 (AB331650.1), BPV-10 (AB331651.1), BPV-11 (AB543507.1), BPV-12 (JF834523.1), BPV-13 (JQ798171.1), BPV-14 (KR868228.1), BPV-15 (KM983393.1) y HPV (JX316020.1).

3. Resultados

Se recolectó un total de 99 papilomas de 63 animales, provenientes de 32 fincas. De 35 (55,6%) animales se recolectó solamente un papiloma, de 20 (31,7%) dos y de 8 bovinos (12,7%) tres papilomas. Los papilomas se recolectaron de bovinos de cinco provincias de Costa Rica. En la Figura 1 se desglosa la procedencia de los papilomas, donde se observa que la mayoría se recolectó de la provincia de Alajuela (43%).

Un total de 84 papilomas recolectados de 56 animales resultaron PCR positivos y 15 muestras de siete animales PCR negativos. Las 15 muestras PCR negativas se volvieron a analizar, primero mediante RCA y posteriormente PCR, resultando seis muestras de cuatro animales positivos, mientras que nueve papilomas de tres animales siguieron mostrando resultados RCA/PCR negativos.

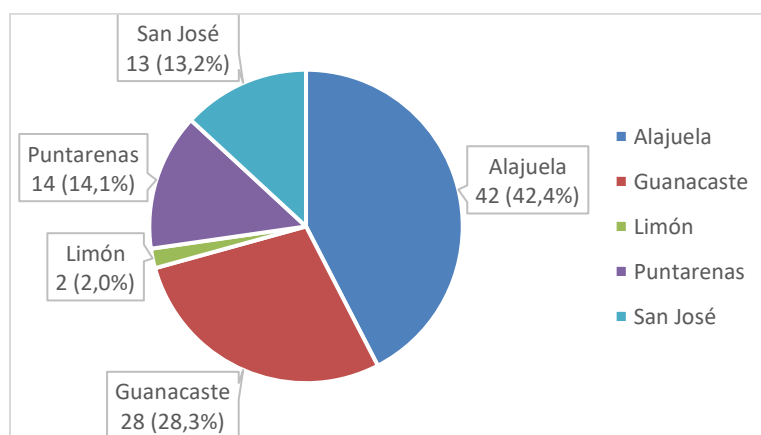


Figura 1. Cantidad de papilomas recolectados de bovinos, según provincia, en Costa Rica en 2018

La secuenciación determinó la presencia de siete genotipos (BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11) en un total de 30 papilomas analizados, los cuales presentaron identidades nucleotídicas entre 99-100% con genotipos patrón depositados en GenBank. Los números de acceso de las secuencias costarricenses depositadas en GenBank se presentan en el Cuadro 1. El análisis filogenético corrido en MEGA7 (Figura 2) coincide con los resultados obtenidos por el algoritmo BLAST.

Cuadro 1. Genotipos de BPV detectados en 30 papilomas bovinos analizados en Costa Rica

Genotipo	n (%)	Similitud nucleotídica (pb)	Genotipo patrón (GenBank)	Número Acceso
BPV-1	8 (26,7)	100% (429/429)	KC595244.2	MT385853
BPV-2	8 (26,7)	100% (431/431)	LC426022.1	MT385854
BPV-4	1 (3,0)	99% (430/434)	X05817.1	TM385855
BPV-6	10 (33,3)	100% (428/428)	AB845589.1	TM385856
BPV-7	1 (3,0)	99% (439/440)	HM245431.1	TM385857
BPV-10	1 (3,0)	100% (428/428)	MH729199.1	TM385858
BPV-11	1 (3,0)	99% (430/431)	JQ897976.1	TM385859

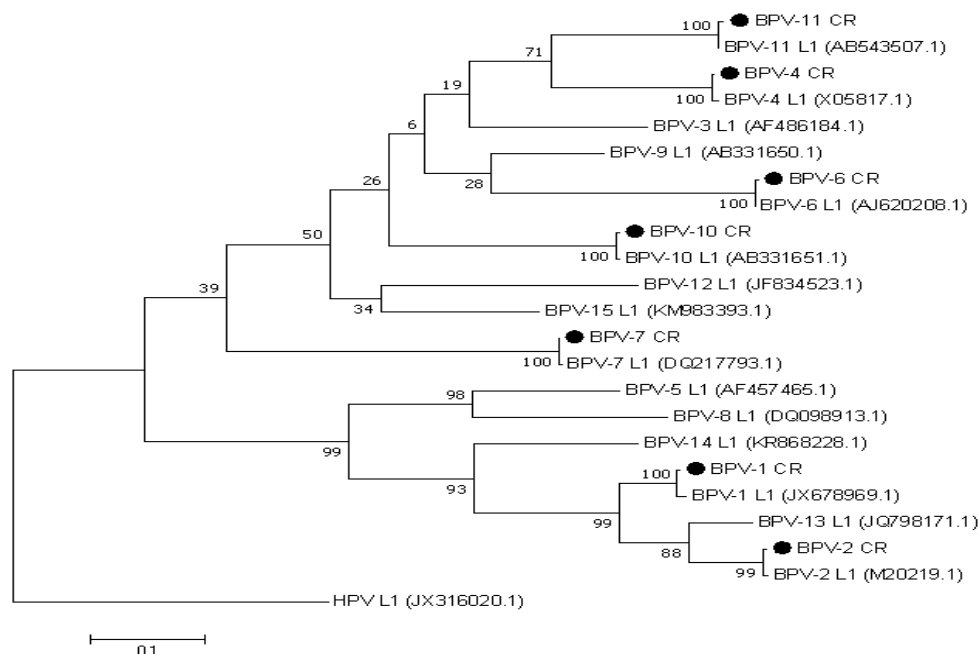


Figura 2. Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud, utilizando el método del modelo Tamura-Nei, con soporte de Bootstrap para 1000 réplicas a partir de productos de PCR para el gen L1 de BPV encontrados en Costa Rica

El genotipo más frecuentemente encontrado en las lesiones fue el BPV-6 (33,3%), el cual se encontró presente en dos provincias (Alajuela y Guanacaste), mientras que el BPV-2 se encontró en cuatro provincias (San José, Alajuela, Guanacaste y Puntarenas) y el BPV-1 en las 5 provincias analizadas (San José, Alajuela, Guanacaste, Puntarenas y Limón). Los genotipos BPV-4, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 solamente se encontraron en una provincia cada uno (Cuadro 2). En bovinos de la provincia Alajuela se determinó la presencia de 6 genotipos de BPV.

Cuadro 2. Ubicación de los genotipos de BPV detectados, según la provincia donde se recolectaron los papilomas

Provincias	Genotipo							Total (%)
	BPV-1	BPV-2	BPV-4	BPV-6	BPV-7	BPV-10	BPV-11	
San José	1	1	----	----	----	----	----	2 (6,7)
Alajuela	4	2	1	6	1	1	----	15 (50,0)
Guanacaste	1	1	----	4	----	----	----	6 (20,0)
Puntarenas	1	4	----	----	----	----	----	5 (16,6)
Limón	1	----	----	----	----	----	1	2 (6,7)
Total (%)	8 (26,7)	8 (26,7)	1 (3,0)	10 (33,3)	1 (3,0)	1 (3,0)	1 (3,0)	30 (100,0)

La distribución de los genotipos de BPV encontrados en los bovinos se muestra en la Figura 3. Se determinó la presencia de un solo genotipo en 87,5% (21/24) de fincas, en las cuales se secuenciaron las muestras, mientras que en tres fincas se encontraron dos genotipos en cada una de las fincas. El BPV-6 se encontró en un 37,5% (9/24) de las fincas, BPV-2 estuvo presente en 25% (6/24) de las fincas y el BPV-1 se encontró en 25% (6/24) de las fincas, resultando ser los genotipos con mayor presencia en las diferentes provincias. En Cajón de Pérez Zeledón (San José) y en Santa Clara de San Carlos (Alajuela) se encontraron coinfecciones de BPV1/BPV2 y BPV4/BPV6, respectivamente, en un mismo animal, mientras que BPV-1/BPV-6 se encontró en una misma finca, pero en animales distintos, en Ciudad Quesada de San Carlos (Alajuela).

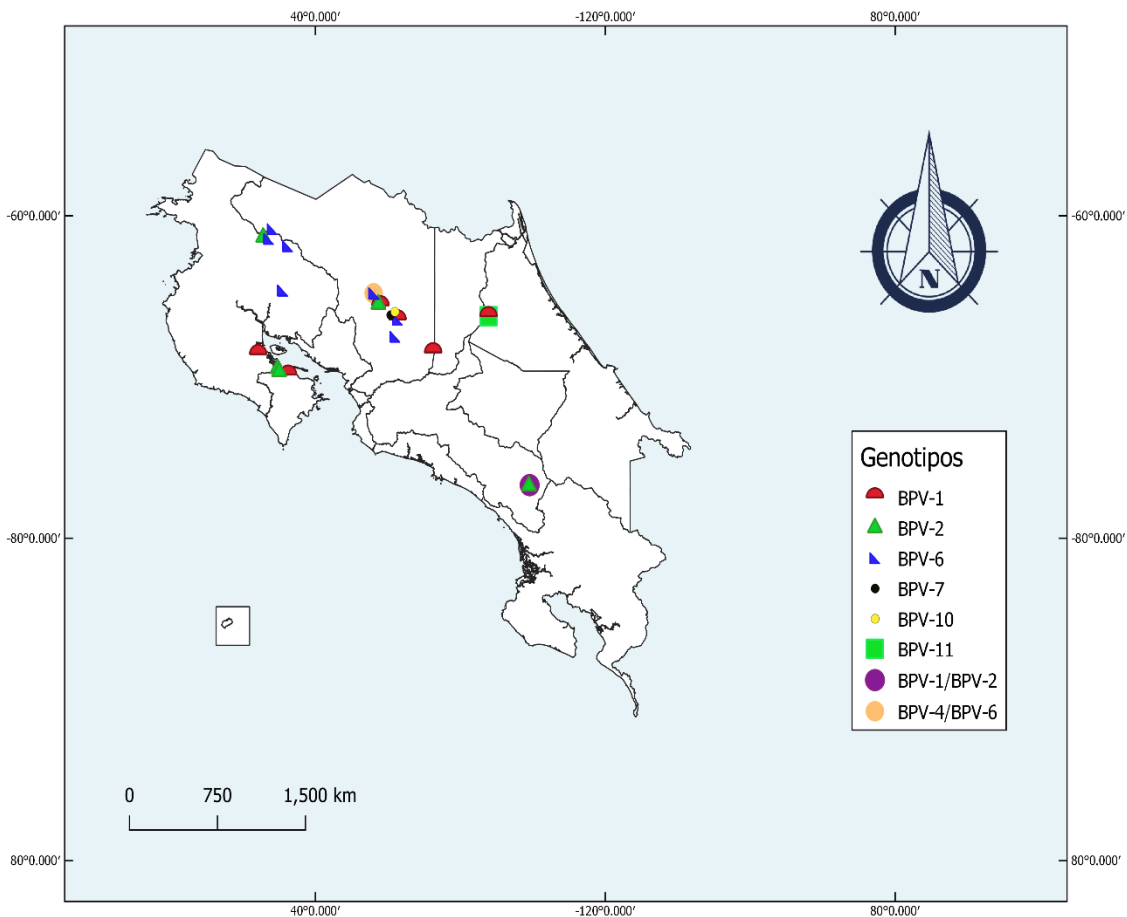


Figura 3. Distribución de genotipos de BPV detectados en diferentes regiones de Costa Rica en 2018

El patrón de corte por digestión enzimática para los siete genotipos se muestra en el Cuadro 3. Las áreas donde se registraron los cortes de BPV1, BPV-2, BPV-4 y BPV-7 fueron zonas de un alto peso molecular (>4Kb). Para BPV-1, BPV-4 y BPV-7 se estableció un corte cercano a 7 Kb en presencia de EcoRI. Para BPV-1, BPV-2, BPV-4 y BPV-7 el corte de mayor peso con BamHI fue cercano a 6Kb, y en el caso de BPV-1, BPV-2 y BPV-4 la enzima SmaI generó cortes en la región cercana a los 7 kb. No se logró obtener patrón de cortes para los genotipos BPV-6, BPV-10 y BPV-11.

