



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

TÍTULO:

Identificación y genotipificación de los tipos de virus de papiloma bovino en sangre periférica u orina de animales afectados por Hematuria vesical enzoótica bovina.

Tesis de Grado, previa a la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista.

AUTOR: Karina Fernanda Rodríguez Arias C.I. 0105841894

DIRECTOR:
Dr. Gonzalo Estuardo. López Crespo, Mg. Sc. C.I.0300721636

COODIRECTOR:
Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD C.I. 0151059417

CUENCA, ECUADOR

2017

RESUMEN

En el desarrollo de neoplasias malignas en la vejiga urinaria en bovinos se conjuntan dos factores, por un lado la intoxicación crónica con el Ptaquilósido presente en helechos del género *Pteridium* y la infección por Virus de papiloma bovino (BoPV). La presencia de la infección puede ser determinada con herramientas de biología molecular en muestras colectadas *post-mortem*. Por lo anterior, en este trabajo se pretendió identificar la presencia de BoPV en muestras de tejidos de vejiga urinaria, en sangre y orina para evaluar su uso como muestra clínica para el diagnóstico *ante-mortem*; para lo cual se analizaron muestras procedentes de bovinos con papilomatosis bovina asociada con hematuria vesical enzoótica bovina (HWEB), colectando para ello 132 muestras de orina, tejido vejiga urinaria y sangre de 53 animales, muestreados en los camales municipales de Azogues, Cuenca y Paute, utilizando PCR y RFLP como pruebas diagnósticas. Para Validar el ensayo de detección de BoPV se realizó un control de proceso para cada una de las muestras mencionadas, con lo que se pudo identificar 126 muestras válidas. Únicamente se pudo identificar la presencia de una mezcla de BoPV tipo 3 y 6 en una de las muestras de sangre colectadas, mientras que en las muestras de orina y vejiga no se pudo determinar su presencia; los BoPV identificados concuerda con los tipos de BoPV ya descritos en sangre. Por los limitados resultados del presente trabajo hace que se requiera profundizar el estudio, orientándolo hacia la identificación de material genético de BoPV en muestras de lesiones neoplásicas presente en vejiga urinaria de animales de edad avanzada.

Palabras claves: Hematuria vesical enzoótica bovina. Papilomatosis bovina. Helechos *Pteridium* Ptaquilósido. Diagnóstico



ABSTRACT

In the development of malignant neoplasms in the urinary bladder in cattle, two factors are combined, on the one hand, chronic intoxication with Ptaquiloside present in ferns of the genus *Pteridium* and infection with bovine papillomavirus (BoPV). The presence of the infection can be determined using molecular biology tools in *post-mortem* collected samples. Therefore, the aim of this study was to identify the presence of BoPV in samples of urinary bladder, blood and urine tissues to evaluate their use as clinical samples for *ante-mortem* diagnostic; for which samples of bovine papillomatosis associated with bovine enzootic bladder hematuria (HVEB) were analyzed, collecting 132 samples of urine, urinary bladder tissue and blood of 53 animals, sampled in the municipal camals of Azogues, Cuenca and Paute, using PCR and RFLP as diagnostic tests. To validate the BoPV detection test, a process control was performed for each of the mentioned samples, which allowed the identification of 126 valid samples. It was only possible to identify the presence of a mixture of BoPV type 3 and 6 in one of the collected blood samples, whereas in the samples of urine and bladder tissue its presence could not be determined; The BoPVs identified agree with the types of BoPV already described in blood. Due to the limited results of the present study, it is necessary to deepen the study, orienting it towards the identification of genetic material of BoPV in samples of neoplastic lesions present in the urinary bladder of old animals.

Keywords: Bovine enzootic vesical hematuria, Bovine papillomatosis, Ferns, *Pteridium*, Ptaquiloside, Diagnostic.



ÍNDICE:

| Número: | Página: |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1.1. OBJETIVOS | 12 |
| 1.1.1. Objetivo general | 12 |
| 1.1.2. Objetivos específicos | 13 |
| 1.2. HIPÓTESIS O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN | 13 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1. PAPILOMA BOVINO | 14 |
| 2.1.1. Agentes causales del papiloma bovino | 14 |
| 2.1.2. Clasificación de los virus de papiloma bovino | 14 |
| 2.1.3. Detección de diferentes tipos de papilomavirus bovino y coinfección en el torrente sanguíneo del ganado | 16 |
| 2.1.4. Infección por papilomavirus bovino y tumores mesenquimales de la vejiga urinaria | 17 |
| 2.1.5. Características de las lesiones causadas de papilomavirus bovino | 18 |
| 2.2. HEMATURIA VESICAL ENZOÓTICA BOVINA | 18 |
| 2.2.1. Desarrollo de la enfermedad | 19 |
| 2.2.2. Etiología de hematuria vesical enzoótica bovina | 20 |
| 2.2.3. Signos clínicos | 20 |
| 2.2.4. Diagnóstico | 21 |
| 2.2.5. Tratamiento y control | 21 |
| 2.2.6. La hematuria vesical enzoótica bovina en Ecuador | 22 |



| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 3.1. | Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total. | 24 |
| 3.1.1. | Biológicos | 24 |
| 3.1.2. | Reactivos y soluciones | 24 |
| 3.1.3. | Equipos y otros materiales | 24 |
| 3.2. | Métodos para realizar la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total. | 25 |
| 3.2.1. | Pasos ejecutados | 25 |
| 3.3. | Materiales a emplear para el procesamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2). | 26 |
| 3.3.1. | Biológicos | 26 |
| 3.3.2. | Reactivos y soluciones | 26 |
| 3.3.3. | Equipos y otros materiales | 27 |
| 3.4. | Métodos aplicados para el procesamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2). | 27 |
| 3.4.1. | Pasos ejecutados | 27 |



| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3.5. | Materiales usados para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BoPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3). | 28 |
| 3.5.1. | Biológicos | 28 |
| 3.5.2. | Reactivos y soluciones | 28 |
| 3.5.3. | Equipos y otros materiales | 29 |
| 3.6. | Métodos aplicados en la realización del proceso para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BoPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3). | 30 |
| 3.6.1. | Pasos ejecutados | 30 |
| 3.7. | Materiales usados para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BoPV de las muestras positivas, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4). | 32 |
| 3.7.1. | Biológicos | 32 |
| 3.7.2. | Reactivos y soluciones | 33 |
| 3.7.3. | Equipos y otros materiales | 34 |
| 3.8. | Métodos aplicados en la realización del proceso para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BoPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4): | 34 |
| 3.8.1. | Pasos ejecutados | 34 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |



| | | |
|---------------|--|-----------|
| 4.1.1. | Resultados de la colecta de muestras | 37 |
| 4.1.2. | Resultados de la validación de los procesos de colecta, conservación, procesamiento y purificación del material genético de las muestras colectadas | 42 |
| 4.1.3. | Detección y genotipificación de los BoPV en las muestras colectadas | 43 |
| 5. | CONCLUSIONES | 51 |
| 6. | PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES | 52 |
| 7. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| 8. | ANEXOS | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS:

| Número: | | Página: |
|----------------|---|----------------|
| 1 | Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.2% de los productos de PCR del control de proceso. | 43 |
| 2 | Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.6% del perfil de digestión del producto de PCR de la muestras positiva a BoPV | 44 |

ÍNDICE DE ANEXOS:

| Número: | | Página: |
|----------------|---|----------------|
| 1 | Formato para la colecta de datos de los animales muestreados | 58 |
| 2 | Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de los BoPV | 59 |
| 3 | Patrones de RFLP esperados de cada uno de los 15 tipos de BoPV con las enzimas de restricción <i>DdeI</i> , <i>HinfI</i> , <i>MsLI</i> y <i>HindIII</i> . | 60 |



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Abreviatura:

Significado:

BoPV

Virus de papiloma bovino

E

Early

HVEB

Hematuria vesical enzoótica bovina

L

Late

NK

Asesinas naturales

PCR

Reacción en cadena de polimerasa

RFLP

Polimorfos en la longitud de los Fragmentos de restricción

Símbolo:

Significado:

nm

Nanómetros

ul

Microlitros



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACION PARA PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

KARINA FERNANDA RODRÍGUEZ ARIAS, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de la titulación **“Identificación y genotipificación de los tipos de virus de papiloma bovino en sangre periférica u orina de animales afectados por hematuria vesical enzoótica bovina”**, de conformidad con el Art. 114 del CODIGO ORGANICO DE LA ECONOMIA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACION reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de Octubre de 2017

KARINA FERNANDA RODRÍGUEZ ARIAS

C.I: 010584189-4



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

KARINA FERNANDA RODRÍGUEZ ARIAS, autora del trabajo de titulación “**Identificación y genotipificación de los tipos de virus de papiloma bovino en sangre periférica u orina de animales afectados por hematuria vesical enzoótica bovina**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 04 de Octubre de 2017

KARINA FERNANDA RODRÍGUEZ ARIAS

C.I: 010584189-4



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gonzalo López por su dirección y apoyo en la tesis desarrollada, al Dr. Antonio Vallecillo por compartir sus conocimientos, guiarme y ayudarme a desarrollar este proyecto de gran interés para el campo de la medicina veterinaria, a cada uno de los doctores y personal que nos permitieron el ingreso en el Camal Municipal de Cuenca, Azogues y Paute para la colecta de muestras e información necesaria, a los doctores que nos permitieron la colecta de las muestras en Zaruma-El Oro, a los dueños de los animales por su ayuda desinteresada en proporcionarnos datos suficientes para desarrollar este proyecto.

Karina Fernanda Rodríguez Arias



DEDICATORIA

Fundamentalmente dedicado a mis padres Marcelo Rodríguez y Carmen Arias por su gran esfuerzo, comprensión y apoyo en cada etapa de mi vida estudiantil, gran parte de este trabajo no lo podría haber realizado si no contara con su apoyo incondicional.

A mis tres hermanos Adrián, Ruth y Andrés, por apoyarme y ayudarme en las dificultades que se me han presentado a lo largo de mis estudios.

A mi pareja Lennin Siguencia por su comprensión y apoyo en gran parte de mi carrera.

A mis cuñadas y sobrinos por respetar mi espacio y tiempo de estudio, permitiéndome alcanzar mis objetivos.

Karina Fernanda Rodríguez Arias

1. INTRODUCCIÓN

La hematuria vesical enzoótica bovina (HVEB) es una enfermedad aguda y crónica caracterizada por una condición inflamatoria o lesiones hemorrágicas que puede evolucionar a una forma neoplásica de la vejiga urinaria, asociada al consumo prolongado de un componente tóxico contenido en helechos del género *Pteridium*, se trata de compuesto denominado Ptaquilósido, el mismo que es conocido por su efecto cancerígeno, y es el desencadenante de la presencia de sangre en la orina, que puede presentarse en forma aguda o crónica. Por otro lado, la HVEB tiene como agente causal asociado al virus de papiloma bovino, ya que el compuesto tóxico presente en el helecho, favorece el establecimiento de la infección por distintos tipos de papilomavirus bovino, además también provoca hemorragias debido a lesiones en el tejido urinario, que al parecer estaría inducida por dicho virus (Marrero & Calderón, 2012).

La presencia de esta enfermedad desencadena disminución en la producción animal, debido a la anemia, que ocasionará pérdida de sangre provocando disminución de peso, y agravando el cuadro clínico por la presencia de tumores que pueden llevar a la malignidad, produciendo incluso a la muerte del animal (Bautista, 2011).

No se conoce un método curativo, por lo que muchos de ellos deben ser sacrificados, se emplea un tratamiento de sostén a base de antibióticos, vitaminas e hidratación, de acuerdo a los síntomas (Torres & Ramírez, 1983).

En el Ecuador no hay datos que ayuden con información necesaria acerca de la HVEB y su relación con la papilomatosis bovina, sumándose a más de esto las pérdidas productivas y económicas que produce, es por ello que se desarrolló esta investigación orientada a detectar, identificar y genotipificar el o los tipos de virus de papiloma bovino asociados a lesiones en vejiga urinaria de animales afectados por HVEB, mediante el análisis de muestras de sangre u orina de los mismos bovinos para evaluar su utilidad diagnóstica, sin la necesidad del sacrificio de los animales afectados.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Identificar y genotipificar mediante herramientas de biología molecular (PCR-RFLP) los diferentes tipos de virus de papiloma bovino asociados a lesiones en vejiga urinaria de animales afectados por hematuria vesical enzoótica bovina, y en sangre periférica y orina de los bovinos, con la finalidad

de evaluar la utilidad diagnóstica de éstas dos últimas muestras biológicas para identificar la infección en los tejidos vesicales.

