



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**  
**Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Título**

Identificación y tipificación del material genético de virus de papiloma bovino en tumores de vejiga

Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Médico Veterinario Zootecnista

**Autor:** Giancarlo Bermeo Granda, C.I.0706331733

Correo electrónico:gabardinop@gmail.com

**Director:** Dr. Teófilo Estuardo Palacios Ordóñez, C.I. 0101330579

**Cuenca - Ecuador**  
**21/01/2020**



## RESUMEN

La Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) es una enfermedad no infecciosa, de elevada morbilidad y caracterizada por la presencia de tumores en la pared de la vejiga; su desarrollo está asociado a la ingestión continua y prolongada de variedades de *Pteridium aquilinum*, *arachnoideum* y *caudatum*, donde el principal signo clínico es la hematuria, además se sospecha que tiene relación con agentes infecciosos como los Papilomavirus, motivo por el cual se realizó esta investigación; de igual manera se considera que la inocuidad alimentaria resulta un tema de alta prioridad para aquellos actores involucrados en la producción agropecuaria y la seguridad al consumidor; por lo tanto las intoxicaciones por plantas en ganadería ocasionan la eliminación de sustancias tóxicas como es en este caso los Ptaquilósidos, mismos que llegan hasta el consumidor final a través de la leche y las carnes de los animales afectados. Un ejemplo relevante lo constituye el *Pteridium spp.*, helecho altamente invasivo capaz de dominar en áreas de pastoreo de bovinos, con atención a regiones andinas en Latinoamérica. El objetivo de esta investigación fue identificar y tipificar mediante herramientas de biología molecular: reacción en cadena de polimerasa (PCR) y polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) los diferentes tipos de virus de papiloma bovino presentes en tumoraciones de vejiga urinaria en bovinos hembras y machos, faenados en camales de los cantones: Zaruma, Piñas, Marcabelí, Nobol. Obteniéndose como resultados la presencia de los Papilomavirus tipo 13, 21 y otros sin identificar.

**Palabras clave:** Hematuria enzoótica bovina. Helecho. Papilomavirus. Herramientas de biología molecular. Ptaquilósido. Salud pública y salud animal.



## ABSTRACT

Bovine Enzootic Hematuria (BEH) is a non-infectious disease, of high morbidity and characterized by the presence of tumors in the bladder wall; its development is associated with the continuous and prolonged ingestion of varieties of *Pteridium aquilinum*, *arachnoideum* y *caudatum*, where the main clinical sign is hematuria, it is also suspected that it is related to infectious agents such as Papillomavirus, that's why this research was carried out. Moreover, food safety is considered to be a high priority issue for those actors involved in agricultural production and consumer safety, therefore, poisoning by plants in livestock causes the elimination of toxic substances such as Ptaquiloside, which reach the final consumer through the milk and meat of the affected animals. A relevant example is *Pteridium spp.*, a highly invasive fern capable of dominating cattle grazing areas, with attention to Andean regions in Latin America. The objective of this research is to identify and typify by means of molecular biology tools: polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphisms (RFLP) the different types of bovine papillomavirus present in urinary bladder tumors in female and male cattle, slaughtered in slaughterhouse of the cantons: Zaruma, Piñas, Marcabelí and Nobol. Obtaining as a result the presence of Papillomaviruses type 13, 21 and other unidentified.

**Keywords:** Enzootic bovine hematuria. Fern. Papillomavirus. Molecular biology tools. Ptaquiloside. Public health and animal health.



## INDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1.	<b>Objetivo general</b> .....	<b>15</b>
2.1.	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>MARCO TEORICO</b> .....	<b>16</b>
4.1.	<b>Papilomavirus</b> .....	<b>16</b>
4.2.	<b>Hematuria vesical bovina y cáncer de vejiga en bovinos</b> .....	<b>17</b>
4.3.	<b>Signos clínicos</b> .....	<b>17</b>
4.4.	<b>Epidemiología</b> .....	<b>18</b>
4.5.	<b>Efectos inmunomodulatorios causados por el helech</b> .....	<b>19</b>
4.6.	<b>Tratamiento de la papilomatosis bovina</b> .....	<b>20</b>
4.7.	<b>Efecto del helech en la salud animal y la salud humana</b> .....	<b>21</b>
4.8.	<b>Métodos de detección del papilomavirus bovino</b> .....	<b>21</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1.	<b>De campo</b> .....	<b>23</b>
5.1.1.	<b>Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de las tumoraciones en vejiga de los bovinos para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN).</b> .....	<b>23</b>
5.1.1.1.	<b>Biológicos:</b> .....	<b>23</b>
5.1.1.2.	<b>Reactivos y soluciones:</b> .....	<b>23</b>
5.1.1.3.	<b>Equipos de campo</b> .....	<b>24</b>
5.1.1.4.	<b>Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de muestras de lesiones de tejido vesical.</b> .....	<b>24</b>
5.2.	<b>Materiales de laboratorio</b> .....	<b>25</b>
5.2.1.	<b>Biológicos:</b> .....	<b>25</b>
5.2.2.	<b>Reactivos y soluciones:</b> .....	<b>25</b>
5.2.3.	<b>Físicos:</b> .....	<b>25</b>
5.3.	<b>Método de campo</b> .....	<b>26</b>



5.3.1. Métodos utilizados para el procesamiento, extracción y purificación de ADN total de lesiones de vejiga urinaria.....	26
5.4. Materiales usados en la amplificación de los productos de PCR específicos para los virus de papiloma bovino y el control de proceso, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE .....	27
5.4.1 Biológicos: .....	27
5.4.2. Reactivos y soluciones:.....	27
5.4.3. Físicos: .....	28
5.4.4. Colecta y análisis de los datos e información .....	29
5.4.5. Materiales de oficina .....	29
5.4.6. Equipos tecnológicos .....	29
5.5. Método a aplicar en la realización de la colecta y análisis de datos e información.....	30
5.6. Métodos a aplicar en la realización del proceso de amplificación de los productos de PCR específicos para los virus de papiloma bovino y el control de proceso, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.....	30
5.7. Materiales a usarse en los ensayos de RFLP de los productos de PCR específicos de las muestras positivas, de los diferentes tipos de virus de papiloma bovino y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.....	33
5.7.1. Biológicos:.....	33
5.7.2. Reactivos y soluciones: .....	33
5.7.3. Físicos: .....	35
5.8. Métodos a aplicar en la realización de los ensayos de RFLP de los productos de PCR específicos de los diferentes tipos de virus de papiloma bovino y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa .....	35
6. ASPECTOS BIOÉTICOS Y BÁSICOS DE BIOSEGURIDAD .....	41
6.1. Manejo adecuado.....	41
6.2. Área de estudio .....	41
6.3. Ubicación política y geográfica de donde se realizó el estudio.....	41
7. RESULTADOS .....	42
7.1. Colecta de muestras.....	42
7.2. Detección de material genético de los BPV. ....	42
Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al control de proceso.....	43
7.3. Tipos de BPV identificados en las muestras positivas.....	44