Cuadro 3. Patrones de corte por digestión enzimática de genotipos de BPV detectados en Costa Rica

Genotipo	EcoRI	BamHI	SacI
BPV-1	1	1	1
BPV-2	0	2	1
BPV-4	2	1	1
BPV-6	0	0	0
BPV-7	1	2	0
BPV-10	0	0	0
BPV-11	0	0	0

4. Discusión

Este estudio determinó por primera vez en nuestro país y en la región centroamericana la presencia de siete genotipos de BPV en lesiones de bovinos mediante técnicas moleculares: BPV-1 y BPV-2 pertenecientes al género Deltapapillomavirus, BPV-4, BPV-6, BPV-10 y BPV-11 pertenecientes al género Xipapillomavirus, y BPV-7, aún no clasificado en género alguno (Lunardi et al., 2013).

La mayoría de papilomas (91%) resultaron PCR positivas, confirmándose la presencia del virus en las lesiones. Los resultados negativos en un 9% de los casos se pueden atribuir a la sensibilidad de la técnica utilizada, lo que concuerda con reportes de sensibilidades de 54-100% para el PCR que utiliza los iniciadores FAP59/FAP64, mismos que se utilizaron en el presente trabajo (Ogawa et al., 2004; Silva et al., 2013).

La provincia de Alajuela fue la que aportó mayor cantidad de animales para el estudio, mostrando la preocupación de los propietarios por el problema en la zona, luego de llevar a cabo un muestreo utilizando el método de bola de nieve. En la provincia de Alajuela se encontró seis de los siete genotipos aquí reportados, esto puede ser consecuencia de que fue la zona de la que se obtuvo la mayoría de las muestras, además de que es una zona en donde se concentra gran cantidad de ganado lechero en el país, y es en ese tipo de ganado que generalmente se reporta la presencia de papilomas en las ubres (Vasquez et al., 2012; Módolo et al., 2017; Violet et al., 2017). El BPV genotipo 1 se encontró en todas las cinco provincias de donde se obtuvo muestras, lo cual nos indica una amplia distribución a nivel del territorio costarricense, seguido del BPV-2 que se encontró en cuatro provincias, mientras que el BPV genotipo 6 fue el que se detectó más frecuentemente en las muestras analizadas (33,3%), pero

únicamente en las provincias de donde se obtuvo la mayor cantidad de muestras, en Alajuela (43%) y en Guanacaste (28%), lo cual lo circunscribe a las zonas donde se da mayor actividad ganadera en Costa Rica. El BPV-1 y BPV-2 se mencionan en la literatura mundial como los genotipos más prevalentes (Vásquez et al., 2012).

De las fincas visitadas, solo en dos de ellas fue posible encontrar la presencia de 2 genotipos distintos infectando un mismo animal. El hallazgo de dos tipos de papilomas diferentes en un bovino, ocasionado por dos genotipos diferentes de BPV concuerda con lo reportado por Pompeo et al. (2009) y Carvalho et al. (2012), sin embargo, es la primera vez que se reporta la presencia de BPV-4 y BPV-6 en un mismo bovino a nivel mundial (Pompeo et al., 2009; Carvalho et al., 2013).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la importancia de establecer los genotipos presentes en una región determinada, si se desea desarrollar o introducir una vacuna de BPV, ya que vacunas contra un único tipo de BPV no resultarían eficaces y llevarían a un alto porcentaje de fallos terapéuticos (Vásquez et al., 2012).

Los resultados obtenidos con las enzimas EcoRI y BamHI coinciden con los reportes de Lancaster y Olson (1982) en el caso de BPV-1, BPV-2 y BPV-4, sin embargo, los resultados obtenidos con las enzimas EcoRI y BamHI para BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11, y los resultados de la enzima SmaI no habían sido reportados previamente. Los patrones de cortes obtenidos con las tres enzimas permitieron una diferenciación de los genotipos BPV-1, BPV-2, BPV-4, y BPV-7, habiendo además generado información nueva y complementaria. Otra ventaja de esta técnica es la obtención de cortes de alto peso molecular, que se pueden utilizar para clonar, y determinar la secuencia del genoma completo de los diferentes genotipos de BPV (Ogawa et al., 2007; Lunardi et al., 2013).

Debido a que el BPV-6, BPV-10 y BPV-11 no fueron digeridos por las enzimas de restricción utilizadas, se confirma el uso limitado de estas enzimas para la identificación de estos genotipos de BPV (Davis et al., 1986; Brownlee et al., 2015). Se recomienda utilizar otras enzimas para establecer patrones de corte para los genotipos BPV-6, BPV-10 y BPV-11 y así poder diferenciarlos entre sí y obtener cortes de alto peso molecular para clonar.

Este representa el primer estudio en Costa Rica, que establece genotipos de BPV presentes en el país. Se recomiendan realizar estudios más amplios, para determinar los genotipos más

prevalentes en nuestro país, y comunicar los resultados obtenidos a las autoridades y productores.

5. Conclusiones

- Se determinó por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la presencia de siete genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10, BPV-11).
- El BPV genotipo 6 fue el que se detectó más frecuentemente en los papilomas analizados (33,3%), seguido del BPV-2 (26,7%) y BPV-1 (26,7%).
- El genotipo BPV-1 fue el que se encontró más ampliamente distribuido en el país, seguido por BPV-2 (cinco y cuatro provincias, respectivamente).
- En dos animales se determinó coinfección con dos genotipos de BPV, en un caso BPV-1 y BPV-2, y en otro caso BPV-4 y BPV-6.
- El método de digestión enzimática con las enzimas EcoRI, BamHI y SacI permitieron la diferenciación de los genotipos BPV-1, BPV-2, BPV-4, y BPV-7, pero no de los demás genotipos (BPV-6, BPV-10 y BPV-11).

6. Recomendaciones

- Continuar con el diagnóstico molecular de papilomas para detectar genotipos presentes en el país y la región centroamericana.
- Realizar estudios sistemáticos para determinar el genotipo o los genotipos más prevalentes en nuestro país.
- Comunicar a las autoridades y productores los resultados obtenidos.

7. Referencias bibliográficas

Araldi, R.P., Carvlh, R.F., Melo, T.C., Diniz, N.S., Sant´Ana, T.A., Mazzuchelli-de-Souza, J., Spadacci-Morena, D.D., Beçak, W. y Stocco, R.C. (2014) Bovine papillomavirus in beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Genetic and Molecular Research*. 13(3):5644-5653.

Araldi, R., Reis, S., Carvalho, R., Caldas, M., Mazzuchelli, J., Fiusa, R., Grando, D., Peppino, F., de Cassia, Rita. y Beçak, W. (2017). Papillomaviruses: a systematic review. *Genetics and Molecular Biology*, 40(1): 1-21.

Batista, M., Silva, M., Pontes, N., Reis, M., Corteggio, A., Castro, R., Borzacchiello, G., Balbino, V. y Freitas, A. (2013). Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Veterinary Journal*. 197:368-373.

Brownlee, C. (2005). Danna and Nathans: Restriction enzymes and the boon to modern molecular biology. *PNAS*. 102(17): 5909.

Cardona-Álvarez, J., Montes-Vergara, D. y Álvarez-Peñate, J. (2018). Caracterización clínica, histopatológica e histoquímica del papiloma cutáneo en bovinos (*Bos Taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 21(1): 137-146.

Carvalho, C., Batista, M., Silva, M., Balbino, V. y Freitas, A. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59(5): 441-447.

Carvalho, R., Sakata, S., Giovanni, D., Brandão, P., Richtzenhain, L., Pozzi, C., Arcaro, J., Miranda, M., Mazzuchelli-de-Souza, J., Melo, T., Comecale, G., Assaf, S., Beçak, W. y Stocco, R. (2013). Bovine Papillomavirus in Brazil: Detection of Coinfection of Unusual Types by a PCR-RFLP Method. *Biomed Research International*. 2013:270898.

Cruz-Ceballos, F. (2001). *Papilomatosis*. Clínica de los Bovinos I. México: Facultad de Medicina Veterinaria. UNAM. 1-12.

Davis, L., Dibner, M., Battey, J. (1986). Section 5-4-Restriction endonucleases (Res) and their use. *Basic methods in molecular biology* (pp 51-57). New York, USA: Elsevier.

Lancaster, W. y Olson, C. (1982). Animal Papillomaviruses. *Microbiological Reviews*. 46(2): 191-207.

- Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A.A., de Alcântara, B.K., Rodrigues, W.B., de Miranda, A.B. y Alfieri, A.F. (2013). Genetic characterization of novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* 162: 207-2013.
- Módolo, D., Pinheiro, R., Mazzuchelli-de-Souza, J., Pereira, A., Carvalho, D., Zanphorlin, L., Beçak, W., Menossi, Stocco, R. y Carvalho, R. (2017). Integrated analysis of recombinant BPV-1 L1 protein for the production of a bovine papillomavirus VLP vaccine. *Vaccine.* 35(12): 1590-1593.
- Munday, J.S., Thomson, N., Dunowska, M., Knight, C.G. Laurie, R.E. y Hills, S. (2015). Genomic characterisation of the feline sarcoide-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos Taurus* papillomavirus type 14. *Vet. Microbiol.* 177: 289-295.
- Nair, L. y Campo, M.S. (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Journal compilation.* 19(5): 243-254
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I. y Shirasawa, H. (2004) Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papilomas and healthy teat skin. 85: 2191-2197.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M. y Shirasawa, H. (2007). Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *Journal of General Virology.* 88: 1934-1938.
- Pompeo, M., Lunardi, C., Alfieri, A., Arellano, R., Sartori, O., Pelegrinelli, M. y Fernandes, A. (2009). Multiple bovine papillomavirus infection associated with cutaneous papillomatosis in brazilian cattle herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 52: 93-98.
- Rector, A., Tachezy, R. y Van Ranst, M. (2004). A Sequence-Independent Strategy for Detection and Cloning of Circular DNA Virus Genomes by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification. *Journal of Virology,* 78(10): 4993-4998.
- Roperto, S., Munday, J.S., Corrado, F., Gorla, M., Roperto, F. (2016). Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Vet. Microbiol.* 190:1-4.