1.1.2. Objetivos específicos

Identificar y genotipificar mediante PCR-RFLP los diferentes tipos de virus de papiloma bovino, presentes en las lesiones de animales con antecedentes o con signología clínica de estar afectados por hematuria vesical enzoótica bovina.

Identificar y genotipificar mediante PCR-RFLP los diferentes tipos de virus de papiloma bovino circulantes en sangre periférica y los eliminados en la orina de los animales con antecedentes o con signología clínica de estar afectados por hematuria vesical enzoótica bovina.

Evaluar estadísticamente la independencia del o los tipos de virus de papiloma bovino presente tanto en las lesiones, sangre periférica y orina de los animales con antecedentes o afectados por hematuria vesical enzoótica bovina.

Evaluar parámetros diagnósticos (sensibilidad y especificidad diagnóstica) para definir la utilidad de las muestras de sangre periférica y orina en la identificación de la infección de virus papiloma bovino en la vejiga urinaria *ante mortem*.

1.2. HIPÓTESIS O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿En los animales con infección por virus de papiloma bovino en la vejiga urinaria es posible encontrar el o los mismos tipos de virus circulando en sangre periférica o estar eliminándose en la orina?

¿La identificación de los virus de papiloma bovino en sangre periférica u orina de animales afectados con hematuria vesical enzoótica bovina tiene valor diagnóstico para definir la infección en el epitelio vesical?



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. PAPILOMA BOVINO

2.1.1. Agentes causales del papiloma bovino

Los virus de papiloma bovino (BoPV) son virus que causan la formación de tumores, se trata de virus oncogénicos de doble cadena de ADN, capaces de inducir lesiones epiteliales cutáneas benignas y / o malignas. Generalmente, los tumores benignos afectan la piel o la mucosa y producen una regresión espontánea del mismo, pero bajo ciertas circunstancias, el sistema de defensa puede ser abrumado y pueden progresar a carcinoma de células escamosas, especialmente en presencia de agentes inmunosupresores y mutagénicos como el helecho del género *Pteridium* (Bocaneti *et al.*, 2013).

Los BoPV son considerados como agentes causales de tumores benignos y malignos en los bovinos, son virus sin envoltura, que contienen un ADN de cadena doble cerrado circularmente, contiene alrededor de 8000 nucleótidos o pares de bases. El genoma se encuentra dividido en 3 regiones claramente definidas; una de ellas es la encargada de la codificación de proteínas o genes tempranos (E, de *Early*); la segunda es la de proteínas estructurales o tardías (L, de *Late*) y una tercera región que contiene los reguladores de la replicación y transcripción del genoma (Munday, 2014).

Es importante recalcar que los BoPV codifican alrededor de 8 proteínas. Solo cuatro están conservadas o presentes en todos los tipos de BoPV identificados; son las proteínas reguladoras E1 y E2 que modulan la transcripción y la replicación viral y las proteínas estructurales L1 y L2 que componen la cápside viral (Bergvall *et al.*, 2013).

Adicionalmente, los BoPV codifican para las proteínas E5, E6 y E7, que son tres pequeñas proteínas menos conservadas y desempeñan papeles importantes en la regulación del crecimiento celular y la evasión inmune. En los BoPV asociados con el desarrollo cáncer las proteínas E6 y E7 funcionan como oncogenes (o genes anormales o activados que producen mutación de un alelo de un gen normal denominado protooncogén) (Lambert *et al.*, 2013).

2.1.2. Clasificación de los virus de papiloma bovino

En la clasificación de los virus existen 7 clases, los BoPV están en la primera clase (Virus con genoma de ADN de cadena doble), pertenecen a la familia Papillomaviridae. Se caracterizan por causar lesiones a diferentes especies, entre las cuales están los seres humanos y todos los animales domésticos excepto las aves, las especies se denominan tipos, que para el caso de los BoPV a la fecha se han reportado 15 tipos (Del 1 al 15) (Doorslaer *et al.*, 2012).

Según la clasificación de los Papilomavirus propuesta por Villiers, *et al.*, (2004), la familia Papillomaviridae consta de 16 géneros de acuerdo a la secuencia del genoma. El L1 es el gen más conservado dentro del genoma de los papilomavirus y por lo tanto es utilizado para la identificación de nuevos tipos de papilomavirus. Un papilomavirus es reconocido como un tipo nuevo si el genoma completo de la L1 ha sido clonado y la secuencia de ADN obtenida de L1 difiere en más de 10% del tipo conocido de papilomavirus más cercano. Las diferencias entre 2% y 10% definen un subtipo y menos de 2%, una variante. En la actualidad se ha identificado y caracterizado 15 tipos de BoPV, los que se han clasificado en cuatro géneros. En el género Deltapapilomavirus se incluyen a los tipos 1, 2 y 13, estos inducen la aparición de fibropapilomas, asociados con el reclutamiento de los fibroblastos subepiteliales. Adicionalmente, ambos tipos son únicos en su capacidad de infectar diferentes especies de hospederos, no solo a bovinos, como es el caso del sarcoide equino. Recientemente fue secuenciado completamente el genoma de un nuevo tipo Deltapapilomavirus (BoPV-13). La mayoría de los tipos de BoPV (3, 4, 6, 9, 10, 11 y 12) pertenecen al género Xipapillomavirus, estos virus se consideran exclusivamente epiteliotrópicos, provocando la formación de “papilomas verdaderos”, sin la participación de los fibroblastos. Por otro lado el BoPV 5 y 8 tienen la cualidad de inducir fibropapilomas y verdaderos papilomas en el curso de su ciclo infeccioso, estos están clasificados en el tercer género, el Epsilonpapillomavirus. El BoPV-7 representa una excepción y se le clasifica por separado, pertenece al género Dyoxipapilomavirus; este virus fue aislado por primera vez de un papiloma cutáneo y también a partir de muestras de piel de pezones sanos de bovinos. Como regla general, los papillomavirus son específicos de la especie a la que afectan, pero la excepción a esta regla son los BoPV tipo 1 y 2, y recientemente el 5 y el 13, que pueden saltar la barrera de la especie infectando a los búfalos, equinos, yaks, taires, jirafas, burros, bisontes y cebras (Lohr *et al.*, 2005; Literak *et al.*, 2006; Nasir *et al.*, 2008; Silvestre *et al.*, 2009; Pangty *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013; Lunardi *et al.*, 2013).

Los BoPV infectan a los rumiantes en todo el mundo, se registran un gran número de casos en regiones con una gran densidad de estas especies (Italia, Reino Unido, Alemania, Japón, India, Estados Unidos de América y Brasil (Campo *et al.*, 1986; Campo, 1995; Ogawa *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012).

Los 15 tipos de BoPV descritos, así también otros han sido demostrados por métodos de biología molecular, ya que los virus del papiloma no se replican o se recuperan en cultivos celulares. De acuerdo con la Nomenclatura del Comité de Papillomavirus (14^a Conferencia Internacional del Papiloma, Quebec City ,QC,Canada), se ha establecido que las secuencias amplificadas, aisladas de nuevos virus del papiloma pueden indicar solamente supuestos tipos, en lugar de nuevos tipos de Rodríguez Arias Karina Fernanda



papillomavirus, ya que los amplicones en ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) representan solo una parte del gen L1 (Carvalho, *et al.*, 2013).

Sin embargo, el uso de ensayos de PCRs con primers degenerados, seguida de secuenciación ha permitido la identificación de varios tipos de papillomavirus en hospederos humanos y animales. Se ha descrito que las verrugas cutáneas en los bovinos, son causados por tipos virales específicos y que los distintos tipos de BoPV son asociados con diversas lesiones corporales (Dávalos *et al.*, 2011).

2.1.3. Detección de diferentes tipos de papilomavirus bovino y coinfección en el torrente sanguíneo del ganado

En el estudio realizado por Santos, *et al.*, (2013), a pesar de que los BoPV se describen clásicamente como epiteliotrópicos, sin embargo, fueron detectados en los fluidos corporales como la sangre y el semen. La presencia de BoPV en estos tipos de muestras tiene implicaciones para la diseminación de los BoPV. De las 57 muestras de sangre, analizadas por PCR utilizando primers específicos para los tipos BoPV 1 a 6 y 8 a 10, los resultados mostraron la presencia de 7 tipos de BoPV en la sangre, con la excepción de BoPV 5 y 9. Este es el primer estudio que demuestra la presencia de ADN de BoPV tipo 3, 6, 8 y 10 en sangre de ganado bovino. Los BoPV 1 y 2 fueron los virus más frecuentes en la sangre, mientras que los BoPV 4 y 10 fueron los tipos menos frecuentes. Todas las muestras presentaron coinfección por al menos dos tipos de BoPV. Estos datos sugieren que varios tipos de BoPV pueden infectar las células sanguíneas al mismo tiempo.

Por lo general, estos estudios epidemiológicos moleculares demuestran la existencia de co-infecciones por dos o más tipos de BoPV en la misma muestra (Schmitt *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012).

De acuerdo a Batista, *et al.*, (2013), la presencia de coinfecciones puede ser una consecuencia de la inmunosupresión y puede ayudar a explicar la existencia de infecciones persistentes en los hatos de ganado bovino.

Poco se sabe sobre los aspectos biológicos implicados cuan los tipos de BoPV están presentes en sangre de los bovinos infectados. Los BoPV 1 y 2 son los tipos víricos con mayor frecuencia encontrados en sangre (Freitas *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013). Adicionalmente, como la ocurrencia de coinfecciones en las lesiones cutáneas inducidas por BoPV en el ganado es bastante común, también es factible encontrar una gran variedad de BoPV que están en la sangre de los animales infectados (Batista *et al.*, 2013).

2.1.4. Infección por papilomavirus bovino y tumores mesenquimales de la vejiga urinaria

En la investigación desarrollada por Martano *et al.*, (2013), en la que se efectuó un análisis histopatológico de 253 tumores mesenquimales de vejiga urinaria de bovinos, que pastaban en tierras ricas en helechos. El estudio muestra como resultados que aproximadamente el 80% presentaron hemangiomas y angiosarcomas. El hemangioma (capilar, cavernoso y vasos grandes) como tumor mesenquimal fue más frecuente que el angiosarcoma. Aunque la aparición de las células endoteliales puede variar notablemente, los angiosarcomas epitelioides, que a menudo contienen células multinucleadas, presentaron con mayor frecuencia lesiones vasculares malignas, el hemangiopericitoma, tumores de origen muscular y de tejido conectivo blando, se presentaron solos y / o en asociación con otras lesiones. Además, 45 casos de hiperplasia de endotelio papilar intravascular, una lesión no reportada previamente en la vejiga urinaria del ganado vacuno. El ADN de BoPV tipo 2 se amplificó en las muestras tumorales, además, estos hallazgos demuestran que el BoPV 2 infecta tanto las células epiteliales como células mesenquimales. Adicionalmente, se investigaron 40 tumores vasculares mediante inmunofluorescencia, se demostró una coexpresión de la proteína E5 y del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β R). Los resultados muestran que la oncoproteína E5 del BoPV 2 se une a la forma activada del PDGF β R, desempeñando así un papel importante en la carcinogénesis del epitelio mesenquimal de la vejiga urinaria de los bovinos.

Maxie *et al.*, (2007), indican en un estudio que de manera normal los tumores de la vejiga urinaria son muy raros en el ganado bovino, aproximadamente 0.01% de todos los tumores malignos. Sin embargo, su incidencia aumenta mucho (> 90%) en ganado adulto que es criado en regiones geográficas ricas en helechos del género *Pteridium*. La Ingesta prolongada de helecho en pequeñas cantidades produce un síndrome clínico conocido como hematuria vesical enzoótica crónica (HVEB), caracterizándose por microhematuria y anemia (Pamukcu *et al.*, 1976; Roperto *et al.*, 2010).

Los mismos Maxie *et al.*, (2007) junto a Carvalho *et al.*, (2006), expresan que en más del 90% de los casos, los tumores de la vejiga urinaria de bovinos se asocian con la hematuria causada por el consumo de helechos. Es bien conocido que esta planta juega un papel importante en el desarrollo de tumores de vejiga en el ganado, como resultado de la exposición a los principios tóxicos del helecho que son inmunosupresores, mutagénicos, clastogénicos, y carcinógenos.

El agente carcinógeno más importante del helecho parece ser un esquiterpenoide llamado Ptaquilosido (PT) (Shahin *et al.*, 1999). Se ha sugerido que PT afecta tanto al estroma como al



urotelio de la vejiga urinaria (Da Costa *et al.*, 2012).