---

<b>7.4. Métodos estadísticos:</b> .....	47
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	48
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>10. RECOMENDACIONES</b> .....	51
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	52
<b>12. ANEXOS</b> .....	58
<b>12.1. Anexo1:</b> Camal Municipal del Piñas, lugar donde se recolectaron las muestras.....	58
<b>12.2. Anexo 2:</b> Observación de las vejigas que presenten tumoraciones.....	58
<b>12.3. Anexo 3:</b> Vejiga que presenta tumoraciones y orina con sangre. ....	59
<b>12.4. Anexo 4:</b> Muestras en el laboratorio (Extracción de ADN).....	60
<b>12.5. Anexo 5:</b> Formato para la recolección de datos de los animales muestreados. ....	61
<b>12.6. Anexo 6:</b> Datos de las muestras recolectadas con lesiones sugestivas a papilomatosis. ....	62
<b>12.7. Anexo 7:</b> Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso. ....	66
<b>12.8. Anexo 8:</b> Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético BPV. ....	67



## INDICE DE GRAFICOS

<b>Figura 1:</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al control de proceso.	40
<b>Figura 2:</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a muestras positivas a la presencia de material genético de BPV (Reamplificación).	40
<b>Figura 3:</b> Electroforesis en gel de agarosa de los perfiles de digestión de los productos de PCR de muestras positivas a BPV (RFLP).	41

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Preparación de pre mezcla para la generación de los productos de PCR específicos para el control de proceso y de los BPV.	14
<b>Tabla 2:</b> Perfil de temperatura para generar amplicones o productos de PCR del control de proceso.	28
<b>Tabla 3:</b> Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BPV.	29
<b>Tabla 4:</b> Preparación de la premezcla para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP.	29
<b>Tabla 5:</b> Perfil de temperatura para generar los productos de PCR de los BPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.	33
<b>Tabla 6:</b> LI FAP segment digestion profiles of the BPVs 1- to 24 for DdeI, HinfI, MspI and HindIII.	34
<b>Tabla 7:</b> Datos de las muestras recolectadas con lesiones sugestivas a papilomatosis.	35,36,37
<b>Tabla 8:</b> Resultados de la identificación de material genético de los BPV presente en vejiga y su genotipificación.	42,43



## ABREVIATURAS SIMBOLOGIA

<b>Abreviatura:</b>	<b>Significado:</b>
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>BPV</b>	Papiloma virus Bovino
<b>VPH</b>	Papiloma virus Humano
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>RFLP</b>	Polimorfos en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction fragment length polymorphism)
<b>PT</b>	Ptaquilósido
<b>Símbolo:</b>	<b>Significado:</b>
<b>ul</b>	Microlitros

---

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

**GIANCARLO BERMEO GRANDA** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “**Identificación y tipificación del material genético de virus de papiloma bovino en tumores de vejiga**”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN 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.

Asimismo, 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, 21 de enero de 2020



---

**GIANCARLO BERMEO GRANDA**

**C.I: 0706331733**



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

GIANCARLO BERMEO GRANDA autor del trabajo de titulación “Identificación y tipificación del material genético de virus de papiloma bovino en tumores de vejiga”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 21 de enero de 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Giancarlo B.", written over a horizontal line.

GIANCARLO BERMEO GRANDA

C.I: 0706331733



---

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi madre Nora Granda, por ser un pilar fundamental en mis estudios, por su paciencia, desvelarse conmigo y enseñarme a pensar en grande que gracias a su esfuerzo tengo la oportunidad de finalizar mis estudios.

A Dios por bendecirme y darme la fortaleza de seguir adelante.

Agradezco de manera especial al Dr. Estuardo Palacios por guiarme sabiamente en cada momento de realización del presente trabajo investigativo y al PhD. Antonio Vallecillo por su gran colaboración en el Laboratorio de Biología Molecular.

A la Universidad de Cuenca por recibirme y ser ese lucero que me transmitió conocimientos a través de los docentes.

Y a los Doctores y miembros de cada camal que me abrieron sus puertas para cumplir esta meta.

**Giancarlo Bermeo Granda**



---

## DEDICATORIA

Quiero dedicar la presente tesis de grado a mis padres Carlos Bermeo y Nora Granda por inculcarme grandes valores, apoyarme cada día y siempre confiar en mí para lograr esta gran meta personal en mi carrera profesional.

A mis hermanas por brindarme ánimos en los momentos difíciles.

A mis abuelitos por enseñarme su humildad y darme a entender que si lucho puedo lograr todos mis objetivos.

Y a una excelente persona Nathaly Torres por brindarme su amor, por estar siempre pendiente de mí para que culmine mis estudios, por ser ese palpitar especial convirtiéndose en una guerrera de lucha a mi lado.

**Giancarlo Bermeo Granda**



## 1. INTRODUCCIÓN

Los papilomavirus son virus desnudos que pertenecen a la familia papillomaviridae, hoy en día se reconocen 24 tipos de papilomavirus bovino de los cuales el tipo 1 y tipo 2 causan cáncer de vejiga urinaria; sin embargo el desarrollo de lesiones cancerígenas y el aumento de la biodiversidad de los papilomavirus a nivel mundial justifica el interés veterinario acerca de estos virus (1). Además, los tumores asociados a BPV (Virus del Papiloma Bovino) tienen relevancia veterinaria y agrícola por derecho propio, pero también han sido estudiados como modelo relevante de virus del papiloma humano (VPH). Las lesiones benignas pueden retroceder o convertirse en cáncer una vez que el virus se sinergiza con co-factores cancerígenos ambientales (2).