- Schmitt, M., Fiedler, V. y Muller, M. (2010). Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPC genotyping assay. *Journal of Virology Methods*. 170(1-2): 67-72.
- Silva M., Batista M., Pontes N., Santos E., Coutinho L., Castro R., Balbino, V. y Freitas, A. (2013). Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. 192: 55-58.
- Vázquez, R., Duch, E., Gómez, D., Duato, G. y Benítez, R. (2012). Papilomatosis Bovina: Epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 6(2): 19-57.
- Violet, L., Montes, D. y Cardona, J. (2017) Frecuencia de papilomatosis en bovinos (*Bos Taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Rev Colombiana Cienc Anim*. 9(2):294-300.
- Wellenberg, G., van der Poel, W. y Van Oirschot, J. (2002). Viral infection and bovine mastitis: A review. *Veterinary Microbiology*. 88(1): 27-45.
- zur Hausen, H. y De Villier, E.-M. (1994). Human Papilloma Viruses. *Annual Review of Microbiology*. 48: 427-447.

ARTÍCULO 2

Relación macroscópica e histopatológica de papilomas bovinos con diferentes genotipos de papilomavirus bovino

Resumen

Los papilomavirus bovinos (BPV) infectan el estrato basal del epitelio de los bovinos, donde pueden persistir de forma asintomática o producir hiperplasias fibroepiteliales benignas en piel o mucosas denominadas papilomas. El presente estudio tuvo como objetivo describir los tipos de papilomas bovinos a nivel macroscópico y microscópico, y relacionar la morfología de las lesiones con los genotipos de BPV encontrados en éstas. Se realizó un estudio descriptivo, con muestreo no probabilístico por conveniencia, en el cual se recolectó un total de 99 papilomas, provenientes de 63 animales y 32 fincas durante un año (2018). Se recopiló información sobre edad, género, raza, uso productivo del animal, grado de invasión, ubicación y morfología de los papilomas. Los papilomas se sometieron a análisis histopatológicos, además se analizaron mediante técnicas de diagnóstico molecular (reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación). El mayor número de animales con papilomas positivo se encontró en fincas lecheras (75,0%), afectando a hembras (95,0%), de raza Holstein (45,0%), y con edades superiores a los 24 meses (50,0%). La mayoría de los animales presentaron entre 1 y 15 papilomas (31,6%), y un único tipo de papiloma (79,4%). El papiloma que se encontró con mayor frecuencia fue el de tipo coliflor (48,5%), seguido del tipo plano (20,2%) y peduncular (20,2%), y el menos frecuente fue el papiloma atípico (11,1%). La morfología coliflor fue encontrada principalmente en la ubre (14,4%), cabeza (10,0%) y cuello (10,0%), y se asoció a 5 genotipos (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10) mientras que los BPV-2 y BPV-6 se encontraron asociados a todas las morfologías (coliflor, plano, pedunculado o atípico). Se reporta por primera vez la presencia de BPV-11 en papilomas con morfología plana y BPV-6 en papilomas con morfología atípica. Los papilomas asociados a BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 mostraron hiperqueratosis, y en algunos casos la presencia de vacuolización. La morfología y los hallazgos histopatológicos no permitieron una diferenciación de los genotipos de BPV. Se

recomienda realizar estudios más amplios y sistemáticos para determinar la morfología e histopatología de los papilomas producidos por los diferentes genotipos de BPV, y estudiar el posible rol de la inmunidad del huésped sobre morfología e histopatología de las lesiones.

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa, vacuolización, hiperqueratosis, bovinos, genotipos, fibrosis

Abstract

Bovine papillomaviruses (BPV) infect the basal layer of the epithelium of bovines, where they persist asymptotically or produce benign fibroepithelial hyperplasia's in the skin or mucosa called papilloma's. The present study aimed to describe the types of bovine papilloma's at macroscopic and microscopic level, and to associate the morphology of the lesions with the BPV genotypes. A descriptive study was carried out, with a non-probability convenience sampling. For one year (2018) a total of 99 papilloma's from 63 animals and 32 farms were collected, as well as information about age, gender, breed, and productive use of the bovines, degree of invasion, location, and morphology of the papilloma's. The samples were subjected to histopathological analysis, in addition they were analyzed using molecular diagnostic techniques (polymerase chain reaction and sequencing). The highest number of bovines with papilloma's was found in dairy farms (75,0%), in females (95.0%), of the Holstein breed (45,0%), and ages over 24 months (50,0%). Most of the animals presented from 1 to 15 papilloma's (31.6%) and a single type of papilloma (79.4%). The papilloma found with the highest frequency was the cauliflower type (48.5%), followed by the flat (20.2%) and peduncular type (20.2%), and the least frequent was the atypical papilloma (11.1%). Cauliflower morphology was mainly found in udder (14,4%), head (10,0%) and neck (10,0%) and associated with 5 genotypes (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 and BPV-10) while BPV-2 and BPV-6 were found associated with all morphologies (cauliflower, flat, pedunculated and atypical). The presence of BPV-11 in papilloma's with flat morphology and BPV-6 in papilloma's with atypical morphology is reported for the first time. Papilloma's associated with BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 and BPV-11 showed hyperkeratosis, and in some cases the presence of vacuolization. The morphology and

histopathological findings did not allow a differentiation of the BPV genotypes. It is recommended to carry out more extensive and systematic studies to determine the morphology and histopathology of the papilloma's produced by the different BPV genotypes, and to study the possible role of host immunity on the morphology and histopathology of the lesions.

Keywords: Polymerase chain reaction, vacuolization, hyperkeratosis, cattle, genotypes, fibrosis

1. Introducción

Los papilomas son ocasionados por papilomavirus, y se caracterizan por ser hiperplasias o tumoraciones benignas del epitelio o de la mucosa. Los papilomavirus bovinos (BPV) infectan el estrato basal del epitelio de los bovinos, donde pueden persistir de forma asintomática, como también generar neoplasias (Shafti-Keramat et al., 2009; Rodríguez-Vivas et al., 2015). Los papilomavirus fueron clasificados en tres grupos, dependiendo de su tropismo y la respuesta del hospedero: el Grupo 1, que lo conforman los papilomavirus que ocasionan neoplasias en el epitelio plano estratificado, el Grupo 2, los que ocasionan hiperplasia del epitelio plano no estratificado o metaplasia del epitelio plano estratificado, y el Grupo 3, los que producen papilomas cutáneos con fibroma subyacente en tejido conectivo. Así, los genotipos de papilomavirus bovino BPV-3 y BPV-6 conforman el Grupo 1, BPV-4 el Grupo 2, y BPV-1, BPV-2 y BPV-5 el Grupo 3 (Murphy et al., 1999). Sin embargo, en la actualidad la clasificación de los genotipos de BPV se basa en la secuencia de su genoma (Claus et al., 2009)

Las formas observadas sobre la piel, producto de la infección y expresión del BPV, suelen variar entre estructuras planas, pedunculadas (tipo “grano de arroz”), de tipo coliflor y atípicas, con características algunas veces fibrosas y de diversos tamaños. Las verrugas son comunes en animales jóvenes, y a menos que exista compromiso inmunológico, desaparecen de forma espontánea. No se ha reportado, que muestren predilección por sexo, pero comúnmente afecta más a vacas y toros *Bos taurus*, especialmente a las vacas de la raza Holstein (Vázquez et al., 2012).

El fibropapiloma es la forma más común a nivel del lomo, los pezones, la cabeza y el cuello. También es posible que ocurra una lesión conocida como papiloma invertido, donde la lesión se manifiesta hacia el estroma subyacente y no hacia el exterior (Murphy et al., 1999; Nair y Campo, 2008). Algunos BPV tienen predilección por ciertas zonas anatómicas (Cardona-Álvarez et al., 2018) y han sido asociados a lesiones específicas, como el BPV-1, que se manifiesta en forma de fibropapilomas del pene y pezón, el BPV-2 que produce verrugas cutáneas y fibropapilomas alimentarios, el BPV-3 que ocasiona papilomas cutáneos, el BPV-4 que produce papilomas epiteliales del tracto gastrointestinal superior, el BPV-5 fibropapilomas de tipo grano de arroz, el BPV-6 papilomas en las tetas, el BPV-8 papilomas cutáneos, y el BPV-9 y BPV-10 papilomas epiteliales de la ubre (Borzacchiello y Roperto, 2008). Sin embargo, los papilomas pueden encontrarse también en otros sitios diferentes a los predilectos (Carvalho et al., 2012).

El análisis histopatológico de los papilomas muestra un crecimiento epitelial diferenciado, hiperplasia, además acantosis e hiperqueratosis con tendencia del crecimiento de formaciones tubulares de queratina. Además, se observa generalmente vacuolización nuclear en el estrato espinoso de la dermis (coilocitosis), con presencia de núcleos vacíos y cuerpos de inclusión, sin existir reportes sobre diferencias entre genotipos a nivel histopatológico (Vázquez-Díaz et al., 2012).

Los papilomas en las ubres de vacas lecheras ocasionan generalmente mastitis, también dificultan el ordeño de estos animales (Vázquez-Díaz et al., 2012; Wellenberg et al., 2002). Por las pérdidas económicas que ocasiona este virus a la producción lechera como al mercado de carne, por la apariencia de los animales, se considera importante a nivel mundial (Borzacchiello y Roperto, 2008). El presente estudio tuvo como objetivo describir a nivel macroscópico y microscópico los tipos de papilomas presentes en bovinos costarricenses y relacionar los genotipos de BPV con la morfología y ubicación del papiloma.

2. Materiales y Métodos

2.1. Población de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, con un muestreo no probabilístico y por conveniencia. Se utilizó el muestreo de bola de nieve para recolectar papilomas bovinos durante un año (2018). Este muestreo consistió en identificar productores que tenían bovinos con papilomas

en sus fincas, a los cuales se les tomó las muestras, y se les pidió, que reclutaran al estudio a otros productores con problemas de papilomatosis en sus fincas. Los papilomas se tomaron de diferentes zonas anatómicas en un animal o de diferentes animales en un hato, siempre y cuando mostraran diferente morfología, y recolectando papilomas en un máximo de tres bovinos por finca, y no más de tres papilomas diferentes por animal. Los bovinos provenían de fincas de diferentes usos productivos (carne, leche y doble propósito). A los productores se les explicó el proyecto y se obtuvo su consentimiento (Anexo 1).

2.2. Toma de muestra e información

Antes de la toma de muestras se recopiló la siguiente información: localización de la finca (mediante georreferenciación), identificación del animal, edad, género, raza, uso productivo de los animales, grado de invasión (Categoría 1: menos de 15 papilomas en el animal, Categoría 2: 15-30 papilomas, Categoría 3: 30-45 papilomas, Categoría 4: más de 45 papilomas), ubicación de los papilomas, y morfología de los papilomas (coliflor, pedunculado, plano y atípico). La información obtenida se guardó en una base de datos (Anexo 2).