Se ha demostrado en experimentos un fuerte sinergismo entre la infección por el BoPV 2 y la intoxicación por el consumo de helecho, en el desarrollo de la carcinogénesis de la vejiga (Campo *et al.*, 1994), así como en la presencia natural de tumores benignos o malignos de vejiga bovina. Varios autores (Pamukcu *et al.*, 1976; Roperto *et al.*, 2010; Campo *et al.*, 1992; Borzacchiello *et al.*, 2003), expresan que el PT puede causar toxicidad al sistema inmunitario, lo que contribuyen al establecimiento de la infección o a la activación de una infección latente y / o subclínica urotelial del BoPV 2, lo que resulta en el desarrollo de neoplasias. El PT actua como un poderoso inmunosupresor que es genotóxico para los linfocitos y disminuye las actividades de las células NK (Asesinas naturales) (Latorre *et al.*, 2013).

Los tumores de vejiga asociados al BoPV son principalmente de origen urotelial. Se han descrito numerosas vías moleculares por las cuales los BoPV son capaces de transformar las células uroteliales, se ha demostrado que el BoPV 2 es responsable de la transformación neoplásica de las células uroteliales, mediante la activación del PDGF β R y de una proteína específica de tejido denominada Calpain 3 (Borzacchiello *et al.*, 2006; Roperto *et al.*, 2010).

2.1.5. Características de las lesiones causadas de papilomavirus bovino

Los BoPV 1, 2 y 5, provocan lesiones de pezón, verrugas cutáneas comunes y fibropapilomas en forma de “granos de arroz”, presentan una cubierta fibrosa de profundidad variable en el epitelio escamoso estratificado, cuyas capas superficiales están queratinizadas. Las lesiones pueden variar de tamaño, desde pequeños nódulos firmes hasta grandes crecimientos en forma de coliflor. Son de color grisáceo o negro, duro y espinosos al tacto. Las lesiones más grandes son susceptibles a abrasión y pueden sangrar. Generalmente se ubican en la ubre y pezones, cabeza, cuello, y hombros y en otros casos se las ha encontrado en el omاسo, vagina, vulva, pene, ano. (Borzacchiello *et al.*, 2008).

En bovinos se han detectado tanto cambios hematológicos, como en la orina, en donde ha sido frecuente la presencia de eritrocitos, leucocitos y proteínas, relacionándose a estos trastornos con la presencia de lesiones en la vejiga urinaria, incluyendo algunas lesiones malignas (Sánchez *et al.*, 2004).

2.2. HEMATURIA VESICAL ENZOÓTICA BOVINA

Sánchez *et al.*, (2004), manifiesta que: “es una enfermedad crónica de creciente relevancia a nivel mundial, es considerada una de las toxicosis de mayor interés económico y de salud pública”.

Por otro lado González *et al.*, (2004), expresan que: “es un proceso no infeccioso que afecta a bovinos domésticos y silvestres en crianza al pastoreo, y se presenta comúnmente en zonas tropicales. Caracterizada por hemorragias a nivel de la vejiga urinaria, denominada comúnmente como hematuria, orina con sangre o intoxicación por helecho común”.

La HVEB es una enfermedad en la que a largo plazo se observa el desarrollo de neoplasias malignas en la vejiga urinaria, asociada al consumo reiterado de helechos del genero *Pteridium*, la cual es considerada como invasora en zonas de pastoreo, su aparición depende de la interrelación de múltiples factores, en donde el consumo de helecho común es determinante, aunque algunas evidencias sugieren que la aparición de las lesiones sería a consecuencia de la presencia de la infección viral por BoPVs en varios tipos de células de la pared vesical, incluyendo las vasculares (Marrero *et al.*, 2012). y que presenta altas concentraciones del principio toxico mayoritario Ptaquilósido (PT) (Bulnes *et al.*, 2014).

2.2.1. Desarrollo de la enfermedad

La intoxicación ocurre por la ingestión de un glucósido norsesquiterpeno inestable denominado PT, presente en el helecho, y su intermediario activado, la Dienona, lo que desencadena en una acción mutagénica, clastogénica, teratogénica y carcinogénica (Marín, 2011). Otro inmunosupresor y mutágeno que favorece el desarrollo de las neoplasias en vejiga urinaria es la Quercetina, que también está presente en el helecho (Borzacchiello *et al.*, 2008).

Al inicio de la intoxicación se produce una micro hematuria que puede ser imperceptible, posteriormente la orina se torna oscura por el incremento de sangre en la orina, considerándose una macro hematuria, llegando a ser el estado clínico de la enfermedad; esta eliminación de sangre va incrementando, llegando a producir en el animal anemia, emaciación, mucosas pálidas, disuria, tenesmo, uremia y finalmente muerte del animal. Se identifica una forma aguda de la enfermedad, en donde se da una hematuria clínica moderada o subclínica persistente, que se da por el consumo en grandes cantidades de helecho, el animal se debilita y puede morir después de dos semanas de enfermedad; otra presentación que es la forma crónica de enfermedad, caracterizada por el consumo de helecho por un tiempo prolongado, por lo general la mayoritariamente reportada en todo el mundo, en donde su aparición dependerá del nivel de consumo y la concentración de PT que posea la planta (Bautista, 2011).

Las alteraciones que sufre la vejiga va a producir hiperplasia del tejido, produciendo neoplasias debido al consumo de helecho, sin manifestaciones clínicas de hematuria crónica (Roperto *et al.*, 2010).

El desarrollo de la intoxicación va a depender de la interacción planta-animal-medio ambiente, en donde cada uno está conformado por una serie de características y fenómenos, por lo que se considera a esta enfermedad, de origen multifactorial, relacionándose también con la época del año, refiriéndose a la época de sequía, por falta de alimento, y así también el estado fenológico de la planta, siendo las semillas, la parte más toxica, sin embargo se puede presentar la intoxicación de manera esporádica en cualquier época del año (Aguilar *et al.*, 2013).

2.2.2. Etiología de hematuria vesical enzoótica bovina

Según Pavelski *et al.*, (2014) expresa que en la HVEB, la causa directa de la enfermedad, es la ingestión de helechos genero *Pteridium*, y se produce cuando el animal consume pequeñas cantidades de esta planta, en cantidades menores a 10 kg por día, continuamente por uno o más años.

Pamukcu, (1955) indica que esta enfermedad se desarrolla tanto en hembras como en machos y también en animales que no han tenido partos. Otros autores como Borzacchiello *et al.*, (2008), manifiestan que existe una estrecha relación entre la presencia de la enfermedad, el efecto carcinogénico del helecho y la papilomatosis bovina, debido a que se puede desarrollar cáncer en la vejiga urinaria, y se la ha asociado con la presencia de BoPV 2.

En el estudio desarrollado por Marrero *et al.*, (2012), dan a conocer que el helecho es considerado como una planta toxica de amplia distribución y de difícil erradicación, debido a las intoxicaciones que produce, en particular las ocasionadas por su potencial carcinogénico, tanto en animales como en el hombre se considera la única planta causante directa de cáncer, así como también se ha demostrado su efecto de mutagenicidad, clastogenicidad y teratogenicidad de *Pteridium*. Por lo antes expuesto el consumo de helecho en forma aguda o crónica, sumado a la presencia de BoPV contribuyen al desarrollo del cuadro clínico de la enfermedad y favorecen la aparición de neoplasias malignas.

2.2.3. Signos clínicos

Según los estudios desarrollados por Rojas, (2011), indica que los signos clínicos de los animales enfermos, al inicio se produce una micro hematuria que puede ser imperceptible, posteriormente la orina se torna oscura por el incremento de sangre en la orina, considerándose una macro hematuria, llegando a ser el estado clínico de la enfermedad; esta eliminación de sangre va incrementando, llegando a producir en el animal anemia, emaciación, mucosas pálidas, disuria, tenesmo, uremia y finalmente muerte del animal. Se identifica una forma aguda de la enfermedad, en donde se da una

hematuria clínica moderada o subclínica persistente, que se da por el consumo en grandes cantidades de helecho, el animal se debilita y puede morir después de dos semanas de enfermedad; otra presentación que es la forma crónica de enfermedad, caracterizada por el consumo de helecho por un tiempo prolongado, por lo general la mayoritariamente reportada en todo el mundo, en donde su aparición dependerá del nivel de consumo y la concentración de PT que posea la planta.

Roperto *et al.*, (2010) manifiesta que las alteraciones que sufre la vejiga va a producir hiperplasia del tejido, produciendo neoplasias debido al consumo de helecho, sin manifestaciones clínicas de hematuria crónica.

En el estudio de Sánchez *et al.*, (2004), con respecto a la enfermedad mencionan que en afectados bovinos se han detectado tanto cambios hematológicos, como en la orina, en donde ha sido frecuente la presencia de eritrocitos, leucocitos y proteínas, relacionándose a estos trastornos con la presencia de lesiones en la vejiga urinaria, incluyendo algunas lesiones malignas. Existen varias investigaciones relacionadas a la enfermedad que buscan conocer como ocurre la infección e inicio de la enfermedad, el inmunosupresor y mutágeno es la Quercetina, que también está presente en el helecho (Borzacchiello *et al.*, 2008).

Marín, (2011) indica que la intoxicación ocurre por la ingestión de un glucósido norsesquiterpeno inestable denominado PT, presente en el helecho, y su intermediario activado, dienona, lo que desencadena en una acción mutagénica, clastogénica, teratogénica y carcinogénica.

2.2.4. Diagnóstico

Para efectuar el diagnóstico de la enfermedad de acuerdo a Pavelski *et al.*, (2014), se debe observar tanto a los animales que presenten los signos de HVEB, como identificar la presencia de helechos en el lugar en el cual se pastorean los bovinos. El diagnóstico diferencial se realiza en base a enfermedades que causan hematuria tales como, cistitis, pielonefritis, anemia, micotoxicosis, hemoglobinuria post parto, entre otras.

2.2.5. Tratamiento y control

En cuanto al tratamiento, no se conoce un método curativo, por lo que muchos de ellos deben ser sacrificados, se sugiere el empleo de un tratamiento de sostén a base de antibióticos, suplementos minerales, vitaminas e hidratación, de acuerdo a los signos (Torres *et al.*, 1983).

El control de la enfermedad resulta un tanto difícil, por lo que se procura la reducción o eliminación de los helechos en las zonas donde se encuentran los animales e incluso contrarrestar los efectos tóxicos de los metabolitos sobre los bovinos (Sánchez *et al.*, 2003).

2.2.6. La hematuria vesical enzoótica bovina en Ecuador

En el país se cuenta con un estudio referente a la hematuria vesical, que fue desarrollada por Bulnes *et al.*, (2014), quienes mencionan que los tumores vasculares de la vejiga urinaria son raros, excepto en casos de animales que han presentado HVEB. Estas alteraciones tisulares se han asociado a la ingestión de la planta *Pteridium spp.*, la cual es considerada como invasora en zonas de pastoreo y que presenta altas concentraciones del principio tóxico mayoritario PT.

Estudios precedentes realizados en la provincia Bolívar, demostraron la presencia de factores de riesgo en la presentación de hematuria en zonas ganaderas de esa región del país, dados por la alta invasión de la planta en las áreas de pastoreo, la caracterización de la especie dominante y la observación de manifestaciones clínicas (Hematuria) en bovinos afectados, de ahí que resultó indispensable realizar investigaciones que permitieran llegar a la confirmación morfopatológica del cuadro clínico de la HVEB, constituyendo objetivo fundamental de este trabajo estudiar las alteraciones anatopatológicas en vejiga y esófago de bovinos de matadero, procedentes de diferentes cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. Para este estudio se inspeccionó la vejiga urinaria y el esófago de 228 animales faenados en el camal de Babahoyo. Los animales provenían de los cantones Caluma (32 animales), San Miguel de Bolívar (157 animales), Chimbo (13 animales), Echeandía (9 animales) y Chillánes (17 animales). Las lesiones asociadas a la HVEB en vejiga y esófago, fueron observadas en el 53,5% de los casos estudiados en el camal de Babahoyo, lo que indica la alta frecuencia de presentación de las mismas. Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos de los distintos lugares de origen de los animales. Los cantones con mayor grado de afectación fueron Chimbo y San Miguel de Bolívar donde estuvieron las afectaciones más graves de la mucosa vesical y el mayor porcentaje de lesiones mixtas (vejiga-esófago).