También se habla que la Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (HVB) es una enfermedad no infecciosa, de mortalidad elevada, se caracteriza por la presencia de tumores en la pared de la vejiga. Su desarrollo está asociado a la ingestión continua y prolongada de variedades de *Pteridium aquilinum* (Pa) y *Arachnoideum* y *Caudatum*, donde el principal signo clínico es la hematuria. Además, tiene relación con agentes infecciosos como los Papillomavirus (3).

Existen muchos tratamientos para la papilomatosis bovina, entre ellos se encuentran: intervención quirúrgica, las vacunas autógenas preparadas con tejidos de verrugas del animal infectado, vacuna contra el virus de la enfermedad de Newcastle, diaceturato de diazoaminodibenzamidina, auto-hemoterapia, inyección de preparados que contienen bismuto y antimonio, tratamientos homeopáticos con Thuja, ácido salicílico y látex de higuera. Asimismo, los fármacos estimulantes del sistema inmune tales el levamisol y la ivermectina han sido utilizados exitosamente (4).

En el país no existe una amplia gama investigativa con respecto a esta enfermedad. Es por ese motivo que se planteó realizar un estudio encaminado a detectar y genotipificar el o los tipos de BPV que se presentan con mayor frecuencia en los bovinos afectados por papilomatosis en la vejiga, que son faenados en los camales municipales de Nobol, Piñas, Zaruma y Marcabelí.

Para la detección y genotipificación se utilizaron las técnicas de biología molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la técnica mencionada tiene como fin obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una copia del fragmento original (5) y Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) que expresa diferencias entre individuos en secuencias específicas del ADN, que son reconocidas por diferentes enzimas que cortan dichas



---

secuencias, y da origen a pequeños fragmentos que pueden ser analizados a través de electroforesis (6).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- Identificar y tipificar mediante herramientas de biología molecular los diferentes virus de papiloma bovino en tumoraciones de vejiga urinaria de bovinos faenados en camales de los cantones de: Zaruma, Piñas, Marcabelí, Nobol.

### 2.1. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de material genético del virus del papiloma bovino previamente reportado mediante PCR.
- Tipificar el material genético del virus del papiloma bovino por medio de PCR-RFLP.

## 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- Los animales que presentan hematuria enzoótica bovina suelen presentar tumoraciones en vejiga urinaria, por tanto ¿es posible encontrar en ellos ADN de virus de papiloma bovino?



## 4. MARCO TEORICO

### 4.1. Papilomavirus

Los virus del papiloma bovino provocan lesiones hiperplásicas y tumorales no solo en vacas sino también en otras especies por lo que la actividad transformadora se debe a su principal oncogén E5 el cual tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer (7), a menudo la inmunosupresión en el ganado resulta del consumo del helecho, algunos animales se vuelven incapaces de rechazar la infección dando lugar a un problema cutáneo o mucoso generalizado (8).

Los papiloma virus bovino son virus de ADN pequeño oncogénico, estrictamente específicos, de la especie (9), no poseen envoltura y sus genomas son bicatenarios circulares y por su baja similitud entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, los papilomavirus pertenecen a la familia Papillomaviridae, actualmente contiene al menos 29 géneros que incluyen más de 200 tipos de papilomavirus (10).

Se piensa que la acción combinada del helecho macho y el PVB-2 o 4, produce tumores en el tracto digestivo superior del ganado. La hematuria enzoótica debida a la ingestión del helecho macho ocurre en el ganado de todo el mundo por lo que la hematuria resulta de la hemorragia causada por los tumores en la pared de la vejiga. Los estudios sugieren que la oncogénesis es debida a la acción combinada de los componentes del helecho macho y el PVB-2 (11).

La papilomatosis bovina causa pérdidas económicas significativas en el ganado, afecta a los pezones de la vaca por lo que la infección puede provocar la obstrucción del pezón, lo que dificulta la higiene por ende es más susceptible a mastitis. Aparte de eso, está asociado con la depreciación económica de la piel animal (12), por ende existe disminución de la cordura del animal en forma generalizada y en casos severos el animal muere (13).



#### 4.2. Hematuria vesical bovina y cáncer de vejiga en bovinos

En los bovinos el consumo del helecho causa toxicidad crónica y múltiples tumores en la vejiga urinaria y hemorragias en la mucosa vesical dando lugar a la llamada hematuria vesical bovina, esta enfermedad está asociada con hematuria, leucopenia, anemia y reducción de la hemoglobina, consecuente a un estudio experimental en ganado alimentado con helecho, en algunas partes del mundo la incidencia de neoplasias vesicales es extremadamente alta por la ingestión de *Pteridium aquilinum* (14).

Por consecuente, el helecho es una de las plantas que causa cáncer de forma natural en los animales, la cual contiene componentes tóxicos como el *ptaquilósido*, que es un glicósido sesquiterpenoide que tiene efecto clastogénico en cultivos celulares (daño del ADN y de las células según el nivel de toxicidad) (15) y son mutagénicos con actividad cancerígena, este ptaquilósido es el principal carcinógeno; se elimina en la orina e induce a producir tumores en vejiga siendo muy peligro para la salud humana al ingerir leche contaminada con el ptaquilósido (16).

Además, se sabe que el BPV 1 y BPV 2 desempeñan un papel importante en la carcinogénesis de la vejiga de los grandes rumiantes, ya que pueden infectar el urotelio de la vejiga urinaria donde se establecen infecciones latentes o abortivas, la infección por el BPV-2 parece ser responsable de los tumores de vejiga del ganado y de los búfalos de agua desde hace varios años (17).

#### 4.3. Signos clínicos

El ganado vacuno al consumir por periodos largos el helecho presenta carcinomas de células escamosas en el tracto digestivo, pérdida progresiva de peso, atonía ruminal, tos disfagia, hematuria y neoplasias en vejiga, la presencia de tumores en vejiga y engrosamiento de su pared originan disuria, polaquiuria y a veces obstrucción uretral (18).

Esta enfermedad tiene creciente relevancia a nivel mundial, siendo considerada una de las toxicosis de mayor interés económico y de salud pública. En los bovinos afectados existen cambios hematológicos: disminución del número de eritrocitos, en la concentración de hemoglobina, en el conteo de células plaquetarias y en el conteo de linfocitos. En algunos componentes bioquímicos se ha evidenciado cambios como: disminución en los niveles séricos de proteínas, fósforo, calcio y cobre (19).