Se tomó una imagen del animal con los papilomas, y luego una imagen del papiloma una vez extraído del animal. Las imágenes se guardaron en un archivo en formato jpg. La toma de las muestras de papiloma se realizó utilizando un bisturí estéril, luego de limpiar la zona afectada con alcohol yodado al 2%. Una vez tomada la muestra se procedió a aplicar un antibiótico en aerosol en el lugar donde se sustrajo el papiloma para evitar algún tipo de infección posterior a la recolecta. Luego se conservaron las muestras individualmente en alcohol al 70% y en formaldehído al 10% usando tubos Eppendorf de 1,5 ml hasta su arribo al laboratorio. Las muestras conservadas en alcohol se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

2.3. Extracción, amplificación y secuenciación del ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo las especificaciones del Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany). Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una región conservada de 478pb del gen que codifica para

la proteína estructural L1 (Araldi *et al.*, 2014), usando los cebadores FAP59/FAP64 (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'/5'-CWATATCWVHCATITCICCATC-3'). La reacción de PCR se realizó con DreamTaq master mix 1X (Thermo Scientific, USA), 0,25 μ M de cada cebador, 1,25 μ L de ADN (100 ng/ μ L) y agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, USA) en un volumen de 25 μ L. Las condiciones para la amplificación fueron una desnaturalización inicial a 94°C de 10 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 90 segundos, hibridación a 50°C por 90 segundos, extensión 90 segundos a 72°C; y una extensión final a 72°C de 5 minutos (Roperto *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2004). La visualización del producto amplificado se llevó a cabo por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% teñido con 1 μ L de GelRed (Thermo Scientific, USA) en donde se cargó 5 μ L del amplicon. La cámara de electroforesis (Cleaver Scientific, MSMIDI) utilizó condiciones de 75 voltios por un lapso de una hora. El marcador de peso molecular usado fue de 100 pb (Thermo Scientific, USA).

Finalmente, se envió a secuenciar los 30 mejores productos de PCR de las diferentes morfologías (coliflor, pedunculado, plano y atípico). La identificación de los genotipos se realizó a través de la edición de las secuencias en el software Bioedit 7.2.5 y comparación con las secuencias reportadas en el Genbank por medio del algoritmo BLAST.

2.4. Histopatología

De las muestras donde se obtuvo los productos enviados a secuenciar, se realizó cortes del tejido de 0,5 cm y se colocaron en un casete para muestra histológica. Seguidamente se aplicó un protocolo de deshidratación con alcohol al 70%, 80%, 90%, 95%, y Xilol por lapsos de 2 horas cada uno. Posteriormente se trasladó a un baño en parafina líquida para asegurar su penetración, finalmente se preparó bloques de parafina que fueron cortados con un micrótopo a 5 μ m. Se dejó en la estufa a 54°C por 24 horas para luego teñirlos con Hematoxilina-Eosina (Lillie y Fullmer, 1976). La visualización histológica y descripción de las lesiones se realizó utilizando un microscopio de luz de marca Olympus con aumentos de 10X y 20X en busca de hallazgos diferenciales entre genotipos (Cardona-Álvarez *et al.*, 2018).

2.5. Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo (género, edad, raza, uso productivo, invasión) de los animales con papilomas BPV positivos. Se relacionó las morfologías de los papilomas BPV positivos con género y ubicación corporal. Los genotipos de BPV detectados en las lesiones se relacionaron con la morfología y ubicación de los papilomas, así como con hallazgos patológicos e histopatológicos. Finalmente se clasificó los papilomas en los grupos 1, 2 y 3 según tropismo y nivel de respuesta del hospedero (Murphy et al., 1999).

3. Resultados

En 23 de las 32 fincas se obtuvo solo una muestra por animal, en 16 fincas dos muestras por animal y en 7 fincas tres muestras por animal. Los animales de los que se obtuvo los papilomas fueron 63, pero solamente en un 95,2% (n=60) de los animales se determinó la presencia de BPV en las lesiones. Los bovinos con papilomas BPV positivos fueron sobre todo hembras (95,0%), animales mayores de 24 meses (50,0%), de raza Holstein (45,0%) y de fincas lecheras especializadas (75,0%) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los bovinos con papilomas PCR positivos a BPV

Género	Edad			Razas				Uso Productivo			Total, de animales (%)
	+ (%) <12 meses	+ (%) 12-24 meses	+ (%) >24 meses	+ (%) Holstein	+ (%) Jersey	+ (%) Girolado	+ (%) Otras	+ (%) Leche	+ (%) Came	+ (%) Doble propósito	
Hembras	11 (18,3)	17 (28,3)	29 (48,3)	27 (45,0)	8 (13,3)	5 (8,3)	17 (28,3)	45 (75,0)	6 (10,0)	6 (10,0)	57 (95,0)
Macho	1 (1,7)	1 (1,7)	1 (1,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (5,0)	0 (0)	3 (5,0)	0 (0)	3 (5,0)
Total (%)	12 (20,0)	18 (30,0)	30 (50,0)	27 (45,0)	8 (13,3)	5 (8,3)	20 (33,3)	45 (75,0)	9 (15,0)	6 (10,0)	60 (100,0)

La mayoría de animales BPV positivos (31,6 %, 19/60) presentaron menos de 15 papilomas, un 26,7% (16/60) entre 15-30 papilomas, 20,0% de los animales (12/60) entre 30-45 papilomas y un 21,7% (13/60) más de 45 papilomas.

Los papilomas encontrados en los bovinos presentaron cuatro morfologías diferentes (Figura 1). De los 60 animales BPV positivos, 30 (50,0%) mostraron papilomas de tipo coliflor, 18 (30,0%) papilomas planos, 16 individuos (26,7%) papilomas pedunculados y 10

(16,7%) papilomas atípicos. En 47 (79,4%) animales se encontró solamente un tipo de papiloma, 11 (17,5%) presentaron dos tipos de papilomas, y dos animales (3,1%) tres tipos de papilomas en diferentes partes del cuerpo.

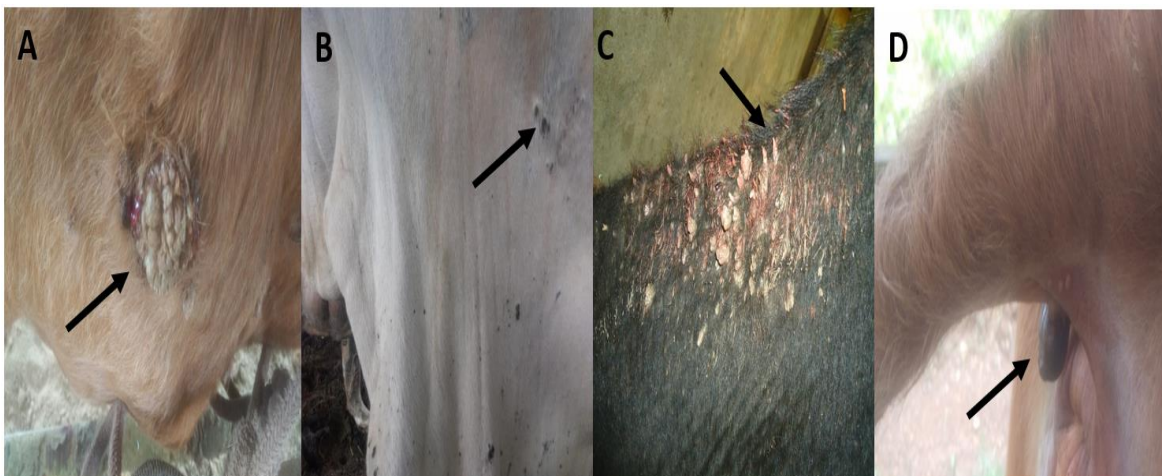


Figura 1. Morfología de los papilomas encontrados en los bovinos de Costa Rica. A: Coliflor, B: Plano, C: Pedunculado, D: Atípico

En 90 (90,9%) del total de 99 papilomas recolectados en los bovinos se pudo detectar la presencia de BPV mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación) (Cuadro 2). La mayoría de papilomas BPV fueron de morfología tipo coliflor (46,7%) y la minoría de tipo atípico (12,2%) (Cuadro 2). La mayoría de los papilomas BPV positivos provenían de hembras (96,7%). En la ubre se recolectó la mayor cantidad de papilomas positivos (31,1%), seguido de papilomas ubicados en la cabeza (21,1%), cuello (21,1%) y vientre (12,1%) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Morfología de los papilomas BPV positivos recolectados de bovinos, según género y ubicación anatómica en el animal.

Género	Morfología de Papilomas				Total (%)
	Coliflor (%)	Plano (%)	Pedunculado (%)	Atípico (%)	
Hembras	42 (46,7)	18 (20,0)	17 (18,9)	10 (11,1)	87 (96,7)
Machos	0 (0)	1 (1,1)	1 (1,1)	1 (1,1)	3 (3,3)
Total (%)	42 (46,7)	19 (21,1)	18 (20,0)	11 (12,2)	90 (100,0)
Zona Anatómica					
Ubre	13 (14,4)	2 (2,2)	11 (12,2)	2 (2,2)	28 (31,1)
Cabeza	9 (10,0)	5 (5,5)	1 (1,1)	4 (4,4)	19 (21,1)
Cuello	9 (10,0)	6 (6,7)	3 (3,3)	1 (1,1)	19 (21,1)
Vientre	6 (6,7)	2 (2,2)	2 (2,2)	1 (1,1)	11 (12,2)
Cola	1 (1,1)	2 (2,2)	1 (1,1)	0 (0)	4 (4,4)
Costilla	2 (2,2)	1 (1,1)	0 (0)	0 (0)	3 (3,3)
Nalga	1 (1,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1,1)	2 (2,2)
Paleta	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0)	0 (0)	2 (2,2)
Cruz	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,1)	1 (1,1)
Garrón	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,1)	1 (1,1)
Total (%)	42 (46,7)	19 (21,1)	18 (20,0)	11 (12,2)	90 (100,0)

En un total de 30 papilomas se determinó el genotipo de BPV presente en la lesión, en ningún caso se determinó la presencia de dos genotipos en una lesión. En 13 papilomas tipo coliflor se detectó la presencia de cinco genotipos de papilomavirus (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10), en ocho papilomas planos se encontraron cuatro genotipos diferentes (BPV-1, BPV-4, BPV-6 y BPV-11), en seis papilomas pedunculados dos (BPV-2 y BPV-6) y en tres papilomas atípicos dos genotipos (BPV-2 y BPV-6). El BPV-6 se encontró presente en todas las formas de papiloma recolectados y fue el genotipo más frecuente (33,4%) (Cuadro 3).

En los papilomas de la ubre se determinó 4 genotipos de BPV (BPV-1, BPV-6, BPV-7 y BPV-10), mientras que, en los papilomas del cuello, la segunda zona más afectada por papilomas en bovinos, se determinó la presencia de tres genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2 y BPV-11), a nivel del vientre y en la cabeza se encontró 3 genotipos (BPV-1, BPV-2 y BPV 6) (Cuadro 3).