Las lesiones macro y microscópicas observadas en los animales estudiados por grupo fueron:

Grupo I: El examen macroscópico mostró congestión marcada y discreto edema, áreas focales de hemorragias petequiales y equímosis dispersas, tumefacción y aspecto vesicular de la mucosa vesical. Las lesiones microscópicas de carácter no neoplásicas que se encontraron en este grupo fueron hiperplasia, aspecto vacuolar, balonamiento y ectasia capilar del epitelio transicional. En este sentido, se ha establecido que el criterio de lesiones y manifestaciones tempranas de la enfermedad y la presencia de estos y otros tumores en la vejiga de animales afectados por HVEB, resulta poco provechosa desde el punto de vista clínico de la enfermedad.

Grupo II. Macroscópicamente, se observaron áreas de aspecto nodular rojizas o hemorrágicas, simples o múltiples, que hacían marcados relieves en la superficie de la mucosa vesical, alternando



con zonas abultadas de consistencia fibrosa de color grisáceo. En los casos más severos, las formaciones nodulares, únicas o multicéntricas mostraban estructuras de color vinoso o blanco-grisáceo que se correspondían con lesiones ulcerativas crateriformes con exudado mucopurulento. Se observaron estructuras de aspecto pedunculado, muy hemorrágicas, que coincidían, en los casos en los que había repleción urinaria, con contenido de sangre viscosa y oscura (Bulnes *et al.*, 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se indican los materiales y los métodos que se usaron y aplicaron en cada una de las actividades planificadas para el proyecto de titulación.

3.1. Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1):

3.1.1. Biológicos

Se colectaron 132 muestras de 53 bovinos que presentaron papilomas a nivel cutáneo y / o signos clínicos de hematuria.

3.1.2. Reactivos y soluciones

Solución de conservación: Solución al 90% de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0; 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.: G5516)).

Solución TE 10:1 100X (Solución de 1 M de Tris-HCl, pH 8.0 y 100 mM de EDTA).

Solución a 2 M de Tris-HCl, pH 8.0.

Solución a 500 mM de EDTA, pH 8.0.

3.1.3. Equipos y otros materiales

Platina de calentamiento con agitación magnética.

Potenciómetro (pHmetro).

Set de micropipetas (1 ml, 200 μ l, 50 μ l y 20 μ l con puntas estériles).

Autoclave.

Equipo de filtración (\varnothing 0.22 nm).

Probetas y recipientes para soluciones.

Recipientes para las muestras (Tubos Falcon de 15 ml, Frascos para muestra de orina y tubos tipo Vacutainer con EDTA).

Kit de disección.

Guantes.

Solución desinfectante (Etanol al 70%).

Caja térmica para el transporte de muestras.

Formatos para la colección de la muestra (Anexo 1).

3.2. Métodos para realizar la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1):

3.2.1. Pasos ejecutados

Paso 1. Se prepararon las soluciones requeridas y el material necesario.

Paso 2. Se colocaron en los recipientes para las muestras 8 ml de la solución de conservación de la muestra.

Paso 3. Se tomó *ante-morten* una muestra de sangre periférica y /o orina de animales con lesiones sugestivas a papilomas cutáneos y / o signos de hematuria.

Paso 4. También se tomaron las muestras *post-mortem* de orina (en algunos casos) y tejidos de bovinos con lesiones visibles en la vejiga urinaria, faenados en los camales Municipales de Azogues, Cuenca y Paute, de acuerdo a la normativa del manejo respetuoso de los animales y así como también tomando las seguridades del caso para la viabilidad de las muestras en estudio.

Paso 5. Para la colecta se tomó una cantidad máxima de tejido de la lesión no mayor a la necesaria para llegar a tener un volumen de 10 ml (Marcado en el recipiente el volumen de 10 ml). El tejido se colectó en secciones de tejidos no mayor a 2 mm de grosor.

Paso 6. Se identificaron el o los recipientes y colectaron los datos necesarios para llenar el formato de datos para la colecta de las muestras.

Paso 7. Para el transporte de las muestras se procedió a colocar los recipientes en una caja térmica, evitando que se vuelquen y se generen derrames.

Paso 8. Para el almacenado de las muestras de orina y sangre, se colocó a los recipientes en refrigeración (4 °C) hasta su procesamiento (no más de 3 a 4 días). Para el caso de los tejidos se almacenaron por mayor tiempo antes de ser procesados, dado que la solución de conservación permite mantener estable hasta por 6 a 8 meses el material genético.



3.3. Materiales a emplear para el procesamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2):

3.3.1. Biológicos

Muestras de orina, sangre y tejido colectado de las lesiones de vejiga urinaria mantenidas en la Solución de conservación (tejido) a 4 °C.

3.3.2. Reactivos y soluciones

Solución de lisis (Solución con 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4 y 0.5 % de SDS (Sigma, Cat. No.: 71725). La solución ya preparada se almacenó a temperatura ambiente protegida de la luz solar directa.

Solución de proteinasa K (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol). La solución ya preparada se fraccionó en alícuotas de 500 µl y se almacenaron a – 20 °C, protegidas de la luz.

Solución de Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. No: 77619). De igual manera ésta solución se almacenó en refrigeración y protegido de la luz.

Solución de Etanol al 100 % (Sigma, Cat. No: E7023). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución de Etanol al 70 % (Solución al 70 % de Etanol en agua). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

Solución TE 10:1 1X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA).

Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

Solución buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

Solución de Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

Solución Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

3.3.3. Equipos y otros materiales

Set de micropipetas (1 ml, 200 μ l, 50 μ l y 20 μ l con puntas estériles).

Vortex.

Centrifuga refrigerada.

Fuente de poder.

Cámara de electroforesis horizontal.

Balanza analítica (Mantener calibrada).

Transiluminador UV.

Fotodocumentador UV-impresora.

3.4. Métodos aplicados para el procesamiento de las muestras biológicas de orina, tejidos de lesiones visibles presentes en vejiga urinaria y sangre periférica, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2):

3.4.1. Pasos ejecutados

Paso 1. Para el caso de las muestras de orina mantenidas a 4 °C por no más de 3 a 4 días, se tomó 2 ml y se centrifugaron a 12,000 x g por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla formada se conservó a -80 °C o fue procesada inmediatamente como se describe a continuación (**Paso 2**). De las muestras de sangre se tomó 2 ml, se centrifugó 1 3,000 x g por 10 min a 4 °C, después de la centrifugación se eliminó la mayor parte del plasma y se colectó cuidadosamente la capa flogística, y de la manera similar al sedimento de la orina se conservó a - 80 °C o fue procesada inmediatamente como se describe a continuación (**Paso 2**).

Finalmente, de las muestras de tejidos de lesiones visibles encontradas en la inspección de las vejigas urinarias de animales sacrificados con signos clínicos de hematuria, se tomó una porción aproximada de \approx 100 mg de las muestras mantenidas previamente en la Solución de conservación a 4 °C.

Paso 2. Tanto el sedimento de la orina, la capa flogística y la muestra de tejido se colocaron en un tubo eppendorf de 2.0 ml y se les adicionó 400 μ l de la Solución de lisis y 100 μ l de la Solución de Proteinasa K (5 mg/ml).

Paso 3. Las muestras se incubaron a 56 °C en un baño María durante toda la noche (12 a 14 h).

Paso 4. Una vez concluido el proceso de digestión, se adicionó 500 μ l de la Solución de Fenol/

Cloroformo/A. Isoamilico 25:24:1 y se mezcló vigorosamente con el vortex durante 20 a 30 s.

Paso 5. La suspensión obtenida se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación se colectó el sobrenadante (\pm 400 μ l) y se procedió a colocarlo en un tubo eppendorf (1.5 ml) nuevo.

Paso 6. A la muestra colectada se la adicionó 2.4 volúmenes de Etanol al 100% (1 ml) y se mezcló invirtiendo el tubo por 8 a 10 veces.

Paso 7. La mezcla se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación se eliminó la solución de forma cuidadosa para no perder la pastilla del ADN precipitado. Se adicionó 500 μ l de la Solución de Etanol al 70%, y se repitió el proceso de centrifugación y eliminación completa de la Solución de Etanol al 70%.

Paso 8. La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo. Y posteriormente fue resuspendida en 50 μ l de la Solución buffer TE 10:1 1X, pH 8.0.

Paso 9. Las muestras de ADN total obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta que se emplearon en los procesos de amplificación.

Paso 10. Previo a realizar los ensayos de amplificación con el control de proceso (Detección de ADN genómico de bovino) se evaluó la presencia e integridad del material genético purificado mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.2% teñido con Bromuro de etidio.

3.5. Materiales usados para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BoPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3):

3.5.1 Biológicos

Muestras de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total puro, extraído de las muestras orina, tejido de vejiga urinaria y sangre.

3.5.2. Reactivos y soluciones

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Se preparación de alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas del polvo.

Enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033), con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución a 50 mM de MgCl₂. Se prepararon alícuotas de las soluciones y se almacenaron a -20 °C, protegidas de la luz directa.



Solución de dNTP's 10 mM de cada uno (Trifosfato de Desoxinucleotidos) (dNTP's set, Thermo scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C y protegidas de la luz directa.

Solución de oligonucleótidos o primers 100 µM (Invitrogen). Par de oligonucleótidos específicos para el control de proceso (12SFWMod: **TAA ATC TCG TGC CAG CCA**, 12SREVM: **AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA C**,) y para la detección de material genético de los VPBo (FAP59For: **TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT**, FAP64Rev: **CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC**). Se resuspendieron en agua grado biología molecular para tener una concentración final de 100 µM y prepararon alícuotas que se almacenaron a -20 °C protegidas de la luz directa.

Soluciones de ADN total: ADN total obtenido de lesiones de las muestras colectadas, siguiendo el proceso antes descrito (**Sección 3.3 y 3.4**). Las alícuotas se mantuvieron almacenadas a -20°C y protegidas de la luz directa.

Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

Solución buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

Solución de Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

Solución Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

3.5.3. Equipos y otros materiales

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)

Vortex.

Microcentrifuga refrigerada.

Cabina de PCR.

Termociclador Nexus (Eppendorf).

Congelador a -20°C, sin descongelamiento automático (Almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).

Fuente de poder.

Cámara de electroforesis horizontal.

Balanza analítica (Mantener calibrada).

Horno de microondas.

Transiluminador UV.

Fotodocumentador UV-Impresora.

Potenciómetro (pHmetro).

Platina de agitación y calentamiento.

3.6. Métodos aplicados en la realización del proceso para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BoPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3):

3.6.1. Pasos ejecutados

Paso 1. Se descongelaron los reactivos necesarios para la amplificación (Agua grado biología molecular, Solución buffer de amplificación 10X, Solución de dNTP's, Solución de MgCl₂, Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes a las muestras a analizar).

Paso 2. Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, se preparó una premezcla con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (25 µl de volumen final por reacción), colocando en el orden indicado los siguientes reactivos, con la excepción de las muestra de ADN total:

Tabla N° 1: Preparación de la premezcla para la generación de los productos de PCR específicos para el control de proceso y de los BPV.

| Reactivos: | Concentración | | Volumen | |
|--------------------------------------|---------------|-----------|---------------|----------------|
| | inicial: | final: | por reacción: | de premezcla*: |
| Agua grado biología molecular | No aplica | No aplica | 18.65 µl | 18.65 µl X n |
| Solución buffer de amplificación 10X | 10X | 1X | 2.5 µl | 2.5 µl X n |
| Solución de dNTP's | 10 mM | 0.1 mM | 0.5 µl | 0.5 µl X n |
| Solución de MgCl ₂ | 50 mM | 2.0 mM | 1.0 µl | 1.0 µl X n |



Continuación Tabla N° 1

| Reactivos: | Concentración | Volumen | | |
|--------------------------------------|---------------|------------|--------|---------------|
| | | inicial: | final: | por reacción: |
| Oligonucleótido 12SREVMod o FAP59For | 100 μM | 0.8 μM | 0.2 μl | 0.2 μl X n |
| Oligonucleótido 12SREVMod o FAP64Rev | 100 μM | 0.8 μM | 0.2 μl | 0.2 μl X n |
| Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa | 5 U/μl | 0.04 U/μl | 0.2 μl | 0.2 μl X n |
| Muestra de ADN total | ---- μg/μl | ---- μg/μl | 2.0 μl | 2.0 μl X n |
| Volumen final: | ----- | ----- | 25 μl | 25 μl X n |

* n = Número de muestras.

Fuente: Karina Rodríguez A.

Paso 3. La premezcla preparada se mezcló en el vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

Paso 4. Se marcaron los tubos de PCR (200 μl) y les fue colocado 23 μl de la premezcla y se les adicionó 2 μl de la muestra correspondiente.

Paso 5a. Las reacciones así preparadas se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del control de proceso en primer lugar.