#### 4.4. Epidemiología

Es de gran importancia los estudios que nos demuestran el comportamiento epidemiológico de la enfermedad. La tabla nos indica geográficamente los sitios con diferente grado de prevalencia en la zona alta de El Oro lugar donde se realizó el proyecto de investigación.

**Tabla 1.: Prevalencia estimada de la hematuria vesical bovina en los cantones de la zona alta de la provincia de El Oro.**

CANTON	PARROQUIA	BAJA (A) 1 a 4%	MEDIA (B) 5 a 9%	ALTA (C) >10%
<b>MARCABELI</b>	Marcabeli			C
<b>PIÑAS</b>	Capiro	A		
	La Bocana		B	
	La Susaya	A		
	Moromoro	A		
	Piedras	A		
	Piñas			C
	Piñas Grande	A		
	San Roque	A		
	Zaracay	A		
<b>ZARUMA</b>	Abañin		B	
	Arcapamba		B	
	Guanazan	A		
	Guizhaguiña			C
	Huertas			C
	Malvas		B	
	Mununcay			C
	Salvias			C
	Sinsao		B	
	Zaruma		B	

J. Aguilar, C. Alvarado y R. Romero, 2006 (40).



La hematuria enzoótica bovina se manifiesta como un problema regional en todos los continentes, se han reportado intoxicaciones en Gran Bretaña, Italia, Estados Unidos, Argentina, Venezuela, Perú, sur de la India, Java y Filipinas, entre otros países; la incidencia global no es grande pero la enfermedad puede causar pérdidas importantes en las zonas donde el hehecho común es habitual. La cantidad de ptaquilósido presente en el hehecho varía según las distintas localizaciones geográficas y existe buena correlación entre su concentración y la incidencia de neoplasias (20).

Se han reportado prevalencias menores a 1% en EEUU, menores de 20% en Bolivia, China, Colombia, India, Nepal, Portugal y más del 40% en Brasil, España, Turquía y Yugoslavia; un estudio reciente en Mérida, Venezuela, se halló 16% de prevalencia mediante urianálisis y en el Perú en la provincia de Oxapampa en un estudio de diagnóstico clínico mediante urianálisis se reportó una prevalencia de 26.1% (21).

#### **4.5. Efectos inmunomodulatorios causados por el hehecho**

La hematuria vesical bovina es conocida por ser causada debido a la interacción de la toxina del hehecho conocida como ptaquilósido y el Papiloma Virus Bovino tipo 2, esta enfermedad tiene un padecimiento neoplásico crónico incurable que afecta a la vejiga de los bovinos, estudios en la India han realizado la cuantificación cancerígena por parte de los compuestos químicos como el ptaquilósido, flavonoide y quercitina (22).

Estudios recientes revelaron que el ptaquilósido suprime la producción de IFN  $\alpha$  y citotoxicidad mediada por células NK, además se verificó que la suplementación con selenio previene la disminución de la citotoxicidad NK que es causado por *Pteridium aquilinum* donde el ptaquilósido involucrado en hehechos también puede promover carcinogenicidad al disminuir la supervisión inmune contra los tumores que surgen de los efectos inmunosupresores de los hehechos (23).

Además, se ha informado una variante pagetoide de carcinoma urotelial in situ en una vaca que también tenía hematuria enzoótica y una infección concurrente de BPV-2; proteína de la tríada de histidina frágil (Fhit), expresada por el gen supresor de tumores *FHIT*, se encontró ausente en algunas de las células pagetoides, lo que se correlaciona con la progresión neoplásica en etapa tardía (24).



#### 4.6. Tratamiento de la papilomatosis bovina

Los bovinos expresan una pobre respuesta inmune hacia el BPV, probablemente este sea la principal razón para la persistencia de la infección incluso en hospedadores inmunocompetentes, los papilomas persisten durante muchos meses antes de que se produzca la regresión (25).

Existe la cirugía y la vacunación, o una combinación de ambos ya que son las formas más comunes de tratamiento y prevención, no hay regímenes farmacológicos exactos para prevenir la recurrencia de las verrugas, entre otros tratamientos existe la medicina homeopática, vacuna autógena, hemoterapia (26), enucleación de la verruga, aplicación de hierro caliente, ligadura y escisión de verrugas, uso del cuchillo quirúrgico, aplicación de ácido salicílico, pomada de dimetilsulfóxido y cáusticos potenciales (27).

En un estudio, se utilizó una sustancia activa de podofilina (extraída de la raíz de la mandrágora) la cual se aplicó tópicamente sobre las verrugas del pezón del animal estas aplicaciones se realizaron para todas las verrugas en los pezones una vez cada tres días durante 27 días, ocho horas después de aplicar el medicamento las tetinas se lavaron con agua estéril donde se demostró que las verrugas en la teta disminuyeron y se secaron el día 27 (28).

Después de haber tratado la papilomatosis bovina con levamisol a una dosis de 2.5 mg/kg/día los días 1,3,5,7,9 y 16 por vía oral se logró una recuperación del 82%, mientras que la hemoterapia como se administra a la clínica afirmativa en casos de verrugas cutáneas, revelaron signos de regresión después de la cuarta administración, la hemoterapia da un 90% de recuperación en animales enfermos, mientras que la hemoterapia junto con levamisol hay una recuperación del 100% (29).

Para nuestro conocimiento, el uso de ivermectina para el tratamiento de la papilomatosis en el ganado ha sido mal estudiado pero se encuentra prometedor en tratar la papilomatosis cutánea bovina con 100% de eficacia y que posiblemente podría ser por inducción inmunitaria inespecífica, es decir, tanto celular como función inmune humoral y tumor inhibidor progresión por su efecto antitumoral inherente (27).



El virus de la enfermedad de Newcastle tiene propiedades antineoplásicas e inmunoestimulantes, actualmente se está probando clínicamente en la terapia contra el cáncer, para analizar los efectos inmunoestimuladores del NDV en la papilomatosis bovina, inoculamos 14 vacas por vía SC con una vacuna atenuada los resultados demostraron que la inoculación de la vacuna LS-NDV estimula una respuesta de anticuerpos y un aumento limitado de la actividad de TNF-alfa y puede mejorar la recuperación clínica en la papilomatosis bovina (30).

#### **4.7. Efecto del hehecho en la salud animal y la salud humana**

La posibilidad de que el carcinógeno PT (ptaquilósido) se encuentre en animales de granjas destinadas para el consumo humano o en sus productos requiere de muchos estudios ya que los métodos analíticos son insuficientes para presentar resultados experimentales efectivos, donde en la actualidad el IARC puso al PT dentro del Grupo 2B (posiblemente cancerígeno para el ser humano) (24).