En bovinos de la raza Holstein fue en la que se encontró la mayor diversidad de genotipos de papilomavirus: BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7. En una vaca Simental de 3 años de edad, de una finca lechera especializada, se determinó la presencia de dos genotipos de


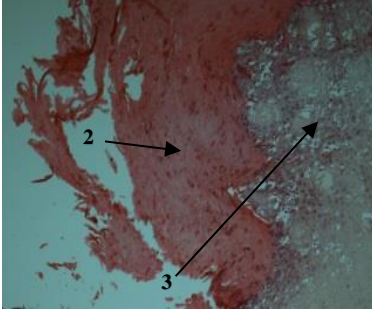
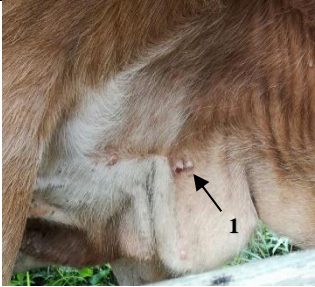
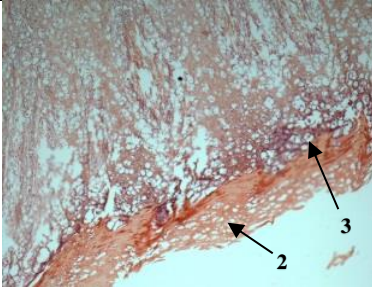

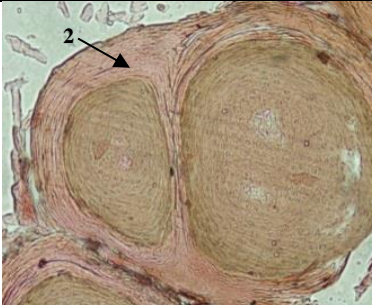

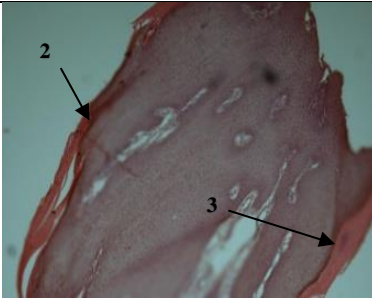
papilomavirus: el BPV-4 en un papiloma plano a nivel de costilla y el BPV-6 en un papiloma tipo coliflor en la ubre, también una novilla de raza Nelore de un año y medio de edad, de una finca especializada en carne, presentó BPV-1 en un papiloma en forma de coliflor en la ubre y BPV-2 de en un papiloma pedunculado en la cabeza.


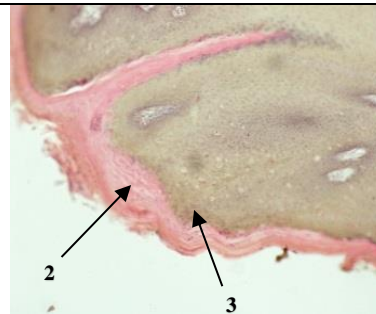

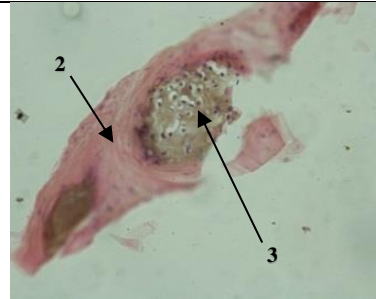

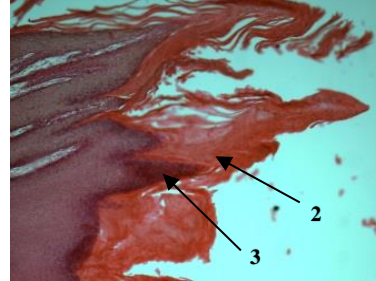
Cuadro 3. Relación de genotipos de BPV con morfología y ubicación anatómica de los papilomas en el animal

Papiloma	Genotipo							Total (%)
	BPV-1 (%)	BPV-2 (%)	BPV-4 (%)	BPV-6 (%)	BPV-7 (%)	BPV-10 (%)	BPV-11 (%)	
Forma								
Coliflor	6 (20,0)	2 (6,7)	----	3 (10,0)	1 (3,3)	1 (3,3)	----	13 (43,3)
Plano	2 (6,7)	----	1 (3,3)	4 (13,3)	----	----	1 (3,3)	8 (26,7)
Pedunculado	----	5 (16,7)	----	1 (3,3)	----	----	----	6 (20,0)
Atípico	----	1 (3,3)	----	2 (6,7)	----	----	----	3 (10,0)
Total	8 (26,7)	8 (26,7)	1 (3,3)	10 (33,4)	1 (3,3)	1 (3,3)	1 (3,3)	30 (100,0)
Zona Anatómica								
Ubre	3 (10,0)	----	----	5 (16,7)	1 (3,3)	1 (3,3)	----	10 (33,3)
Cuello	2 (6,7)	5 (16,7)	----	----	----	----	1 (3,3)	8 (26,7)
Vientre	1 (3,3)	1 (3,3)	----	3 (10,0)	----	----	----	5 (16,7)
Cabeza	1 (3,3)	2 (6,7)	----	1 (3,3)	----	----	----	4 (13,3)
Cola	----	----	----	1 (3,3)	----	----	----	1 (3,0)
Paleta	1 (3,3)	----	----	----	----	----	----	1 (3,0)
Costilla	----	----	1 (3,3)	----	----	----	----	1 (3,0)
Total (%)	8 (26,7)	8 (26,7)	1 (3,3)	10 (33,4)	1 (3,3)	1 (3,3)	1 (3,3)	30 (100,0)

Los cambios histopatológicos inducidos por los diferentes genotipos de BPV se muestran en el Cuadro 5. Todos los papilomas mostraron hiperqueratosis, y proliferación de células del estrato basal, espinoso y granular con núcleos ovals hiper cromáticos. Los papilomas ocasionados por los genotipos BPV-1, BPV-2 y BPV-10 presentaron además un alto grado de vacuolización, con presencia de células con degeneración balanoide, que mostraban el citoplasma claro y un núcleo con desplazamiento a la periferia. Los BPV-1 y BPV-2 se presentaron como papilomas cutáneos de Grupo 3 (papilomas cutáneos con fibroma subyacente en tejido conectivo), mientras que los BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 se clasificaron dentro del Grupo 1 (neoplasias en el epitelio plano estratificado).

Cuadro 5. Descripción macro y microscópica de papilomas según genotipos de BPV identificados en Costa Rica

Genotipo	Ejemplo de imagen macroscópica del papiloma	Histopatología (Imágenes a 10X)	Descripción	Número de muestras analizadas
BPV-1			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma tipo coliflor 2. Lesión con hiperqueratosis 3. Vacuolización a nivel del estrato espinoso con aparición de coilocitos 	4
BPV-2			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma tipo pedunculado 2. Lesión con hiperqueratosis 3. Alto grado de vacuolización a nivel del estrato espinoso 	6
BPV-4			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma de tipo plano 2. Lesión papilomatosa con muestras de hiperqueratosis ortoqueratósica 	1
BPV-6			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma tipo coliflor 2. Lesión con hiperqueratosis ortoqueratósica 3. Engrosamiento del estrato espinoso 	4

BPV-7			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma tipo coliflor 1 2. Lesión con hiperqueratosis ortoqueratósica 3. Engrosamiento del estrato espinoso
BPV-10			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma tipo coliflor 1 2. Lesión con hiperqueratosis 3. Vacuolización celular con aparición de coilositos
BPV-11			<ol style="list-style-type: none"> 1. Papiloma de tipo plano 1 2. Lesión con hiperqueratosis ortoqueratósica 3. Engrosamiento del estrato espinoso

4. Discusión

Los bovinos de los que se obtuvieron los papilomas BPV positivos fueron sobre todo hembras (95,0%), mayores de 24 meses (50,0%), de raza Holstein (45,0%) y de fincas lecheras especializadas de leche (75,0%), probablemente, porque este sector productivo es el más preocupado en Costa Rica por la presencia de papilomas en sus vacas, ya que estos interfieren con el ordeño ocasionando bajas en el rendimiento productivo (Hamad et al., 2016). La mayoría de animales con papilomas tenían más de dos años de edad, lo cual no concuerda con un estudio realizado en Colombia por Cardona-Álvarez et al. (2018), que determinó una mayor afectación de animales machos, de edad joven, no determinándose en ese estudio el uso productivo de los bovinos. Sin embargo, es probable que esto se deba, a que los dos estudios, el de Colombia y el nuestro, fueron estudios descriptivos no probabilísticos, y posiblemente con animales de diferentes usos productivos.

La mayor cantidad de animales afectados presentó de 1 a 15 papilomas, mientras que en el estudio de Cardona-Álvarez et al. (2018), determinó una mayor afectación de los animales (más de 15 papilomas), sin embargo, estas diferencias se pueden deber a que los dos estudios fueron descriptivos y no probabilísticos analizando un número limitado de animales.

La mayor cantidad de papilomas se encontró en las ubres (31,3%) de las vacas, lo que contrasta con otros estudios, en donde se encontraron sobre todo en el cuello y cabeza (en rangos de 19,6% a 41,7%) o en el resto del cuerpo (59,0%), sin embargo, no mencionaron papilomas en la ubre (Violet et al., 2017; Cardona-Álvarez et al., 2018). Otra vez, se hipotetiza, que las diferencias en los resultados se puedan deber a diferencias en el grupo de bovinos analizados, que en el caso de la presente investigación fueron sobre todo vacas de lecherías especializadas, mientras que en los estudios encontrados en Colombia no se menciona el tipo de bovinos analizados (Violet et al., 2017; Cardona-Álvarez et al., 2018).

La mayoría de los animales afectados por papilomas presentaron un único tipo de papiloma (79,4%), y una minoría hasta tres tipos en un mismo animal (3,1%), lo cual no se había estudiado ni reportado con anterioridad. En dos animales con dos tipos de papilomas, fue donde se detectó la presencia de dos genotipos distintos, un animal con un papiloma plano (BPV-4) y un papiloma tipo coliflor (BPV-6), y otro animal con un papiloma tipo coliflor (BPV-1) junto a pedunculado (BPV-2), siendo esta la primera vez que se describe la coexistencia de estos genotipos relacionándolos con su morfología.

Los papilomas de tipo coliflor fue la morfología de papiloma más frecuentemente encontrada en los bovinos analizados en el presente trabajo, estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Batista et al. (2013), y se puede deber a que este tipo de papiloma se encuentra asociado a cinco genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10). La presencia de cuatro de estos genotipos en papilomas tipo coliflor ya había sido reportada previamente por Pompeo et al. (2009) y Batista et al. (2013), en el presente trabajo se reporta por primera vez la presencia de BPV-7 en lesiones de tipo coliflor. Además, se reporta por primera vez el hallazgo del genotipo BPV-11 en papilomas con morfología plana y el BPV-6 en papilomas con morfología atípica. Los genotipos BPV-4, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 se determinaron cada uno solamente en un papiloma, por eso se relacionaron en el presente trabajo con un único tipo de morfología, y no es posible descartar que pueden estar presentes en otros tipos de papilomas como lo reportaron Pompeo et al. (2009), Batista et al. (2013) y

Tozato et al., (2013). Para el caso de BPV-11, es la primera vez que se asocia a una morfología específica. En contraste, los genotipos BPV-1, BPV-2 y BPV-6 fueron los más frecuentemente diagnosticados en el presente estudio (87% de los casos), y se detectaron en dos, tres y cuatro diferentes morfologías de papilomas, respectivamente, lo que concuerda con lo descrito por Claus et al., (2007), Pompeo et al. (2009), Batista et al. (2013) y Tozato et al., (2013). Según, Pompeo et al. (2009) y Batista et al. (2013), quienes reportaron en Brasil la presencia de BPV-2 en papilomas con morfología plana, permiten aunados a nuestros resultados, concluir, que los genotipos BPV-2 y BPV-6 pueden estar presentes y ocasionar cualquier tipo de papiloma (coliflor, plano, pedunculado o atípico). Por consiguiente, el diagnóstico del genotipo de BPV asociado al papiloma es posible realizarlo únicamente mediante diagnóstico molecular (Silva et al., 2010). Nuestros resultados coinciden con lo presentado por Batista et al. (2013), que tampoco lograron establecer relación entre genotipo y morfología, por lo que se propone realizar estudios sistemáticos para cada genotipo de BPV.