Tabla N°2: Perfil de temperatura para generar amplicones o productos de PCR del control de proceso.

| Desnaturalización inicial | 35 ciclos | | | | Extensión final |
|---------------------------|-------------------|--------------|-----------|-------|-----------------|
| | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | |
| Temperatura (°C): | 94 | 94 | 60 | 72 | 72 |
| Tiempo (min:seg): | 05:00 | 00:45 | 00:30 | 00:45 | 05:00 |

Fuente: Karina Rodríguez A.



Paso 5b. Las reacciones preparadas con los primers FAP59/FAP64 se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del material genético de los BoPV causales en la lesión.

Tabla N°3: Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BPV.

| Desnaturalización inicial | 35 ciclos | | | | Extensión final |
|------------------------------|-------------------|--------------|-----------|-------|--------------------|
| | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | | |
| Temperatura (°C): | 94 | 94 | 52 | 72 | 72 |
| Tiempo (min:seg): | 05:00 | 00:45 | 00:30 | 00:45 | 05:00 |

Fuente: Karina Rodríguez A.

Paso 6. Las reacciones tanto del control de proceso como para la detección del material genético de los BoPV posterior a ser sometidas al proceso de amplificación se les adicionó 5 μ l de la Solución buffer de carga para ADN 6X. Se mezclaron ambas soluciones.

Paso 7. De la mezcla de cada una de las reacciones de PCR con la Solución buffer de carga para ADN 6X se tomó 10 μ l, los cuales fueron cargados en uno de los pocillos de un gel de agarosa al 1.2 o 1.6% preparado con Buffer TAE 1X y 1 μ l de la Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml por cada 30 ml del gel. En uno de los pozos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

Paso 8. Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo al mismo a 90 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel.

Paso 9. Una vez resueltos los productos de los PCR, se fotodocumentaron para su análisis.

Paso 10. Se consideró como muestras válida toda aquella en la que se logró amplificar el fragmento correspondiente al control de proceso. Y como muestra positiva, toda aquella que mostró un producto de PCR de un tamaño aproximado 450 a 470 bp.

3.7. Materiales usados para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BoPV de las muestras positivas, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4):

3.7.1 Biológicos



Muestras de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) total puro, de la muestra positivas a la amplificación de material genético de los BoPV.

3.7.2. Reactivos y soluciones

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Se preparación de alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas del polvo.

Enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033), con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución a 50 mM de MgCl₂. Se prepararon alícuotas de las soluciones y se almacenaron a -20 °C, protegidas de la luz directa.

Solución de dNTP's 10 mM de cada uno (Trifosfato de Desoxinucleótidos) (dNTP's set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C y protegidas de la luz directa.

Solución de oligonucleótidos o primers 100 μM (Invitrogen). Par de oligonucleótidos específicos para la detección de material genético de los VPBo (FAP59For: **TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT**, FAP64Rev: **CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC**).

Soluciones de ADN total: ADN total de muestras positivas a la determinación de la presencia de material genético de BoPV, siguiendo el proceso antes descrito (**Sección 3.6**). Las alícuotas se mantuvieron almacenadas a -20°C y protegidas de la luz directa.

Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

Solución buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

Solución de Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

Solución Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

Enzima de restricción *DdeI* (Thermo scientific, Cat. No.: ER1882)

Enzima de restricción *HinfI* (Thermo scientific, Cat. No.: ER0801)

Enzima de restricción *MspI* (Thermo scientific, Cat. No.: ER2001)



Enzima de restricción *Hind*III (Thermo scientific, Cat. No.: ER0501)

3.7.3. Equipos y otros materiales

Set de micropipetas (1 ml, 200 μ l, 50 μ l y 20 μ l con puntas estériles)

Vortex.

Microcentrifuga refrigerada.

Cabina de PCR.

Termociclador Nexus (Eppendorf).

Congelador a -20°C, sin descongelamiento automático (Almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).

Incubadora bacteriológica a 37 °C.

Fuente de poder.

Cámara de electroforesis horizontal.

Balanza analítica (Mantener calibrada).

Horno de microondas.

Transiluminador UV.

Fotodocumentador UV-Impresora.

Potenciómetro (pHmetro).

Platina de agitación y calentamiento.

3.8. Métodos aplicados en la realización del proceso para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BoPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4):

3.8.1. Pasos ejecutados

Paso 1. Se descongelaron los reactivos necesarios para la amplificación (Agua grado biología molecular, Solución buffer de amplificación 10X, Solución de dNTP's, Solución de MgCl₂, Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes a las muestras positivas a la presencia de material genético de los BoPV).

Paso 2. Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, se preparó una premezcla con el

volumen requerido para el número de muestras a analizar (25 μ l de volumen final por reacción), colocando en el orden indicado los siguientes reactivos, con la excepción de las muestra de ADN total:

Tabla N° 4: Volúmenes requeridos para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BoPV.

| Reactivos: | Concentración | | Volumen | |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-------------------|
| | inicial: | final: | por reacción: | de premezcla*: |
| Agua grado biología molecular | No aplica | No aplica | 18.65 μ l | 18.65 μ l X n |
| Solución buffer de amplificación 10X | 10X | 1X | 2.5 μ l | 2.5 μ l X n |
| Solución de dNTP's | 10 mM | 0.1 mM | 0.5 μ l | 0.5 μ l X n |
| Solución de MgCl ₂ | 50 mM | 2.0 mM | 1.0 μ l | 1.0 μ l X n |
| Oligonucleótido FAP59For | 100 μ M | 0.8 μ M | 0.2 μ l | 0.2 μ l X n |
| Oligonucleótido FAP64Rev | 100 μ M | 0.8 μ M | 0.2 μ l | 0.2 μ l X n |
| Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa | 5 U/ μ l | 0.04 U/ μ | 0.2 μ l | 0.2 μ l X n |
| Muestra de ADN total | ---- μ g/ μ l | ---- μ g/ μ l | 2.0 μ l | 2.0 μ l X n |
| Volumen final: | ----- | ----- | 25 μ l | 25 μ l X n |

* n = Número de muestras.

Fuente: Karina Rodríguez A..

Paso 3. La premezcla preparada se mezcló en el vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

Paso 4. Se marcaron los tubos de PCR (200 μ l) y les fue colocado 23 μ l de la premezcla y se les adicionó 2 μ l de la muestra correspondiente.

Paso 5. Las reacciones así preparadas se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BoPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.

Tabla N° 5: Perfil de temperatura para generar los productos de PCR de los BPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.

Continuación Tabla N° 5

| Desnaturalización inicial | 35 ciclos | | | Extensión final |
|------------------------------|-------------------|--------------|-----------|--------------------|
| | Desnaturalización | Alineamiento | Extensión | |
| Temperatura (°C): | 94 | 94 | 52 | 72 |
| Tiempo (min:seg): | 05:00 | 00:45 | 00:30 | 00:45 |

Fuente: Karina Rodríguez Arias.

Paso 6. De cada una de las reacciones de amplificación se confirmó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.6% teñido con Bromuro de etidio siguiendo lo ya descrito (**Paso 7, Sección 3.6**)

Paso 7. Una vez confirmada la presencia del los producto de PCR esperados, se tomó de cada reacción 8.5 μ l y se le adición 1 μ l de la Solución buffer de digestión correspondiente a cada enzima de restricción (Enzimas *DdeI*, *HinfI* y *MsLI*, Buffer Tango 10X y enzima *HindIII*, Buffer R 10X), a la mezcla se le adicionó 0.5 μ l de la enzima correspondiente (5 U en total).

Paso 8. Junto con las reacciones así preparadas se incubaron a 37 °C en una incubadora bacteriológica durante 2 h los controles de cada una de las muestras positivas, los cuales consistieron en la misma cantidad del producto de PCR (8.5 μ l) con el Buffer Tango 10X y en lugar de enzima 0.5 μ l de agua grado biología molecular.

Paso 9. Los fragmentos generados en el proceso de digestión con cada una de las enzimas de restricción fueron resueltos en un gel de agarosa-TAE al 1.6%, sometiendo al mismo a 90 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel.

Paso 10. Una vez resueltos los fragmentos generados, se fotodocumentaron para su análisis.

Paso 11. Para la identificación de cada uno de los tipos de BoPV se empleó los patrones de restricción esperados (ver **Anexo 3**) y la imagen fotodocumentada de la electroforesis de las reacciones de digestión con las 4 enzimas y el control sin digestión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de la colecta de muestras

De un total de 53 animales de los que se tomaron muestras de orina ($n = 50$), tejido de vejiga urinaria ($n = 30$) y de sangre periférica ($n = 52$), incluidos en el presente trabajo, 31 de ellos correspondieron a los sacrificados en los camales de Azogues, Cuenca y Paute (animales número 1 al 31); únicamente en 11 de ellos se observó presencia de sangre en la orina (hematuria), por lo que se visitó la zona de Zaruma, en donde se muestraron 22 animales, colectándose muestras de orina con presencia de sangre (**Tabla 6**).

Adicionalmente, en 30 animales se observó la presencia de lesiones sugestivas a papilomas cutáneos, 10 de éstos animales presentaron además el signo clínico de hematuria, 6 de ellos (60%) se muestraron en Zaruma. Las características clínicas de los animales incluidos en el presente estudio y el tipo de muestras colectadas de cada uno de ellos se describen en **Tabla 6**.

Tabla 6: Presencia de lesiones sugestivas a papilomatosis en piel y / o signos clínicos de hematuria en los animales en los que se colectaron las muestras de orina, tejido de vejiga y sangre periférica.

| Bovino: | Lesiones – signos: | | Muestras | Identificación de la muestra: |
|---------|---------------------|------------|------------------|-------------------------------|
| | Papilomas cutáneos: | Hematuria: | | |
| 1 | - | Si | Orina | O1 |
| | | | Tejido de vejiga | T1 |
| 2 | Si | - | Orina | O2 |
| | | | Tejido de vejiga | T2 |
| | | Sangre | | S1 |
| 3 | Si | - | Orina | O3 |
| | | | Tejido de vejiga | S2 |
| | | | | |
| 4 | Si | - | Orina | O4 |
| | | | Tejido de vejiga | T3 |
| | | | Sangre | S3 |



Continuación Tabla N° 6:

| Bovino: | Lesiones – signos: | | Muestras | Identificación de la muestra: |
|---------|---------------------|------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| | Papilomas cutáneos: | Hematuria: | | |
| 5 | Si | Si | Orina Tejido de vejiga | O5 T4 |
| 6 | Si | - | Sangre Tejido de vejiga Sangre | S4 T5 S5 |
| 7 | Si | - | Tejido de vejiga Sangre | T6 S6 |
| 8 | Si | - | Orina Tejido de vejiga Sangre | O6 T7 S7 |
| 9 | - | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O7 T8 S8 |
| 10 | - | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O8 T9 S9 |
| 11 | Si | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O9 T10 S10 |
| 12 | - | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O10 T11 S11 |
| 13 | Si | - | Orina Tejido de vejiga Sangre | O11 T12 S12 |

Continuación Tabla N° 6:

| Bovino: | Lesiones – signos: | | Muestras | Identificación de la muestra: |
|---------|---------------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| | Papilomas cutáneos: | Hematuria: | | |
| 14 | Si | - | Tejido de vejiga Sangre | T13 S13 |
| 15 | Si | - | Orina Tejido de vejiga Sangre | O12 T14 S14 |
| 16 | - | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O13 T15 S15 |
| 17 | - | Si | Orina Sangre | O14 S16 |
| 18 | Si | - | Orina Tejido de vejiga Sangre | O15 T16 S17 |
| 19 | Si | - | Orina Tejido de vejiga Sangre | O16 T17 S18 |
| 20 | Si | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O17 T18 S19 |
| 21 | Si | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O18 T19 S20 |
| 22 | - | Si | Orina Tejido de vejiga Sangre | O19 T20 S21 |

Continuación Tabla N° 6

| Lesiones – signos: | | | | |
|--------------------|---------------------|------------|------------------|-------------------------------|
| Bovino: | Papilomas cutáneos: | Hematuria: | Muestras | Identificación de la muestra: |
| 23 | Si | - | Orina | O20 |
| | | | Tejido de vejiga | T21 |
| | | | Sangre | S22 |
| 24 | Si | - | Orina | O21 |
| | | | Tejido de vejiga | T22 |
| | | | Sangre | S23 |
| 25 | Si | - | Orina | O22 |
| | | | Tejido de vejiga | T23 |
| | | | Sangre | S24 |
| 26 | Si | - | Orina | O23 |
| | | | Tejido de vejiga | T24 |
| | | | Sangre | S25 |
| 27 | Si | - | Orina | O24 |
| | | | Tejido de vejiga | T25 |
| | | | Sangre | S26 |
| 28 | Si | - | Orina | O25 |
| | | | Tejido de vejiga | T26 |
| | | | Sangre | S27 |
| 29 | Si | - | Orina | O26 |
| | | | Tejido de vejiga | T28 |
| | | | Sangre | S28 |
| 30 | Si | - | Orina | O27 |
| | | | Tejido de vejiga | T29 |
| | | | Sangre | S29 |