La asociación entre el consumo de hehechos y el cáncer en humanos se da por las siguientes vías de exposición como son la ingestión de hehecho, beber agua o leche contaminada con PT o inhalar aire que contenga las esporas de los hehechos, además esas vía de contacto pueden conducir a un aumento de cáncer gástrico y esofágico en los humanos (31).

Se ha encontrado que cerca del 9% de PT del hehecho ingerido por la vaca es transferido a la leche (31), y otros estudios revelan que  $8,6 \pm 1,2\%$  del PT ingerido por las vacas se excreta dependientemente en la leche donde se informa que leche de vacas alimentadas con hehechos presentaban actividad carcinogénica en ratones (24).

Por lo tanto se calcula que una persona que consuma medio litro de leche por día de una vaca alimentada con dosis subtóxicas de PT, estaría recibiendo cerca de  $11 \pm 1$  mg de PT por día, pero el riesgo de consumir el PT es elevado en lugares donde hay una alta incidencia de hehecho y las personas al alimentarse del producto local como es la leche incrementarían la incidencia de cáncer gástrico (18).

#### **4.8. Métodos de detección del papilomavirus bovino**

Los tipos de papilomavirus bovino se han demostrado a través de métodos de biología molecular, principalmente mediante el empleo de cebadores degenerados de PCR, en un trabajo se evaluó un



método basado en la técnica de PCR-RFLP y la secuenciación de ADN como herramienta de detección. El conjunto de FAP del cebador de PCR se diseñó a partir de dos regiones que se encuentran en el gen L1 que amplifica el ADN de los papilomas y el tejido sano de muchas especies animales (32).

Los primers FAP son ampliamente usados para la detección de los papilomavirus, fueron diseñados a partir de dos regiones relativamente conservadas que se encuentran en el gen de L1 y se han empleado para amplificar el ADN de BPV tanto en papiloma y la piel sana de muchas especies animales, incluyendo ganado vacuno (33); los cebadores FAP59 / FAP64, se basan en las secuencias del gen de la proteína de la cápside del VPH L1, se han utilizado con éxito para diferenciar la mayoría de virus del papiloma incluyendo BPV (34).

La técnica de PCR, es una poderosa herramienta que cumple con los requisitos de especificidad y sensibilidad que exigen la caracterización de los ácidos nucleicos, pudiendo detectar con ella de forma fácil la presencia de estas biomoléculas en una muestra, la PCR es un método enzimático *in vitro* que permite la amplificación de una secuencia específica del ADN(35), la Taq polimerasa es la enzima más utilizada en la PCR, una desventaja es que no tiene actividad correctora, por lo que existe la probabilidad de introducir errores durante el copiado del ADN (36).

Los primeros marcadores moleculares basados en polimorfismos en la secuencia de DNA fueron los marcadores RFLPs, estos marcadores se basan en la identificación de diferencias en el tamaño de fragmentos generados mediante restricción con endonucleasas, para su detección se recurre a la digestión de ADN y a un proceso de hibridación con una sonda marcada (37).

Hay un estudio que tuvo como objetivo detectar el papilomavirus bovino tipo 2 en muestras de orina y lesiones de vejiga urinaria usando la PCR en tiempo real basado en diagnósticos moleculares y cuantificar el BPV -2 en lesiones de vejiga urinaria especialmente en hematuria enzoótica bovina, donde la investigación concluyó que el BVP -2 está presente frecuentemente en orina y lesiones de vejiga urinaria en vacas Holstein (38).

El análisis histopatológico de la lesión es un procedimiento importante, ya que permite identificar tumores intra-epiteliales asociados con virus oncogénicos, como las causadas por BPV, haciendo de esta una herramienta complementaria en el diagnóstico molecular (39).



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 65 muestras, las cuales fueron recolectadas indistintamente de raza, sexo y edad obtenidos de los animales en el faenamiento.

### 5.1. De campo

#### 5.1.1. Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de las tumoraciones en vejiga de los bovinos para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN).

##### 5.1.1.1. Biológicos:

Se recolectaron 65 muestras de tejidos de tumoraciones en vejiga.

##### 5.1.1.2. Reactivos y soluciones:

- **Solución de conservación:** 93.75 ml de Etanol al 96%, 1 ml de Buffer TE 10:1 100X, 2.5 ml de glicerina y se aforó con 2.75 ml de agua MQ, para mezclar, filtrar y esterilizar.
- **Solución Buffer TE 10:1 100X:** 1M de Tris-HCL pH 8.0 y 100 mM de EDTA, para preparar 50 ml, se colocó en una probeta 25 ml de una solución de 2 M de Tris-HC pH 8.0 y 10 ml de una solución de 500 mM de EDTA pH 8.0, aforando a 50 ml con agua MQ, mezclada y filtrada para esterilizar.
- **Solución a 2 M de Tris-HCL pH 8.0:** para 100 ml, se colocó en una probeta 60 ml de agua MQ donde se adicionó lentamente 24.23 g de Tris base, la cual se disolverá completamente para titularlo con cantidad suficiente de HC hasta tener un pH de 8.0 a 23 °C aforando con agua MQ, luego esterilizándola por filtración o autoclave.
- **Solución a 500 mM de EDTA pH 8.0:** para 100 ml, colocando en una probeta 80 ml de agua MQ al cual se adicionó lentamente 14.6 g de EDTA, disolviendo completamente y adicionando de forma cuidadosa NaOH hasta tener un pH de 8.0 a 23 °C aforando con agua MQ.

Todas estas soluciones fueron mantenidas a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar.



### 5.1.1.3. Equipos de campo

- Overol
- Casco
- Botas
- Guantes
- Kit de disección
- Bisturí
- Tubos para la colecta de muestras con su respectiva solución de conservación
- Gradilla para transporte de muestras
- Recipientes para las muestras

### 5.1.1.4. Colecta, conservación, transporte y almacenamiento de muestras de lesiones de tejido vesical.

**Paso 1.:** Se preparó las soluciones de conservación correspondientes.

**Paso 2.:** Se identificó los tubos con los datos necesarios para la colecta de la muestra.

**Paso 3.:** Se colocó en los tubos 8 ml de la solución de conservación para la muestra.

**Paso 4.:** Se tomaron las muestras post-mortem de bovinos con tumoraciones en vejiga que fueron faenados en los camales Municipales de Piñas, Zaruma, Marcabelí y Nobol, de acuerdo al procedimiento del manejo de los animales; tomando la seguridad del caso para la viabilidad de las muestras en estudio.