Los BPV-1, BPV-6 y BPV-10 se encontraron sobre todo en la ubre, mientras el BPV-2 se presentó principalmente en el cuello de los animales, lo cual se ha descrito con anterioridad por Borzacchiello y Roperto (2008). El BPV-4 se presentó a nivel epitelial, en las costillas del animal, y no a nivel del tracto gastrointestinal, lo cual también coincide con la literatura (Carvalho et al., 2012). En el caso de BPV-7 y BPV-11 no existen reportes de zonas preferentes, y en nuestro caso se presentaron en la ubre y el cuello. respectivamente.

Todos los papilomas analizados, independientemente del genotipo de BPV encontrado, mostraron neoplasia de células planas, hiperqueratosis y engrosamiento del estrato espinoso, lo que concuerda con Rodríguez et al. (2015). Los papilomas originados por genotipos BPV-1, BPV-2 y BPV-10 presentaron una amplia degeneración (vacuolización) del tejido, lo cual también ha sido descrito ampliamente (Carvalho, et al., 2013; Batista, et al, 2013; Rodríguez, et al., 2015; Cardona-Álvarez, et al., 2018), concluyendo, que estos hallazgos no posibilitan establecer el genotipo de BPV presente en la lesión.

Los BPV-1 y BPV-2 se presentaron como papilomas cutáneos de Grupo 3, lo que coincide con la clasificación realizada por Murphy et al. (1999), mientras que los BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 se clasificaron dentro del Grupo 1, clasificándose por primera vez BPV-4, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 dentro de este grupo.

Existen pocos estudios a nivel mundial, que asocian las morfologías de los papilomas con la ubicación, genotipos de BPV, así como con hallazgos patológicos e histopatológicos. Los pocos trabajos realizados cuentan con la limitante de haber analizado muestras limitadas. Aunque este trabajo también analizó una muestra limitada, representa el primer reporte a nivel nacional y de Centro América, que describe a los animales afectados por papilomas en el país, y relaciona las morfologías de los diferentes papilomas BPV positivos con género, ubicación corporal, genotipos de BPV, así como con hallazgos patológicos e histopatológicos, lo que lo hace un estudio valioso. En vista de la dificultad de diagnosticar un genotipo de BPV mediante morfología e histopatología del papiloma se recomienda utilizar técnicas moleculares para el diagnóstico de esta virosis y realizar estudios que investiguen el rol de la inmunidad del huésped sobre los genotipos de BPV y la morfología e histopatología de los papilomas.

5. Conclusiones

- El mayor número de animales con papilomas se encontró en fincas lecheras especializadas (74,6%), afectando sobre todo a hembras (95,2%), de raza Holstein (42,8%), y con edades superiores a los 24 meses (50,7%).
- La mayoría de los animales afectados presentaron entre 1 a 15 papilomas (31,6%), un único tipo de papiloma (79,4%), siendo el de tipo coliflor el más común (46,7%), y la ubre la localización más frecuente (31,1%).
- No fue posible asociar un genotipo de BPV a una morfología de papiloma, ya que BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10 se asociaron con papilomas tipo coliflor, BPV-11 con papilomas de tipo plano, BPV-6 con los atípicos, mientras que BPV-1, BPV-2 y BPV-6 se asociaron con papilomas de diferentes morfologías (coliflor, plano, pedunculado o atípico).
- No fue posible relacionar los hallazgos histopatológicos a un genotipo de BPV, los genotipos detectados en Costa Rica mostraron todos hiperqueratosis.

6. Recomendaciones

- Realizar estudios sistemáticos de cada genotipo de BPV para determinar la morfología de los papilomas e histopatología,
- Estudiar el posible rol de la inmunidad del huésped sobre los genotipos de BPV y la morfología e histopatología de los papilomas.

7. Referencias bibliográficas

Batista, M., Silva, M., Pontes, N., Reis, M., Corteggio, A., Castro, R., Borzacchiello, G., Balbino, V. y Freitas, A. (2013). Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Veterinary Journal*. 197:368-373.

Borzacchiello, G. y Roperto, F. (2008). Bovine papillomavirus, papilomas and cancer in cattle. *Veterinary Research*. 39:45.

Cardona-Álvarez, J., Montes-Vergara, D. y Álvarez-Peñate, J. (2018). Caracterización clínica, histopatológica e histoquímica del papiloma cutáneo en bovinos (*Bos Taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 21(1): 137-146.

Carvalho, C., Batista, M., Silva, M., Balbino, V. y Freitas, A. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV-11 subtype in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59(5): 441-447.

Carvalho, R., Sakata, S., Giovanni, D., Brandão, P., Richtzenhain, L., Pozzi, C., Arcaro, J., Miranda, M., Mazzuchelli-de-Souza, J., Melo, T., Comecale, G., Assaf, S., Beçak, W. y Stocco, R. (2013). Bovine Papillomavirus in Brazil: Detection of Coinfection of Unusual Types by a PCR-RFLP Method. *Biomed Research International*. 2013:270898.

Claus, M., Lunardi, M., Alfieri, A., Sartori, D., Fungaro, M. y Alfieri, A. (2009). Identification of the recently described new type of bovine papillomavirus (BPV-8) in a Brazilian beef cattle herd. *Pesq Vet Bras*. 29(1): 25-28.

- Hamad, M., Al-Shammari, A., Odisho, S. y Yaseen, N. (2016). Molecular and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus type 1: First report in Iraqi cattle. *Adv Virol.* 1-7.
- Lillie, R.D. y Fullmer, H.M. (1976). *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* Fourth Edition ed. NY: McGraw-Hill.
- Murphy, F., Gibbs, P., Horzinek, M. y Studdert, M. (1999). *Veterinary Virology.* Oxford: Elsevier.
- Nair, L. y Campo, M.S. (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Journal compilation.* 19(5): 243-254.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I. y Shirasawa, H. (2004) Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papilomas and healthy teat skin. *85:* 2191-2197.
- Pompeo M., Lunardi C., Alfieri A., Arellano R., Sartori O., Pelegrinelli M. y Fernandes, A. (2009). Multiple bovine papillomavirus infection associated with cutaneous papillomatosis in brazilian cattle herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 52: 93-98.
- Rodríguez, R., Cordero, L., Gutiérrez, E., Castro, M., Chi, M., Tzab, R. y Castro, J. (2015). Papilomatosis bovina en el trópico de mexicano: presentación clínica y control. *Bioagrobiencias,* 8(1): 45-52
- Roperto, S., Munday, J.S., Corrado, F., Gorla, M., Roperto, F. (2016). Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Vet. Microbiol.* 190:1-4.
- Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Handisurya, A., Christensen, N., Reininger, B., Brandr, S. y Kirnbauer, R. (2009). Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. *Virology.* 393(1): 1-6.
- Silva, M., Sperotto, M., Leite, B., Dias, F., Weiblem, R. y Furtado, E. (2010). Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 22: 603-606.

Tozato, C., Lunardi, M., Alfieri, A., Otonel, R., Di Santis, G., de Alcântara, B., Headley, S. y Alfieri, A. (2013). Teat papillomatosis associated with bovine papillomavirus types 6, 7, 9, and 10 in dairy cattle from Brazil. *Braz J Microb.* 44(3): 905-909.

Vázquez, R., Duch, E., Gómez, D., Duato, G. y Benítez, R. (2012). Papilomatosis Bovina: Epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 6(2): 19-57.

Violet, L., Montes, D. y Cardona, J. (2017) Frecuencia de papilomatosis en bovinos (*Bos Taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Rev Colombiana Cienc Anim.* 9(2):294-300.

Wellenberg, G., van der Poel, W. y Van Oirschot, J. (2002). Viral infection and bovine mastitis: A review. *Veterinary Microbiology.* 88(1): 27-45.

DISCUSIÓN GENERAL

En la primera parte de esta investigación se logró establecer los genotipos de papilomavirus bovino (BPV) presentes en ganado bovino en diferentes zonas del país mediante técnicas moleculares. Se determinó por primera vez en nuestro país y en la región centroamericana la presencia de siete genotipos de papilomavirus bovino en lesiones de bovinos mediante técnicas moleculares: BPV-1, BPV-2, pertenecientes al género Deltapapillomavirus, BPV-4, BPV-6, BPV-10, BPV-11, pertenecientes al género Xipapillomavirus y BPV-7, aún no clasificado en género alguno (Lunardi et al., 2013).

La mayoría de lesiones papilomatosas (91%) resultaron PCR positivas, confirmándose la presencia del virus en los papilomas. Los resultados negativos en un 9% de los papilomas se pueden atribuir a la sensibilidad de la técnica utilizada, lo que concuerda con reportes de sensibilidades de 54-100% para el PCR que utiliza los iniciadores FAP59/FAP64, mismos que se utilizaron en el presente trabajo (Ogawa et al., 2004; Silva et al., 2013).

La provincia de Alajuela fue la que aportó mayor cantidad de animales para el estudio, mostrando la preocupación de los propietarios por el problema en la zona, luego de llevar a cabo un muestreo utilizando el método de bola de nieve. En la provincia de Alajuela se encontró seis de los siete genotipos aquí reportados, esto puede ser consecuencia de que fue la zona de la que se obtuvo la mayoría de las muestras, además de que es una zona en donde se concentra gran cantidad de ganado lechero en el país, y es en ese tipo de ganado que generalmente se reporta la presencia de papilomas en las ubres (Vasquez et al., 2012; Módolo et al., 2017; Violet et al., 2017). El BPV genotipo 1 se encontró en todas las cinco provincias de donde se obtuvo muestras, lo cual nos indica una amplia distribución a nivel del territorio costarricense, seguido del BPV-2 que se encontró en cuatro provincias, mientras el BPV genotipo 6 fue el que se detectó más frecuentemente en las muestras analizadas (33,3%), pero únicamente en las provincias de donde se obtuvo la mayor cantidad de muestras, en Alajuela (43%) y en Guanacaste (28%), lo cual lo circunscribe a las zonas donde se da mayor actividad ganadera en Costa Rica. El BPV-1 y BPV-2 se mencionan en la literatura mundial como los genotipos más prevalentes (Vásquez et al., 2012).