Continuación Tabla N° 6:

| Bovino: | Lesiones – signos: | | Muestras | Identificación de la muestra: |
|---------|---------------------|------------|------------------|-------------------------------|
| | Papilomas cutáneos: | Hematuria: | | |
| 31 | Si | - | Orina | O28 |
| | | | Tejido de vejiga | T30 |
| | | | Sangre | S30 |
| 32 | Si | Si | Orina | O29 |
| | | | Sangre | S31 |
| 33 | Si | Si | Orina | O30 |
| | | | Sangre | S32 |
| 34 | Si | Si | Orina | O31 |
| | | | Sangre | S33 |
| 35 | Si | Si | Orina | O32 |
| | | | Sangre | S34 |
| 36 | Si | Si | Orina | O33 |
| | | | Sangre | S35 |
| 37 | Si | Si | Orina | O34 |
| | | | Sangre | S36 |
| 38 | - | Si | Orina | O35 |
| | | | Sangre | S37 |
| 39 | - | Si | Orina | O36 |
| | | | Sangre | S38 |
| 40 | - | Si | Orina | O37 |
| | | | Sangre | S39 |
| 41 | - | Si | Orina | O38 |
| | | | Sangre | S40 |
| 42 | - | Si | Orina | O39 |
| | | | Sangre | S41 |
| 43 | - | Si | Orina | O40 |
| | | | Sangre | S42 |
| 44 | - | Si | Orina | O41 |
| | | | Sangre | S43 |
| 45 | - | Si | Orina | O42 |
| | | | Sangre | S44 |

Continuación Tabla N° 6

| Bovino: | Lesiones – signos: | | Muestras | Identificación de la muestra: |
|---------|---------------------|------------|-----------------|-------------------------------|
| | Papilomas cutáneos: | Hematuria: | | |
| 46 | - | Si | Orina Sangre | O43 S45 |
| 47 | - | Si | Orina Sangre | O44 S46 |
| 48 | - | Si | Orina Sangre | O45 S47 |
| 49 | - | Si | Orina Sangre | O46 S48 |
| 50 | - | Si | Orina Sangre | O47 S49 |
| 51 | - | Si | Orina Sangre | O48 S50 |
| 52 | - | Si | Orina Sangre | O49 S51 |
| 53 | - | Si | Orina Sangre | O50 S52 |

Fuente: Karina Rodríguez A.

4.1.2. Resultados de la Validación de los procesos de colecta, conservación, procesamiento y purificación del material genético de las muestras de bovinos colectadas.

De cada una de las muestras colectadas, preservadas, transportadas y almacenadas de acuerdo a lo descrito en la sección de material y métodos fueron procesadas, y de ellas se obtuvo ADN total purificado siguiendo los pasos descritos en la misma sección.

La factibilidad de cada una de las muestra de ADN total, de ser útiles para la detección de material genético de los BoPV fue determinada mediante la amplificación de un segmento de ADN genómico del bovino, correspondiente a la secuencia codificante del gen ribosomal 12S (ver **Figura 1**). Del total de muestras procesadas ($n = 132$), en 6 de ellas no se logró generar el fragmento de PCR esperado en éste control de proceso, por lo que el resultado en la detección de los BoPV no se consideró válido. De las 6 muestras inválidas, 5 de ellas correspondieron a muestras de tejido de vejiga urinaria y una de ellas a sangre periférica.

De las muestras analizadas, correspondientes a sangre periférica, orina y tejidos de vejiga urinaria,

mismas que resultaron en su gran mayoría negativas; siguiendo todos los procedimientos para la detección de BoPV, se logró identificar un 2% de muestras positivas.

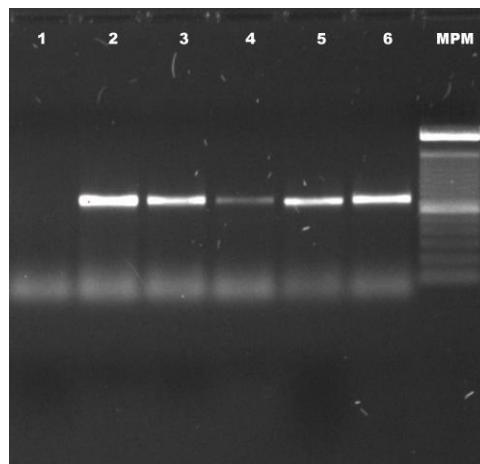


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.2% de los productos de PCR del control de proceso. Carril 1: Control negativo, Carriles 2, 3, 4: Productos de PCR; y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder).

4.1.3. Detección y genotipificación de los BoPV en las muestras colectadas

De las 126 muestras válidas, es decir, factibles de ser empleadas en el ensayo de detección de material genético de BoPV se encontró en una de ellas un producto de PCR compatible con el tamaño esperado del amplicón (entre 450 a 470 bp) (ver **Figura 2**, Carril: 5). La muestra positiva a la detección de material genético de los BoPV correspondió a una muestra de sangre colectada en uno de los bovinos muestreados en Zaruma (ver **Tabla 7**).

El producto de PCR obtenido fue sometido a un proceso de digestión con las enzimas de restricción, posteriormente las reacciones de digestión fueron resueltas en una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.6% teñido con Bromuro de etidio (ver **Figura 2**). Posterior a un análisis empleando las predicciones de los patrones de restricción esperados para cada uno de los 15 tipos de BoPV (ver **Anexo 3**), se determinó la presencia de una mezcla de material genético de BoPV tipo 3 y tipo 6.

Basandonos en nuestro resultado, (muestra de tejido sanguíneo), comparando con lo que describe Santos *et al.*, (2016), quien detectó la presencia de 7 de 9 tipos de BoPV (BoPV 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10) en sangre periférica de ganado bovino, en la muestra que resultó positiva, se pudo observar una mezcla o coinfección con los BoPV 3 y 6 con el uso del ensayo de RFLP descrito por Carvalho, *et*

al., (2012); estos tipos de BoPV también han sido descritos por otros autores, en donde encuentran la presencia incluso de otros tipos de virus en una misma muestra (BoPV 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10) (Santos *et al.*, 2016), resaltando la presencia más frecuente de BoPV 1 y 2, en sangre y plasma sanguíneo, lo cual sugiere que éstos tipos de BoPV pueden estarse diseminando por todo el organismo a través del torrente sanguíneo (Diniz *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo anterior, con los resultados obtenidos, por el limitado número de muestras positivas; la única muestra positiva correspondió a la infección en sangre por los BoPV 3 y 6, no fue posible realizar un análisis estadístico para establecer una posible utilidad diagnóstica de la infección en vejiga urinaria por los BoPV con el empleo de sangre u orina como muestras clínicas *ante morten*.

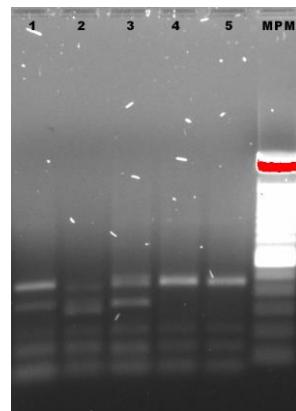


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.6% del perfil de digestión del producto de PCR de la muestras positiva a BoPV (RFLP). Carril 1: Producto de PCR digerido con la enzima *DdeI*; Carril 2: Producto de PCR digerido con la enzima *HinfI*; Carril 3: Producto de PCR digerido con la enzima *MsLI*; Carril 4: Producto de PCR digerido con la enzima *HindIII*; Carril 5: Producto de PCR no digerido y Carril MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder.

Tabla 7: Resultado de los ensayos de PCR y RFLP en cada una de las muestras de orina, tejido de vejiga urinaria y sangre de los bovinos muestrados, para identificación de BoPV.

| Bovino: Muestra: | | Control de proceso: | Detección y genotipificación de BoPV: | | |
|------------------|----|---------------------|---------------------------------------|-------|----------------------------|
| | | | PCR: | RFLP: | Tipo de BoPV identificado: |
| 1 | O1 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T1 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 2 | O2 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T2 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S1 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 3 | O3 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S2 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 4 | O4 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T3 | No Válida | ----- | ----- | ----- |
| | S3 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 5 | O5 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T4 | No Válida | ----- | ----- | ----- |
| | S4 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 6 | T5 | No Válida | ----- | ----- | ----- |
| | S5 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 7 | T6 | No Válida | ----- | ----- | ----- |
| | S6 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 8 | O6 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T7 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S7 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 9 | O7 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T8 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S8 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 10 | O8 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T9 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S9 | Válida | Negativo | ----- | ----- |

Continuación Tabla N° 7

| Bovino: Muestra: | | Control de proceso: | Detección y genotipificación de BoPV: | | |
|------------------|-----|---------------------|---------------------------------------|-------|----------------------------|
| | | | PCR: | RFLP: | Tipo de BoPV identificado: |
| 11 | O9 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T10 | No Válida | ----- | ----- | ----- |
| | S10 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 12 | O10 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T11 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S11 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 13 | O11 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T12 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S12 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 14 | T13 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S13 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 15 | O12 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T14 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S14 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 16 | O13 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T15 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S15 | No Válida | ----- | ----- | ----- |
| 17 | O14 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S16 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 18 | O15 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T16 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S17 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 19 | O16 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T17 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S18 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 20 | O17 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T18 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S19 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 21 | O18 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T19 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S20 | Válida | Negativo | ----- | ----- |

Continuación Tabla N° 7

| Bovino: Muestra: | | Control de proceso: | Detección y genotipificación de BoPV: | | |
|------------------|-----|---------------------|---------------------------------------|-------|----------------------------|
| | | | PCR: | RFLP: | Tipo de BoPV identificado: |
| 22 | O19 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T20 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S21 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 23 | O20 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T21 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S22 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 24 | O21 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T22 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S23 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 25 | O22 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T23 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S24 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 26 | O23 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T24 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S25 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 27 | O24 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T25 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S26 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 28 | O25 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T26 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S27 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 29 | O26 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T28 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S28 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 30 | O27 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T29 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S29 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 31 | O28 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | T30 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S30 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 32 | O29 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S31 | Válida | Negativo | ----- | ----- |

Continuación Tabla N° 7

| Bovino: Muestra: | | Control de proceso: | PCR: | RFLP: | Detección y genotipificación de BoPV: Tipo de BoPV identificado: |
|------------------|-----|---------------------|----------|---------------|--|
| 33 | O30 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S32 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 34 | O31 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S33 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 35 | O32 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S34 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 36 | O33 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S35 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 37 | O34 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S36 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 38 | O35 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S37 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 39 | O36 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S38 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 40 | O37 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S39 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 41 | O38 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S40 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 42 | O39 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S41 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 43 | O40 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S42 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 44 | O41 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S43 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 45 | O42 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S44 | Válida | Positivo | Identifiable. | Mezcla de BoPV tipo 3 y 6. |
| 46 | O43 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S45 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 47 | O44 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S46 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 48 | O45 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S47 | Válida | Negativo | ----- | ----- |

Continuación Tabla N° 7

| Bovino: Muestra: | | Control de proceso: | PCR: | RFLP: | Detección y genotipificación de BoPV: Tipo de BoPV identificado: |
|------------------|-----|---------------------|----------|-------|---|
| 49 | O46 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S48 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 50 | O47 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S49 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 51 | O48 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S50 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 52 | O49 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S51 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| 53 | O50 | Válida | Negativo | ----- | ----- |
| | S52 | Válida | Negativo | ----- | ----- |

Fuente: Karina Rodríguez A.

En cuanto al caso particular de las muestras de tejido de vejiga urinaria colectados, no se detectó la presencia de material genético de los BoPV, los resultados obtenidos contrastan con lo descrito por Cota *et al.*, (2014) quienes identifican la presencia de BoPV 2 en este tipo de tejido con presencia de una lesión visible o en ausencia de ella.