**Paso 5.:** Se utilizó una gradilla junto a un equipo especial para transportar las muestras y así evitar que se derrame el contenido.

**Paso 6.:** El almacenamiento de las muestras fue a temperatura ambiente y en refrigeración a 4 °C, para el procesamiento de las muestras se eliminó la mayor cantidad posible de la solución de conservación.



## 5.2. Materiales de laboratorio

### 5.2.1. Biológicos:

- Tumores de vejiga urinaria

### 5.2.2. Reactivos y soluciones:

- **Una solución de lisis**, para la cual se utilizó Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, SDS 0.5 % (Sigma, Cat. No.: 71725) ajustado a 400/500.
- **Solución de Proteinasa K** con 5 mg/ml (Sigma, Cat. No: P2308) esta se almacenó en alícuotas a -20°C, a temperatura ambiente protegida de la luz solar directa.
- **Solución 25:24:1** (Sigma, Cat. No: 77619) a base de fenol, cloroformo y Ac. Isoamílico, almacenado en refrigeración y protegido de la luz.
- **Etanol al 100%** (Sigma, Cat. No: E7023), almacenada en refrigeración y protegido de la luz.
- **Etanol al 70%** (Solución desinfectante), almacenada en refrigeración y protegido de la luz.
- **Solución TE 10:1** con Tris-HCl 10mM, pH 8.0, EDTA 1mM.
- **Agarosa** (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).
- **Solución Buffer-TAE** (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH  $\approx$  8.0 y 1 mM EDTA).
- **Solución de Bromuro de Etidio** (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).
- **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).

### 5.2.3. Físicos:

- Set de micropipetas (puntas estériles 0,1 - 20  $\mu$ l, 1 - 50  $\mu$ l, 2 – 200  $\mu$ l, 50 – 1000  $\mu$ l)
- Termomixer confort



- Vórtex
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza
- Horno microondas
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV-Impresora

### 5.3. Método de campo

#### 5.3.1. Métodos utilizados para el procesamiento, extracción y purificación de ADN total de lesiones de vejiga urinaria.

**Paso 1.:** Una vez preparadas las soluciones se tomó una porción de la muestra de tejido colectado no mayor a 2mm, mantenida en la solución de conservación a 4°C, la muestra de tejido se dejó sobre un papel estéril, esto para eliminar la mayor cantidad de solución de conservación.

**Paso 2.:** Luego se tomó aproximadamente 200 mg de la muestra y se colocó en un tubo eppendorf de 2.0 ml con 450 µl de solución de lisis Bov y 50 µl de solución de Proteinasa K, la muestra se incubó en agitación constante a 56°C durante 14 a 16 horas.

**Paso 3.:** Finalizado el proceso de digestión, se adicionó 750 µl de fenol/cloroformo/Ac. Isoamílico 25:24:1 mezclándolo con un vortex por 20-30 s.

**Paso 4.:** La suspensión obtenida se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min. Una vez concluida la centrifugación se colectó el sobrenadante ( $\pm$  400 µl) y se procedió a colocarlo en un tubo eppendorf nuevo.

**Paso 5.:** El resultado de esto se volvió a centrifugar a 12,000 x g durante 10 min y se colectó nuevamente el sobrenadante para colocarlo en un tubo eppendorf nuevo adicionándole 2.5 volúmenes de etanol al 100%, lo cual se mezclará invirtiendo el tubo por 10-20 s.

**Paso 6.:** Se volvió a centrifugar a 12,000 x g durante 10 min, eliminando el sobrenadante de forma cuidadosa para no perder la pastilla de ADN precipitado y se le adicionó 500 µl de etanol al 70%,



luego se repitió la centrifugación a 12,000 x g durante 10 min y se eliminó completamente la solución de etanol.

**Paso 7.:** Se sacó el sobrenadante de alcohol de cada uno de los tubos eppendorf, donde la pastilla obtenida se puso a secar a 37 °C en la incubadora destapándolos con la finalidad de que los restos de alcohol se evaporen.

**Paso 8.:** Esta pastilla de ADN se resuspendió en 50 µl de solución tamponada buffer TE 10:1, pH 8.0., de esto se tomó una alícuota para cuantificar por espectrofotometría y verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.

**Paso 9.:** Las muestras de ADN total obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta emplearse 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% teñido con Bromuro de Etidio.

#### **5.4. Materiales usados en la amplificación de los productos de PCR específicos para los virus de papiloma bovino y el control de proceso, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE**

##### **5.4.1. Biológicos:**

- Muestras de ácidos desoxirribonucleico total, extraído de los tejidos de las lesiones vesicales de los animales afectados.

##### **5.4.2. Reactivos y soluciones:**

Se manejó los solventes y mezclas a una temperatura de 4 °C manteniendo los recipientes abiertos el menor tiempo posible. Para esto se emplearon:

- **Alícuotas de agua grado biología molecular** (Sigma, Cat. No.: W4502). Se prepararon alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas del polvo.



- **Enzima ADN Taq polimerasa** (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033), con la **Solución buffer de amplificación 10X** y la **Solución a 50 mM de MgCl<sub>2</sub>**. 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.
- **Set de oligonucleótidos específicos** para virus de papiloma bovino y para el control de proceso (Primers 100 μM (Invitrogen). Par de oligonucleótidos específicos para el control de proceso 5'GCA TAT GGC AGC CGA AGG GGA GAA AC 3'50 N, D. INVITROGEN, y para la detección de material genético de los BPV 5'GAG ATC TTA TTT GGC ATC ATA CCA TGT TGG 3'50 N, D. INVITROGEN, 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.
- **Soluciones de ADN total** obtenidos a partir de lesiones de vejiga urinaria; las alícuotas se mantuvieron almacenadas a -20°C y protegidas de la luz.
- **Agarosa**; (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).
- **Solución tamponada TAE 1X**; (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).
- Se preparó una solución utilizando 10 mg/ml de **Bromuro de Etidio** (Sigma, Cat. No: E7637).
- **Solución tamponada de carga para ADN 6X**, en cantidad suficiente para 100 ml. Estas soluciones se almacenaron en forma adecuada, de acuerdo a cada tipo de solución, con una temperatura adecuada, protegidas de la luz y el polvo (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).