De las fincas visitadas, solo en dos de ellas fue posible encontrar la presencia de 2 genotipos distintos infectando un mismo animal. El hallazgo de dos tipos de papilomas

diferentes en un bovino, ocasionado por dos genotipos diferentes de BPV concuerda con lo reportado por Pompeo et al. (2009) y Carvalho et al. (2012), sin embargo, es la primera vez que se reporta la presencia de BPV-4 y BPV-6 en un mismo bovino a nivel mundial (Pompeo et al., 2009; Carvalho et al., 2013).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la importancia de establecer los genotipos presentes en una región determinada, si se desea desarrollar o introducir una vacuna de BPV, ya que vacunas contra un único tipo de BPV no resultarían eficaces y llevarían a un alto porcentaje de fallos terapéuticos (Vázquez et al., 2012).

Los resultados obtenidos con las enzimas EcoRI y BamHI coinciden con los reportes de Lancaster y Olson (1982) en el caso de BPV-1, BPV-2 y BPV-4, sin embargo, los resultados obtenidos con las enzimas EcoRI y BamHI para BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11, y los resultados de la enzima SacI no habían sido reportados previamente. Los patrones de cortes obtenidos con las tres enzimas permitieron una diferenciación de los genotipos BPV-1, BPV-2, BPV-4, y BPV-7, habiendo además generado información nueva y complementaria. Otra ventaja de esta técnica es la obtención de cortes de alto peso molecular, que se pueden clonar, para determinar así las secuencias nucleotídicas y obtener información sobre los genomas de los diferentes genotipos de BPV (Ogawa et al., 2007; Lunardi et al., 2013).

Debido a que el BPV-6, BPV-10 y BPV-11 no fueron digeridos por las enzimas de restricción utilizadas, se confirma el uso limitado de estas enzimas para la identificación de estos genotipos de BPV (Davis et al., 1986; Brownlee et al., 2015). Se recomienda utilizar otras enzimas para establecer patrones de corte para los genotipos BPV-6, BPV-10 y BPV-11 y así poder diferenciarlos entre sí y obtener cortes de alto peso molecular para clonar.

Este representa el primer estudio en Costa Rica, que establece los genotipos de BPV presentes en el país. Se recomiendan realizar estudios más amplios, para determinar los genotipos más prevalentes en nuestro país, y comunicar los resultados obtenidos a las autoridades y productores.

En la segunda parte del estudio se realizó la caracterización de los animales afectados por papilomas y la caracterización de estas lesiones, relacionando además los tipos de papilomas con genotipos de BPV, así como con hallazgos patológicos e histopatológicos. Los bovinos de los que se obtuvieron los papilomas positivos fueron sobre todo hembras (95,0%), mayores de 24 meses (50,0%), de raza Holstein (45,0%) y de fincas lecheras especializadas

de leche (75,0%), probablemente, porque este sector productivo es el más preocupado en Costa Rica por la presencia de papilomas en sus vacas, ya que estos interfieren con el ordeño ocasionando bajas en el rendimiento productivo (Hamad et al., 2016). La mayoría de animales con papilomas tenían más de dos años de edad, lo cual no concuerda con un estudio realizado en Colombia por Cardona-Álvarez et al. (2018), que determinó una mayor afectación de animales machos, de edad joven, no determinándose en ese estudio el uso productivo de los bovinos. Sin embargo, es probable que esto se deba, a que los dos estudios, el de Colombia y el nuestro, fueron estudios descriptivos no probabilísticos, y posiblemente con animales de diferentes usos productivos.

La mayor cantidad de animales afectados presentó de 1 a 15 papilomas, mientras que en el estudio de Cardona-Álvarez et al. (2018), se determinó una mayor afectación de los animales, sin embargo, los dos estudios fueron descriptivos y no probabilísticos analizando un número limitado de animales.

En el presente trabajo se encontró la mayor cantidad de papilomas en las ubres (31,3%) de las vacas, lo que contrasta con otros estudios, en donde se encontraron sobre todo en el cuello y cabeza (19,6% - 41,7%) o en el resto del cuerpo (59,0%), sin embargo, no se mencionaron papilomas en la ubre (Violet et al., 2017; Cardona-Álvarez et al., 2018). Otra vez, se hipotetiza, que las diferencias en los resultados se puedan deber a diferencias en el grupo de bovinos analizados, que en el caso de la presente investigación fueron sobre todo vacas de lecherías especializadas, mientras que en los estudios encontrados en Colombia no se menciona el tipo de bovinos analizados (Violet et al., 2017; Cardona-Álvarez et al., 2018).

La mayoría de los animales afectados por papilomas presentaron un único tipo de papiloma (79,4%), y una minoría hasta tres tipos en un mismo animal (3,1%), lo cual no se había estudiado ni reportado con anterioridad. En dos animales con dos tipos de papilomas, fue donde se detectó la presencia de dos genotipos distintos coexistiendo, en este caso plano (BPV-4) y coliflor (BPV-6), y coliflor (BPV-1) junto a pedunculado (BPV-2), siendo esta la primera vez que se describe la coexistencia de estos genotipos relacionándolos con su morfología.

Los papilomas de tipo coliflor fue la morfología de papiloma más frecuentemente encontrada en los bovinos analizados en el presente trabajo, estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Batista et al. (2013), y se puede deber a que este tipo de papiloma se

encuentra asociado a cinco genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10). La presencia de cuatro de estos genotipos ya había sido reportada previamente por Pompeo et al. (2009) y Batista et al. (2013), en el presente trabajo se reporta por primera vez la presencia de BPV-7 en lesiones de tipo coliflor. También, se reporta por primera vez el hallazgo del genotipo BPV-11 en papilomas con morfología plana y el BPV-6 en papilomas con morfología atípica. Los genotipos BPV-4, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 se determinaron cada uno solamente en un papiloma, por eso se relacionaron en el presente trabajo con un único tipo de morfología, y no es posible descartar que pueden estar presentes en otros tipos de papilomas como lo reportan Pompeo et al. (2009), Batista et al. (2013) y Tozato et al., (2013). Para el caso de BPV-11 es la primera vez que se asocia a una morfología específica. En contraste, los genotipos BPV-1, BPV-2 y BPV-6 fueron los más frecuentemente diagnosticados en el presente estudio (87% de los casos), y se detectaron en dos, tres y cuatro diferentes morfologías de papilomas, respectivamente, lo que concuerda con lo descrito por Claus et al., (2007), Pompeo et al. (2009), Batista et al. (2013) y Tozato et al., (2013). Según, Pompeo et al. (2009) y Batista et al. (2013), quienes reportan en Brasil la presencia de BPV-2 en papilomas con morfología plana, permiten aunados a nuestros resultados, concluir, que los genotipos BPV-2 y BPV-6 pueden estar presentes, y ocasionar cualquier tipo de papiloma (coliflor, plano, pedunculado o atípico). Por consiguiente, el diagnóstico del genotipo de BPV asociado al papiloma es posible realizarlo únicamente mediante diagnóstico molecular (Silva et al., 2010). Nuestros resultados coinciden con lo presentado por Batista et al. (2013), que tampoco lograron establecer relación entre genotipo y morfología, y quienes proponen realizar estudios sistemáticos para cada genotipo de BPV.

Los BPV-1, BPV-6 y BPV-10 se presentaron en la ubre de forma preferente, así como el BPV-2 se presentó principalmente en el cuello de los animales, lo cual se ha descrito con anterioridad por Borzacchiello y Roperto (2008). El BPV-4 se presentó a nivel epitelial, en las costillas del animal, no a nivel del tracto gastrointestinal lo cual coincide con la literatura (Carvalho et al., 2012). En el caso de del BPV-7 y BPV-11 no existen reportes de zonas preferentes, y en nuestro caso se presentaron en la ubre y el cuello respectivamente.

Todos los papilomas analizados, independientemente del genotipo de BPV encontrado, mostraron neoplasia de células planas, hiperqueratosis y engrosamiento del estrato espinoso lo que concuerda con Rodríguez et al. (2015). Los papilomas originados por genotipos BPV-

1, BPV-2 y BPV-10 presentaron una amplia degeneración (vacuolización) del tejido, lo cual también ha sido descrito ampliamente (Carvalho, et al., 2013; Batista, et al, 2013; Rodríguez, et al., 2015; Cardona-Álvarez, et al., 2018), y no posibilita su utilización para diferenciar entre genotipos de BPV.

Los BPV-1 y BPV-2 se presentaron como papilomas cutáneos de Grupo 3, lo que coincide con la clasificación realizada por Murphy et al. (1999), mientras que los BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 se clasificaron dentro del Grupo 1, clasificándose por primera vez BPV-4, BPV-7, BPV-10 y BPV-11 dentro de este grupo.

Existen pocos estudios a nivel mundial, que asocian las morfologías de los papilomas con la ubicación, genotipos de BPV, así como con hallazgos patológicos e histopatológicos. Los pocos trabajos realizados cuentan con la limitante de haber analizado muestras limitadas. Aunque este trabajo también analizó una muestra limitada, representa el primer reporte a nivel nacional y de Centro América, que describe a los animales afectados por papilomas en el país, y relaciona las morfologías de los diferentes papilomas BPV positivos con género, ubicación corporal, genotipos de BPV, así como con hallazgos patológicos e histopatológico, lo que lo hace un estudio valioso. En vista de la dificultad de diagnosticar un genotipo de BPV mediante morfología e histopatología del papiloma se recomienda implementar técnicas moleculares para el diagnóstico de esta virosis y realizar estudios que investiguen el rol de la inmunidad del huésped sobre los genotipos de BPV y la morfología e histopatología de los papilomas

CONCLUSIONES GENERALES

- Se determinó por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la presencia de siete genotipos de BPV (BPV-1, BPV-2, BPV-4, BPV-6, BPV-7, BPV-10, BPV-11).
- El BPV genotipo 6 fue el que se detectó más frecuentemente en los papilomas analizados (33,3%), seguido del BPV-2 (26,7%) y BPV-1 (26,7%).
- El genotipo BPV-1 fue el que se encontró más ampliamente distribuido en el país, seguido por BPV-2 (cinco y cuatro provincias, respectivamente).
- En dos animales se determinó coinfección con dos genotipos de BPV, en un caso BPV-1 y BPV-2, y en otro caso BPV-4 y BPV-6.
- El método de digestión enzimática con las enzimas EcoRI, BamHI y SacI permitieron la diferenciación de los genotipos BPV-1, BPV-2, BPV-4, y BPV-7, pero no de los demás genotipos (BPV-6, BPV-10 y BPV-11).
- El mayor número de animales con papilomas se encontró en fincas lecheras especializadas (74,6%), afectando sobre todo a hembras (95,2%), de raza Holstein (42,8%), y con edades superiores a los 24 meses (50,7%).
- La mayoría de animales afectados presentaron entre 1 a 15 papilomas (31,6%), un único tipo de papiloma (79,4%), siendo el de tipo coliflor el más común (46,7%), y la ubre la localización más frecuente (31,1%).
- No fue posible asociar un genotipo de BPV a una morfología de papiloma, ya que BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 y BPV-10 se asociaron con papilomas tipo coliflor, BPV-11 con papilomas de tipo plano, BPV-6 con los atípicos, mientras que BPV-1, BPV-2 y BPV-6 se asociaron con papilomas de diferentes morfologías (coliflor, plano, pedunculado o atípico).
- No fue posible relacionar los hallazgos histopatológicos a un genotipo de BPV, los genotipos detectados en Costa Rica mostraron todos hiperqueratosis.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Continuar con el diagnóstico molecular de papilomas para detectar genotipos presentes en el país y la región centroamericana.
- Realizar estudios sistemáticos para determinar el genotipo o los genotipos más prevalentes en nuestro país.
- Comunicar a las autoridades y productores los resultados obtenidos.
- Realizar estudios sistemáticos para cada genotipo de BPV para determinar morfología de los papilomas e histopatología
- Estudiar el posible rol de la inmunidad del huésped sobre los genotipos de BPV y la morfología e histopatología de los papilomas