Adicionalmente también detectaron el mismo tipo de virus en lesiones de papilomas cutáneos superficiales. Según Scala *et al.*, (2014) la presencia de lesiones en vejiga urinaria, ya sea severas o microscópicas en animales que consumen en forma crónica helecho común, crea en el animal una inmunosupresión en la que en los animales disminuyen la capacidad de las células asesinas naturales que podrían controlar la infección de los BoPV tipo 2 o 4, principalmente.

La situación descrita favorece el desarrollo de tumores que al inicio son de carácter benigno, transformándose posteriormente en malignos (Borzacchiello *et al.*, 2003); en los tejidos de las vejigas urinarias de los animales que se incluyeron el presente trabajo no se identificó neoplasias lo cual sugiere que en ellos no se completó todos los factores descritos, entre ellos la infección por BoPV que favorecen el desarrollo de ésta patología.

Estudios orientados a identificar la presencia de BoPV en orina de animales afectados por papilomatosis bovina, demuestran su presencia mediante el análisis de las células epiteliales, obtenidas por sedimentación, en los cuales se encontró con mayor frecuencia los tipos BoPV 2 y 4; lo que sugiere vías alternas de transmisión de la enfermedad, en este caso se sugiere que los pastos contaminados con orina procedente de animales infectados por papilomatosis bovina pueden



favorecer la transmisión de la enfermedad (Lindsey *et al.*, 2009).

El estudio correspondiente a la detección de la presencia de BoPV tipo 2 y 4, en muestras de orina (Lindsey *et al.*, 2009), no coincide con las muestras analizadas en nuestra investigación, en base a lo cual no se detectó ninguna muestra positiva a la presencia de material genético de BoPV. Las muestras incluidas en el presente trabajo se colectaron de animales que mostraron la presencia de sangre en la orina, lo cual es sugestivo de tratarse de animales afectados por HVEB y que podrían presentar lesiones en el tejido vesical (Campo *et al.*, 1992), lo cual en varios casos si se pudo constatar, sin embargo, como ya se comentó, los tejidos de vejiga analizados tampoco mostraron la presencia de material genético de BoPV, considerando solamente la muestra sanguínea como positiva para nuestro estudio.

5. CONCLUSIONES

- En la presente investigación, se analizaron 132 muestras biológicas, las mismas que se colectaron de bovinos sacrificados en camales y de una zona con alta incidencia de HVEB; las muestras correspondieron a sangre periférica, orina y tejido de vejiga urinaria, todas las muestras colectadas fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Con el ensayo de PCR para Válidar el proceso de colecta se logró evaluar la calidad de las 126 muestras, es decir, en 6 de ellas no se logró obtener material genético susceptible de ser amplificado mediante el ensayo de PCR. Lo anterior sugiere que las muestras negativas en el ensayo de PCR para la detección de ADN genómico de BoPV lo son porque no hay material genético de los virus, en una concentración menor a la detectable o los oligonucleótidos empleados no son capaces de mediar la amplificación; pero no son negativas por situaciones durante el proceso que dañaron las muestras e interfirieron con la detección de los BoPV.
- En el ensayo de PCR para la identificación de ADN de BoPV resultó apenas una muestra positiva de las 132 colectadas, específicamente de sangre bovina, colectada *ante mortem*, obtenida de animales procedente de la provincia de El Oro, cantón Zaruma, identificándose en la muestra positiva una coinfección con tipos de virus 3 y 6. Con tal antecedente, las únicas muestras válidas para la identificación de BoPV, son las pertenecientes a sangre periférica.
- Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que con los oligonucleótidos FAP59-FAP64 no se puede identificar la presencia de todos los tipos de BoPV presentes en animales enfermos, por lo cual sería importante utilizar nuevos oligonucleótidos para su detección.

6. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos con las muestras analizadas, se sugiere ampliar este estudio con la colecta de muestras de animales de una edad mayor pertenecientes a zonas donde se haya reportado la presencia de HVEB; animales que hayan presentado signos de HVEB clínica, debido a que es posible que estos animales tengan un mayor desarrollo de lesiones vesicales de tipo tumoral, lo que facilitará la obtención de tejido para la posible detección de ADN viral , así como también, la observación de papilomas cutáneos para poder determinar su relación con la enfermedad; también sería necesario el muestreo de un mayor número de animales de donde se obtuvo la muestra positiva (Zaruma), debido a la gran incidencia en la zona y el problema que esta enfermedad repercute en esta provincia y el Ecuador en general.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, J. M., Alvarado, C., & Romero, R. (2013). Hematuria vesical bovina (UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO). Zaruma, Provincia de El Oro: Digrifica S.A.
- Batista M.V., M.A. Silva, N.E. Pontes, M.C. Reis, A. Corteggio, R.S. Castro, G. Borzacchiello, V.Q. Balbino & A.C. Freitas. (2013). Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Vet J.* 197(2), 368-373. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.01.019
- Bautista, M. M. (2011). Diagnóstico anatomo-patológico e histopatológico de hematuria enzoótica bovina en el camal frigorífico de la ciudad de Loja. Universidad Nacional de Loja, 1-124.
- Bergvall, M., T. Melendy & J. Archambault. (2013). The E1 proteins. *Virology.* 445(1-2):35-56. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.020
- Borzacchiello G., G. Lovane, M. Marcante, F. Poggiali, F. Roperto, S. Roperto & A. Venuti. (2003). Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J Gen Virol.* 84(Pt 11), 2921-2926.
- Borzacchiello G. & F. Roperto (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 39(5):45. 1-19. DOI: 10.1051/vetres:2008022
- Borzacchiello G., V. Russo, F. Gentile, F. Roperto, A. Venuti, L. Nitsch, M. S. Campo, S. Roperto. (2006). Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor β receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene.* 25(8). 1251–1260. DOI:10.1038/sj.onc.1209152
- Bulnes, C., & Calderón Tobar, Á. (2014). Lesiones asociadas a la Hematuria Enzoótica Bovina en animales de matadero de la provincia Bolívar Ecuador. *Rev. Salud Anim,* 36(2), 97-105.
- Campo, M. S., (1995). Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends Microbiol.* 3(3), 92–97.
- Campo, M. S., & W. F. Jarrett. (1986). Papillomavirus infection in cattle: viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumours. *Ciba Found. Symp.* 120, 117–135.
- Campo M. S., W. F. H. Jarrett, R. Barron, B. W. O'Neil, & K. T. Smith. (1992). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res.*

52(24), 6898-904.

- Carvalho, C. C., M. V. Batista, M. A. Silva, V. Q. Balbino, & A. C. Freitas. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 441–447. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01296.
- Carvalho T., C. Pinto, & M. C. Peleteiro. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *J Comp Pathol.* 134(4):336-346.
- Carvalho R.F., S.T. Sakata, D.N. Giovanni, E. Mori, P.E. Brandão, L.J. Richtzenhain, C.R. Pozzi, J.R. Arcaro, M.S. Miranda, J. Mazzuchelli-de-Souza, T.C. Melo, G. Comenale, S.L. Assaf, W. Beçak & R.C. Stocco. (2013). Bovine papilloma virus in Brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *Biomed Res Int.* DOI: 10.1155/2013/270898.
- Cota, J. B., M. C. Peleteiro, L. Petti, L. Tavares & A. Duarte. (2015). Detection and quantification of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladders and lymph nodes in cases of bovine enzootic Hematuria from the endemic region of Azores. *Vet Microbiol.* 178, 138-143.
- Dávalos, J. & M. Hinojosa. (2011). Estudio de la papilomatosis bovina en cinco propiedades de ganadería de leche, en el cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha. 1-194.
- Diniz, N., T. C. Melo, J. F. Santos, E. Mori, P. E. Brandao, L. J. Richtzenhain & R. C. Scotto. (2009). Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco. *Genet Mol Res.* 8(4):1474-1480. DOI: 10.4238/vol8-4gmr668.
- Doorslaer, K., Q. Tan, S. Xirasagar, S. Bandaru, V. Gopalan, Y. Mohamoud, Y Huyen & A. A. McBride. (2012). The Papillomavirus Episteme:a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res.* 41, 571-578. DOI:10.1093/nar/gks984.
- Freitas, A. C., C. Carvalho, O. Brunner, E. H. Jr Birgel, A. M. D. Libera, F. J. Benesi, W. Bec_ak & R. C. Stocco dos Santos. 2003. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol.* 34. 76–78.
- Gil da Costa R. M., P. A. Oliveira, M. M. Bastos, C. C. Lopes & C. Lopes. (2014). Ptaquiloside-induced early-stage urothelial lesions show increased cell proliferation and intact β -Catenin and E-cadherin expression. *Environ Toxicol.* 29(7):763-769. DOI: 10.1002/tox.21803.
- González C., A Chavera, R. Perales , N. Falcón, & R. Evaristo. (2004). Caracterización de las



- lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de Oxapampa, Pasco. Rev Inv Vet. 15 (1). 25-36.
- Kumar, P., N. Nagarajan, G. Saikumar, R. S. Arya, and R. Somvanshi. (2013) Detection of bovine papilloma viruses in wart-like lesions of upper gastrointestinal tract of cattle and buffaloes. Transbound. Emerg. Dis. 63, 56–67.
- Latorre A. O., B. D. Caniceiro, H. Fukumasu, D. R. Gardner, F. M. Lopes, H. L. Wysochi, T. C. da Silva, M. Haraguchi, F. F. Bressan & S. L. Górnjak. (2013). Ptaquiloside reduces NK cell activities by enhancing metallothionein expression, which is prevented by selenium. Toxicology. 304. 100–108. doi: 10.1016/j.tox.2012.12.010
- Lindsey, C. J., M. E. Almeida, C. F. Vicari, C. Carvalho, A. Yaguiu, A. C. Freitas & R. C. Stocco. (2009). Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. Genet Mol Res. 8(1), 310-318.
- Literak, I., Y. Tomita, T. Ogawa, H. Shirasawa, B. Smid, L. Novotny & M. Adamec. (2006) Papillomatosis in a European bison. J. Wildl. Dis. 304. 149–153.
- Lohr, C. V., C. Juan-Salles, A. Rosas-Rosas, A. Paras Garcia, M. M. Garner, & J. P. Teifke. (2005). Sarcoids in captive zebras (*Equus burchellii*): association with bovine papillomavirus type 1 infection. J. Zoo Wildl. Med. 36, 74–81.
- Lunardi, M., B. K. de Alcantara, R. A. Otonel, W. B. Rodrigues, A. F. Alfieri, & A. A. Alfieri. (2013). Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. J. Clin. Microbiol. 51, 2167–2171.
- Marín, R. E. (2011). Aportes al conocimiento de las plantas tóxicas para el ganado en la provincia de Jujuy. MINISTERIO DE PRODUCCIÓN DE JUJUY DIRECCIÓN PROVINCIAL DE DESARROLLO GANADERO. 1-60
- Maxie M. G. & S. J. Newman (2007). The urinary system, in Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 518–520.
- Marrero, E., & Calderón, Á. (2012). Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria enzoótica bovina por *Pteridium spp.* un problema relevante de salud. Salud animal. 34(3), 137-143.
- Munday, J. (2014). Bovine and human papillomaviruses: A comparative review. Vet Pathol. 51(6), 1-14. DOI: 10.1177/0300985814537837.