#### 5.4.3. Físicos:

- Set de micropipetas (puntas estériles 0,1 - 20 μl, 1 - 50 μl, 2 – 200 μl, 50 – 1000 μl)



- Vórtex
- Nanocentrífuga
- Cabina de PCR
- Termociclador (Eppendorf)
- Congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sin descongelamiento automático (Almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza (Mantener calibrada).
- Horno de microondas
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV-Impresora
- Potenciómetro
- Platina de agitación y calentamiento.

#### **5.4.4. Colecta y análisis de los datos e información**

- Resultados de ensayos de PCR y RFLP.

#### **5.4.5. Materiales de oficina**

- Esfero
- Cuaderno
- Lápices
- Borradores
- Hojas de papel Bond
- Marcadores para etiquetar las muestras.

#### **5.4.6. Equipos tecnológicos**

- Computadoras



- Memorias USB
- Cámara digital
- Calculadora
- Impresora

### **5.5. Método a aplicar en la realización de la colecta y análisis de los datos e información.**

- **Paso 1:** Se recolectó la información a través de los propietarios de los animales, o también por guías de movilización, acerca de la procedencia de animales, raza, sexo, edad, presencia de lesiones y animales con signología aparente de hematuria vesical enzoótica bovina.
- **Paso 2:** Se evidenció las tumoraciones en la vejiga mediante fotografías de las muestras obtenidas.
- **Paso 3:** Se realizó una base de datos en la que consta la información como la presencia del virus, el tipo, lugar de la lesión los mismos que fueron registrados en Excel.
- **Paso 4:** Se tomaron fotografías de las electroforesis obtenidas de los productos de PCR.
- **Paso 5:** Se manejó una base de datos con los resultados obtenidos en el laboratorio, los cuales fueron almacenados en el sitio MEGA sync 4.2.4 y en el cuaderno de datos.

### **5.6. Métodos a aplicar en la realización del proceso de amplificación de los productos de PCR específicos para los virus de papiloma bovino y el control de proceso, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.**

Para el proceso se descongelaron los reactivos necesarios para la amplificación (Agua grado biología molecular, Solución buffer de amplificación 10X, Solución de dNTP's, Solución de MgCl<sub>2</sub>, Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes para las muestras a analizar) y se preparó la pre mezcla en el volumen requerido para el número de muestras a analizar; el tubo de la pre mezcla se mantuvo en hielo hasta su uso.

**Paso 1.:** Los tubos de PCR fueron identificados, en cada tubo se colocó la cantidad que corresponde a la solución de ADN total de las muestras a analizar; se colocó el volumen total en el fondo del tubo con la ayuda de una micropipeta, para así evitar que toque las paredes del mismo.

**Paso 2.:** Descongelados todos los reactivos necesarios, se preparó una pre mezcla con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (**10 µl de volumen final por reacción**), colocando en el orden indicado los siguientes reactivos, a excepción de las muestra de ADN total:

**Nombre del producto de PCR:** 125 Rib - Mit

**Tamaño (bp):** 707 – 708

**Tabla 2.:** Preparación de pre mezcla para la generación de los productos de PCR específicos para el control de proceso y de los BPV.

Reactivo	CONCENTRACIÓN		VOLUMEN	
	Inicial	Final	De Premezcla	Por reacción
Agua grado Biología molecular	No aplica	No aplica	181.5 µl	7.26 µl
Buffer de ampliación 10 X	10 X	1 X	25 µl	1 µl
Solución dNTP's	10 mM	0.1 mM	2.5 µl	0.1 µl
Solución MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.0 mM	10 µl	0.4 µl
Oligonucleótido <b>125 FW Mod – F.</b>	100 µM	0.8 µM	2 µl	0.08 µl
Oligonucleótido _____R.	100 µM	0.8 µM	2 µl	0.08 µl
Enzima Taq ADN polimerasa	5 U/µl	0.04 U/µl	2 µl	0.08 µl
Muestra de ADN total	----- µg/µl	----- µg/µl	25 µl	1 µl
<b>Volumen final</b>	-----	-----	<b>250 µl/25 10 µl</b>	<b>10 µl</b>

**Fuente:** Giancarlo Bermeo Granda

**Paso 3.:** La premezcla preparada se homogenizó en el vortex por 2 – 3", luego se colectó todo el volumen mediante centrifugación durante 15 a 20".

**Paso 3.:** Se marcaron los tubos de PCR (50 µl) y se colocó 9 µl de la premezcla y se adicionó 1 µl de la muestra correspondiente.



**Paso 4a.:** Se mezcló en el vortex el contenido de los tubos de PCR y se colectó el volumen total por centrifugación, luego se utilizó el termociclador previamente programado con el perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del control de proceso; además los tubos se cerraron bien con el fin de evitar que se evapore la solución.

**Tabla 3.: Perfil de temperatura para generar amplicones o productos de PCR del control de proceso.**

		Número de ciclos: 35				
Paso	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final	Almacenamiento
Temp. °C	94.0 °C	94.0 °C	55.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	4 °C
Tiempo (min', seg'')	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00	_____

**Fuente: Giancarlo Bermeo Granda**

**Paso 4b.:** Las reacciones preparadas con los oligonucleótidos 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 BPV causales en las tumoraciones de vejiga.

**Tabla 4.: Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BPV**

		Número de ciclos: 35				
Paso	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final	Almacenamiento
Temp. °C	94.0 °C	94.0 °C	52.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	4 °C
Tiempo (min', seg'')	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00	_____

**Fuente: Giancarlo Bermeo Granda**

**Paso 5.:** Una vez concluido el proceso de amplificación se retiraron los tubos del termociclador, pudiéndose conservar a -20 °C por varias semanas, en este caso se analizaron de inmediato mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE, para lo cual se preparó el gel al 1.2 % de agarosa en solución tamponada TAE al 1X, la cual estuvo bien disuelta.



**Paso 6.:** Luego de que la solución se enfrió, se le adicionó el volumen suficiente de la solución de Bromuro de Etidio teniendo una concentración final de 0.03 mg/ml, que es 1  $\mu$ l por cada 30 ml de solución tamponada TAE al 1X.