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado utilizado para los propietarios de los bovinos que participaron en el estudio

UNIVERSIDAD NACIONAL
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA POBLACIONAL
Teléfonos:(506) 2562-4508 / 2562- 4553 Telefax: (506) 2237-5229

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Caracterización molecular, macroscópica y microscópica de genotipos de papilomavirus bovino 1 y 2 en Costa Rica

Proyecto de Tesis de Maestría

Nombre del Investigador Principal: Ramsés Alfaro Mora

Nombre del participante: _____

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Este estudio es realizado por el Dr. Ramsés Alfaro Mora, estudiante de la maestría en Enfermedades Tropicales, de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. El objetivo de este estudio es asociar los tipos de papilomavirus bovino con cambios macroscópicos, histopatológicos y usos productivos de los bovinos. Los papilomavirus (gabarros o mezquinos) bovinos ocasionan lesiones a nivel de la piel o mucosas, siendo la aparición de papilomas a nivel de las ubres en las vacas una de las más problemáticas, ya que dificultan el ordeño de estos animales, además, la aparición de papilomas disminuye el valor de la vaca en el mercado por su apariencia. En casos donde las lesiones se encuentran a nivel oral puede dificultarse la alimentación. Se desconocen los tipos de papilomas presentes en Costa Rica, y tampoco se han relacionado estos con las lesiones descritas a nivel macroscópico y microscópico. Conocer la presencia de los tipos de papilomas presentes en el país es importante, para un mejor abordaje de la infección.

B. ¿QUÉ SE HARÁ?:

Si usted acepta participar voluntariamente en este estudio, se le realizará una visita en donde se harán las siguientes actividades:

- 1- Se trabajará con el o los animales que presenten papilomas. Se tomarán fotografías de los papilomas, posteriormente se limpiarán estos con alcohol yodado

al 2% y se cortará un pedazo de 1-2cm del papiloma. Finalmente se aplicará un antibiótico en spray en el lugar donde se cortó un pedazo del papiloma para evitar algún tipo de infección posterior a la recolecta. No se tomarán más de 3 muestras de papilomas por animal, ni papilomas de más de 3 animales por finca.

2- Se completará un formulario en el cual se solicitará el nombre del dueño de la finca, el nombre de la finca, la ubicación de la finca (distrito, cantón, provincia), se ubicará la finca con GPS y se anotará edad, sexo, raza del animal o de los animales del o de los que se obtuvo la(s) muestra(s) de papiloma.

3- Las muestras se trasladarán al Laboratorio de Entomología de la Universidad Nacional de Costa Rica, donde se realizará el diagnóstico mediante técnicas moleculares y microscópicas

4- La información que cada participante aporte al formulario solo la manejará el investigador del proyecto y la coordinadora del Laboratorio. A cada participante se le dará un reporte con los resultados de animal, y el investigador generará una copia de los mismos para el análisis estadístico de los datos. Una vez concluida la investigación, los formularios, los resultados de laboratorio y los consentimientos informados se digitalizarán con el fin de contar con un expediente para cada participante. Dichos datos se guardarán en un disco compacto, que estará en poder del investigador del proyecto, por tiempo indefinido.

C. **RIESGOS:**

Su participación en esta investigación no representa **ningún riesgo** para la salud de su animal. Excepto por la molestia general de la biopsia cutánea para obtener la muestra, es posible que el animal se mueva, y pueda existir sangrado en la zona de la extracción de la muestra. Se usará **equipo estéril y desechable** para no poner en riesgo la salud de su o sus vacas. Si durante el procedimiento usted considera que su animal está siendo sujeto de algún grado de sufrimiento más allá de lo que usted considera permisible en él, puede detener el procedimiento.

¿Autoriza Ud. a los investigadores a realizar lo que se describe bajo el punto B?

Sí _____ No _____

D. **BENEFICIOS:**

Como resultado de su participación en este estudio se determinará si su animal se encuentra infectado con papilomavirus bovino. También conocerá el tipo de virus en caso de que este se encuentre presente. Además, recibirá información sobre la enfermedad estudiada, su modo de transmisión, de los servicios de preparación de una autovacuna que se realiza en la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, y en caso de que deseara, se le produciría gratuitamente la autovacuna.

- E.** Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con el investigador sobre este estudio y el debe haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamando al estudiante de posgrado Dr. Ramsés Alfaro Mora al teléfono 8825-1476 o a la coordinadora principal, Dra. Gaby Dolz al teléfono de la oficina 2562-4553 o al celular 8860-7865.
- F.** Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.
- G.** Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiere.
- H.** Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica, pero de una manera anónima.
- I.** No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

Nombre, cédula y firma del sujeto
fecha

Nombre, cédula y firma del testigo
fecha

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento
fecha

Anexo 2. Ficha de recolección de datos de los animales que participaron en el estudio



Maestría en Enfermedades Tropicales

Proyecto: Caracterización molecular, macroscópica y microscópica de genotipos de papilomavirus bovino presentes en Costa Rica

Recolecta de muestras

Se definirá como muestra toda lesión que presente una morfología distinta o se ubique en zonas anatómicas distintas, ya sea que estas se encuentren en un mismo sujeto o en diferentes sujetos. La lesión será fotografiada y posteriormente sustraída (Figura 1). Se recolectará un máximo de 3 muestras por animal, y un máximo de 3 animales por finca.

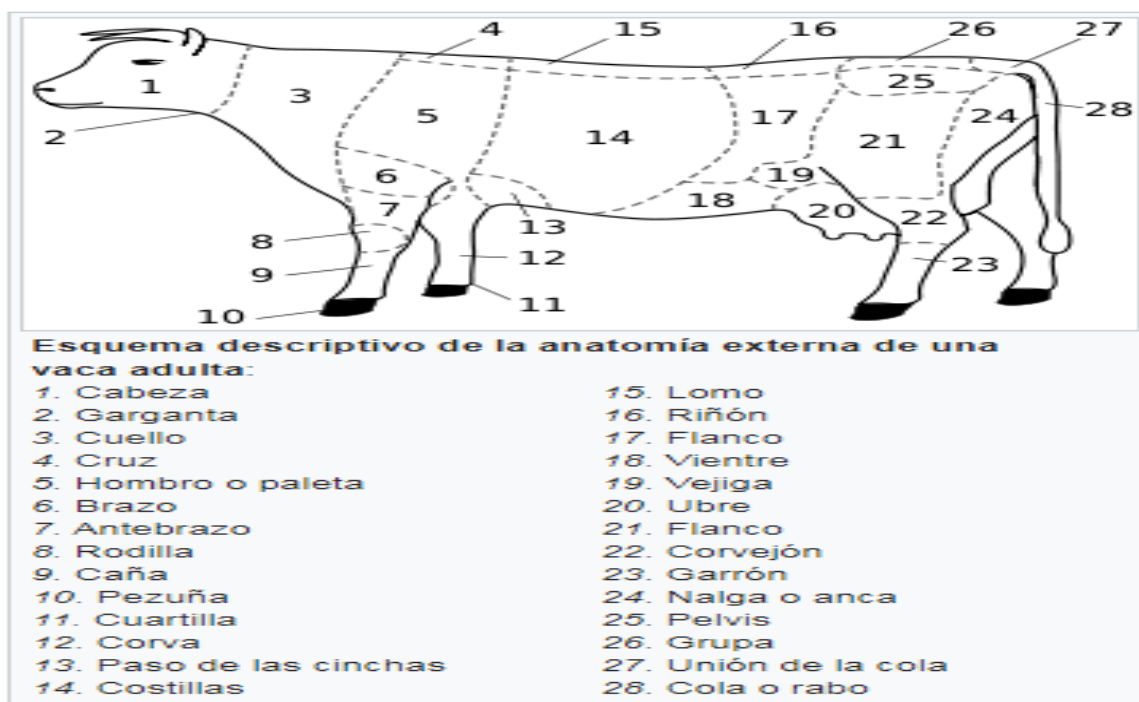


Figura 1. Código numérico para zonas anatómicas externas donde se ubiquen los papilomas

Conservación y transporte de la muestra hasta el laboratorio

Para la toma y conservación de la muestra se utilizarán tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se tomará cada una por triplicado y se llevará a cabo la fijación del tejido en formol al 10% (almacenar a temperatura ambiente), alcohol al 70% (congelar), y una de ellas simplemente se congelará al llegar al laboratorio sin pasar por un proceso de fijación a través de solventes.

Las muestras se trasladarán a una temperatura menor a los 8° C (usar hielera con gel refrigerante) por un máximo de 24h. Una vez en el laboratorio serán almacenadas a temperatura de congelación aquellas muestras fijadas en alcohol y las que no poseen un solvente como fijador.

Base de Datos

Paralelo a la toma de la muestra se elaborará una base de datos donde se incluirán variables como: ubicación geográfica de la finca donde procede el animal con papiloma, propietario, edad del animal, sexo, raza, ubicación de la lesión en el cuerpo del bovino, forma de la lesión, uso productivo del animal, su número de identificación y número de papilomas con distinta morfología (A, B, C, etc.) y número de papilomas con misma morfología (Cuadros 1 y 2).

La forma de la lesión se registrará mediante el uso de fotografía con una cámara capaz de lograr una resolución de no menor a 8 megapíxeles.

Cuadro 1. Código para identificación del número de papilomas en todo el animal

Morfología	Cantidad	Código numérico
A	Menos de 15	A1
	Entre 15-30	A2
	Entre 30-45	A3
	Más de 45	A4
B	Menos de 15	B1
	Entre 15-30	B2
	Entre 30-45	B3
	Más de 45	B4
C	Menos de 15	C1
	Entre 15-30	C2
	Entre 30-45	C3
	Más de 45	C4

A= Pedunculado (Tipo grano de arroz), B= Tipo Coliflor, C= Atípico, D= Plano

Cuadro 2. Registro de muestras

Número identificación	Propietario	Provincia	Cantón	Distrito	Ubicación GPS (Latitud/Longitud)	Edad	Sexo	Raza	Ubicación de la lesión (según código)	Uso productivo	Morfología (según código)	Número de papilomas (según código)	Fotografía (Código asignado)	Fecha Recolección

Contacto. Dr. Ramsés Alfaro M.
Cel. (506) 8825-1476
ramsesalfaro@hotmail.com