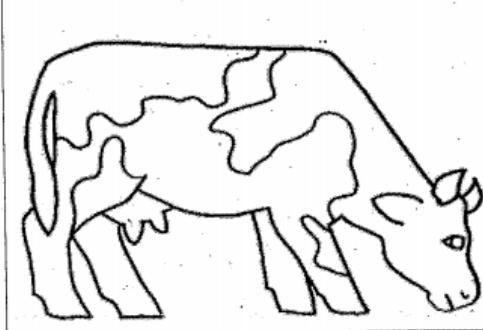
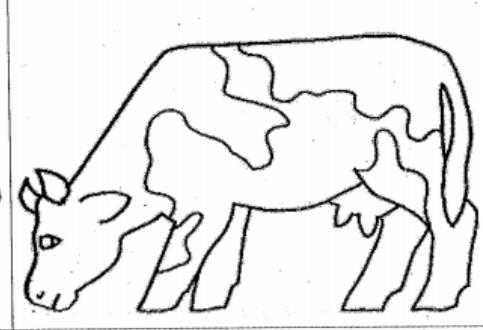
- Nasir, L., and M. S. Campo, (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet. Dermatol.* 19(5), 243–254.
- Ogawa, T., Y. Tomita, M. Okada, K. Shinozaki, H. Kubonoya, I. Kaiho, & H. Shirasawa. (2004). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol.* 85, 2191–2197.
- Pangty, K., S. Singh, R. Goswami, G. Saikumar, & R. Somvanshi. (2010). Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. *Transbound Emerg Dis.* 57, 185–196.
- Pamukcu A. M., J. M. Price, and G. T. Bryan. (1976). Naturally occurring and bracken fern induced bovine urinary bladder tumors. Clinical and morphological characteristics. *Vet Pathol.* 13(2), 110–122.
- Pamukcu, A. M. (1955). Investigations on the pathology of enzootic bovine Haematuria in Turkey. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin.* 2(5), 409-429. DOI: :10.1111/j.1439-0442.1955.tb00083.x
- Pavelski, M., Ollhoff, R. D., Barros Filho, I. R., Deconto, I., Biondo, A. W., & Dornbusch, P. T. (2014). Evaluation of urine dipstick and cystoscopy in bovine enzootic haematuria. *Semina: Ciencias Agrarias.* 35(3), 1369-1376.
- Roperto, S., R. Brun, F. Paolini, C. Urraro, V. Russo, G. Borzacchiello, U. Pagnini, C. Raso, C. Rizzo, F. Roperto & A. Venuti. (2008). Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. *J Gen Virol.* 89, 3027–3033.
- Roperto, S., G. Borzacchiello, R. Brun, L. Leonardi, P. Maiolino, M. Martano & F. Roperto. (2010). A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. *J Comp Pathol.* 142(2-3), 95-108.
- Roperto S., R. de Tullio, C Raso, R. Stifanese, V. Russo, M. Gaspari, G. Borzacchiello, M. Averna, O. Paciello, G. Cuda & F. Roperto. (2010). Calpain3 is expressed in a proteolitically active form in papillomavirus-associated urothelial tumors of the urinary bladder in cattle. *PLoS ONE.* 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010299>.
- Sánchez, A., C. M. Arraga de Alvarado, D. García Bracho, D. Pino Ramírez, , N. R. Villaroel & J. Boscán Ocando. (2004). Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *FCV-Luz*, 14(4), 317-323.



- Sánchez, A., R. Villaroel, D. Pino, D. García, G. Molero & D. de Carrasco. (2003). Evaluación comparativa de diferentes métodos de control de la hematuria enzoótica bovina. FCV LUZ, 13(1), 33-37.
- Santos E. M. Silva, N. E. Pontes, L. C. A. Coutinho, S. S. L. Paiva , R. S. Castro & A. C. Freitas. (2016). Detection of different bovine papillomavirus types and co-infection in bloodstream of cattle. *Transbound Emerg Dis.* 63(1):e103-8. DOI: 10.1111/tbed.12237
- Scala, C., K.Ortiz, J. Catinaud & K. Lemberger. (2014). Hematuria and urinary bladder lesions compatible with bracken fern (*pteridium aquilinum*) intoxication in captive fallow deer (DAMA DAMA). *BioOne*, 45(2), 380-385.
- Schmitt, M., V. Fiedler & M. Muller, 2010: Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *J Virol Methods*. 170, 67–72.
- Silva, M. A., G. Altamura, G. Altamura, A. Corteggio, F. Roperto, F. Bocaneti, E. Velescu, A. C. Freitas, C. C. Carvalho, K. P. Cavalcanti & G. Borzacchiello. (2013). Expression of connexin 26 and bovine papillomavirus E5 in cutaneous fibropapillomas of cattle. *Vet J*. 195(3):337-343. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.07.009
- Silvestre, O., G. Borzacchiello, D. Nava, G. Iovane, V. Russo, D. Vecchio, F. D'Ausilio, E. A. Gault, M. S. Campo, & O. Paciello. (2009). Bovine papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. *Vet Pathol*. 46, 636–641.
- Singh, V., R. Somvanshi & A. K. Tiwari. (2009). Papillomatosis in Indian cattle: occurrence and etiopathology. *Indian J. Vet Pathol*. 33, 52–57.
- Shahin M., B. L. Smith & A. S. Prakash. (1999). Bracken carcinogens in the human diet. *Mutat Res.* 443(1-2), 69– 79.
- Torres J. E. & J. J. Ramírez. (1983). Salud bovina en el área sur del Tolima, papel de los centros de diagnóstico. ICA, 41-45.
- Villiers, E. M, T. B. Fauquet, H. U. Bernard & H. Zur Hausen. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324(1), 17-27.

8. ANEXOS

Anexo 1: Formato para la colecta de datos de los animales muestrados.

| | | | | | | | |
|---|--|---|--|--|-----------|---------|-----------|
| Formulario número: | 13 | Fecha: | 07/04/2013 | | | | |
| Raza: | Yes. 2a | Identificación del animal: | Arete oficial: <input type="checkbox"/> Otro arete: <input type="checkbox"/> Otra identificación: <input type="checkbox"/> | 0-6 mes: <input type="checkbox"/> 6-12 meses: <input type="checkbox"/> Edad: 12-18 meses: <input type="checkbox"/> 18-24 meses: <input type="checkbox"/> > 24 meses: <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| Productor: | Leche: <input checked="" type="checkbox"/> Carne: <input type="checkbox"/> | Sexo: | Macho: <input type="checkbox"/> Hembra: <input checked="" type="checkbox"/> | | | | |
| Propietario: | JOSÉ RAYMÓN | | | C.I. 0101156492 | | | |
| Lugar de procedencia: | SAN FERNANDO | | | Feria: <input type="checkbox"/> Exposición: <input type="checkbox"/> | | | |
| Origen: | Feria: <input type="checkbox"/> Exposición: <input type="checkbox"/> Predio: <input checked="" type="checkbox"/> Otro: <input type="checkbox"/> | Destino: <input type="checkbox"/> Predio: <input type="checkbox"/> Camal: <input checked="" type="checkbox"/> Otro: <input type="checkbox"/> | | | | | |
| Tipo de alimento: | Balanceado: <input type="checkbox"/> Forraje: <input checked="" type="checkbox"/> Rechazo: <input type="checkbox"/> Otro: <input type="checkbox"/> | Fuente de agua: <input type="checkbox"/> Potable: <input type="checkbox"/> Río: <input checked="" type="checkbox"/> Acequia: <input type="checkbox"/> Bebederos: <input type="checkbox"/> | Helechos en la área de pastoreo: <input type="checkbox"/> Si: <input type="checkbox"/> No: <input checked="" type="checkbox"/> No sabe: <input type="checkbox"/> | Si: <input type="checkbox"/> No: <input type="checkbox"/> No sabe: <input type="checkbox"/> | | | |
| | Presencia de heridas en los animales: <input type="checkbox"/> No: <input checked="" type="checkbox"/> No sabe: <input type="checkbox"/> | Presencia de moscas: <input type="checkbox"/> Si: <input type="checkbox"/> No: <input checked="" type="checkbox"/> No sabe: <input type="checkbox"/> | Limpieza-desinfección de instrumental médico: <input type="checkbox"/> Si: <input type="checkbox"/> No: <input checked="" type="checkbox"/> No sabe: <input type="checkbox"/> | | | | |
| Reproducción de los animales: <input type="checkbox"/> I. artificial: <input type="checkbox"/> | Monta: <input type="checkbox"/> Problemas sanitarios en: <input type="checkbox"/> Reproducción: <input type="checkbox"/> Leche: <input type="checkbox"/> Peso: <input type="checkbox"/> Otros: <input type="checkbox"/> | Presencia de sangre en: <input type="checkbox"/> Orina: <input type="checkbox"/> Leche: <input type="checkbox"/> Otro: <input type="checkbox"/> | | | | | |
| Lesiones: | | | | | | | |
| Localización: | Flanco izquierdo: | | Flanco derecho: | | | | |
| |  | |  | | | | |
| Muestras tomadas: | | | | | | | |
| Sangre: | | Tejido: | | Orina: | | Vejiga: | |
| Número: | Identif.: | Número: | Identif.: | Número: | Identif.: | Número: | Identif.: |
| 1 | 5010413 | 1 | | 1 | 0010413 | 1 | 1010413 |
| 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| 3 | | 3 | | 3 | | 3 | |
| 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| 5 | | 5 | | 5 | | 5 | |
| 6 | | 6 | | 6 | | 6 | |


Anexo 2: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de los BoPV.

| | | | |
|---|--|---------|------------------|
|  UNIVERSIDAD DE CUENCA <small>desde 1863</small> | Laboratorio de Biología Molecular | | 01-FE-MBM-TaqPol |
| | Versión: | 1 | |
| Formato de ensayo: <i>Taq ADN polimerasa</i> | | Fecha: | 2016.08.23 |
| | | Página: | 1 de 2 |

A.- Información del ensayo:

| Usuario: | | | |
|----------|-----------------------------|----------------------|-------------------|
| Fecha: | | Nombre del programa: | |
| No: | Nombre del producto de PCR: | Tamaño (bp): | Observaciones: |
| 1 | BoPV1- L1 | 530-960 | Detección de BoPV |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| 5 | | | |

B.- Mezcla de reacción:

| Reactivos: | Concentración | | Volumen | |
|---------------------------------|---------------|------------|---------------|---------------|
| | inicial: | final: | de premezcla: | por reacción: |
| Agua grado Biología Molecular. | No aplica. | No aplica. | 100 μl | 25 μl |
| Tampon de amplificación 10X. | 10X | 1X | 12.5 μl | 2.5 μl |
| Solución de dNTP's. | 10 mM | 0.1 mM | 1.25 μl | 0.25 μl |
| Solución de MgCl ₂ . | 50 mM | 2.5 mM | 0.5 μl | 0.1 μl |
| Oligonucleotido FAP59 -F. | 100 μM | 0.8 μM | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Oligonucleotido FAP64 -R. | 100 μM | 0.8 μM | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Oligonucleotido -F. | μM | μM | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Oligonucleotido -R. | μM | μM | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Oligonucleotido -F. | μM | μM | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Oligonucleotido -R. | μM | μM | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Enzima Taq ADN polimerasa. | 5 U/μl | 0.04 U/μl | 0.1 μl | 0.02 μl |
| Muestra de ADN total. | 10 μg/μl | 1 μg/μl | 10 μl | 2 μl |
| Volumen final: | | | 125 μl | 25 μl |

C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

| Paso: | Desnaturalización inicial: | Número de ciclos: 33 | | | | Extensión final: | Almacenamiento: |
|-----------------------|----------------------------|----------------------|---------------|------------|-------|------------------|-----------------|
| | | Desnaturalización: | Alineamiento: | Extensión: | | | |
| Tiempo (min , seg): | 55'' | 45'' | 30'' | 45'' | 55'' | | 8 |
| Temperatura (°C): | 94 °C | 94 °C | 60 °C | 72 °C | 72 °C | 4 °C | |

D.- Curva de temperatura de alineamiento:

| No: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| TM (°C): | | | | | | | | | | | | |
| Tubo No.: | | | | | | | | | | | | |
| Tubo No.: | | | | | | | | | | | | |
| Tubo No.: | | | | | | | | | | | | |



Anexo 3: Patrones de RFLP esperados de cada uno de los 15 tipos de BoPV con las enzimas de restricción *DdeI*, *HinfI*, *MsLI* y *HindIII*.

| Virus: | Producto de PCR (bp) | Enzima de restricción*: | | | |
|---------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> | <i>MsLI</i> | <i>HindIII</i> |
| VPB-1 | 475 | 264 159 52 | 329 146 | 301 174 | 475 |
| VPB-2 | 475 | 316 159 | 329 146 | 475 | 475 |
| VPB-3 | 473 | 319 154 | 473 | 373 87 13 | 473 |
| VPB-4 | 469 | 324 145 | 469 | 469 | 230 182 87 |
| VPB-5 | 469 | 469 | 254 145 70 | 469 | 469 |
| VPB-6 | 472 | 321 151 | 384 88 | 373 99 | 472 |
| VPB-7 | 484 | 403 81 | 271 119 94 | 484 | 484 |
| VPB-8 | 469 | 469 | 317 152 | 469 | 322 147 |
| VPB-9 | 469 | 316 153 | 344 125 | 469 | 469 |
| VPB-10 | 472 | 319 90 63 | 381 91 | 373 99 | 472 |
| VPB-11 | 475 | 420 55 | 407 68 | 370 105 | 475 |
| VPB-12 | 469 | 351 118 | 317 152 | 469 | 469 |
| VPB-13 | 475 | 316 109 50 | 329 146 | 475 | 475 |
| VPB-14 | 475 | 475 | 400 75 | 475 | 475 |
| VPB-15 | 469 | 243 226 | 381 88 | 469 | 469 |

* Datos tomados de Carvallo *et al.*, 2006, y para el caso de los VPB tipo 14 y 15 los patrones de digestión fueron estimados por el Dr. Antonio J. Vallecillo.