**Paso 7.:** En la cámara horizontal de electroforesis previamente armada se vertió el gel, se esperó hasta que se gelifique como 10 min y se colocó el volumen suficiente de la solución TAE y posterior a esto se retiró el peine para formación de pocillos en el gel.

**Paso 8.:** Se colocó en cada uno de los pocillos 10  $\mu$ l de la muestra previamente mezclada con 2  $\mu$ l de la solución tamponada de carga 6X y en el último pocillo se colocó 6  $\mu$ l de la solución del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

**Paso 9.:** Una vez cargados los pocillos con las muestras correspondientes y el marcador de peso molecular las muestras se ensamblaron el circuito eléctrico de la cámara de electroforesis con la fuente de poder y se inició el proceso a 100 Voltios por 40 min, de acuerdo a la longitud del gel.

**Paso 10.:** Obtenido el resultado deseado en la resolución de los productos de PCR en la electroforesis, se procedió a documentar la imagen del gel en el fotodocumentador se guardó una fotografía en una carpeta de almacenamiento para su respectivo análisis.

**Paso 11.:** 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  $\pm$  430 a 460 bp.

## **5.7. Materiales a usarse en los ensayos de RFLP de los productos de PCR específicos de las muestras positivas, de los diferentes tipos de virus de papiloma bovino y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.**

### **5.7.1. Biológicos:**

Muestras de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total puro, de las muestras de tejidos positivos a la amplificación de material genético de los BPV.

### **5.7.2. Reactivos y soluciones:**

Para el ensayo de RFLP se utilizó:

- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Se prepararon 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 MgCl<sub>2</sub>**. 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 la detección de material genético de los BPV 5'GCA TAT GGC AGC CGA AGG GGA GAA AC 3'50 N, D. INVITROGEN, y para la detección de material genético de los BPV 5'GAG ATC TTA TTT GGC ATC ATA CCA TGT TGG 3'50 N, D. INVITROGEN.
- **Soluciones de ADN total:** ADN total de muestras positivas a la determinación de la presencia de material genético de BPV. 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).
- 1. **Enzima de restricción *DdeI*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER1882)
- 2. **Enzima de restricción *HinfI*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER0801)
- 3. **Enzima de restricción *MslI*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER2001)
- 4. **Enzima de restricción *HindIII*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER0501)
- 80 ng/ μl en la solución tamponada de carga de ADN, todo esto almacenado a -20 °C, protegido de la luz directa.



### 5.7.3. Físicos:

- Micropipetas (puntas estériles 0,1 - 20  $\mu$ l, 1 - 50  $\mu$ l, 2 – 200  $\mu$ l, 50 – 1000  $\mu$ l)
- Vortex
- Nanocentrífuga
- Incubadora bacteriológica a 37 °C
- Congelador a -20 °C, sin descongelamiento automático
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza
- Horno de microondas
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV-Impresora
- Potenciómetro
- Platina de agitación y calentamiento

### 5.8. Métodos a aplicar en la realización de los ensayos de RFLP de los productos de PCR específicos de los diferentes tipos de virus de papiloma bovino y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.

**Paso 1.:** Se descongelaron los reactivos necesarios para los ensayos de premezcla (Agua grado biología molecular, Solución buffer de amplificación 10X, Solución de dNTP's, Solución de MgCl<sub>2</sub>, Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes a las muestras positivas a la presencia de material genético de los BPV) de cada una de las muestras de los productos de PCR.

**Paso 2.:** Se preparó la premezcla en el volumen requerido para el número de muestras a analizar (5  $\mu$ l de volumen final por reacción), manteniendo el tubo de la muestra en hielo hasta su uso.

**Tabla 5.: Preparación de la premezcla para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP.**

Reactivo	CONCENTRACIÓN		VOLUMEN
	Inicial	Final	De Premezcla
Agua grado Biología molecular	No aplica	No aplica	53.25 $\mu$ l
Buffer de ampliación 10 X	10 X	1 X	12.5 $\mu$ l
Solución dNTP's	10 mM	0.1 mM	1.25 $\mu$ l
Solución MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.0 mM	5 $\mu$ l
Oligonucleótido <b>FAP59</b> – F.	100 $\mu$ M	0.8 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Oligonucleótido <b>FAP64</b> – R.	100 $\mu$ M	0.8 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Enzima Taq ADN polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0.04 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Muestra de ADN total	----- $\mu$ g/ $\mu$ l	----- $\mu$ g/ $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	-----	-----	<b>125 <math>\mu</math>l</b>

**Fuente:** Giancarlo Bermeo Granda

**Paso 3.** La premezcla preparada se homogenizó en el vortex por 4 a 6", y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 10 s.

**Paso 4.** Se marcaron los tubos de PCR, se colocó 15  $\mu$ l de la premezcla y se adicionó 10  $\mu$ l de la muestra correspondiente.

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

**Tabla 6: Perfil de temperatura para generar los productos de PCR de los BPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.**

Paso	Desnaturalización inicial	Número de ciclos: 35			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Temp. °C	94.0 °C	94.0 °C	52.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	4 °C
Tiempo (min', seg'')	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00	_____

**Fuente: Giancarlo Bermeo Granda.**

**Paso 6.** De cada una de las reacciones se confirmó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio anteriormente ya descrito.

**Paso 7.** Una vez confirmada la presencia de los productos de PCR esperados, se tomó de cada reacción 5 µl y se adicionó 1 µl de la Solución buffer de digestión correspondiente a cada enzima de restricción (Enzimas *DdeI*, *HinfI* y *MslI*, enzima *HindIII*), se mezcló en el vortex de 3-5”.

**Paso 8.** Junto con las reacciones preparadas se colocaron a 37°C en una incubadora bacteriológica durante 2 horas los controles de cada una de las muestras positivas, los cuales consistieron en la misma cantidad del producto de PCR (8 µl).

**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 1.2 %, 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 BPV se empleó los patrones de restricción esperados (**Tabla 7**) y la imagen fotodocumentada de la electroforesis de las reacciones de digestión con las 4 enzimas y el control sin digestión.



**Tabla 7: LI FAP perfiles de digestión del segmento de los BPVs 1 al 24 para DdeI, HinfI, MslI y HindIII.**

Virus:	Enzima de restricción:				Producto de PCR (bp)
	<i>DdeI</i>	<i>HinfI</i>	<i>MslI</i>	<i>HindIII</i>	
<b>BoPV-1</b>	264	329	305	475	475
	159	146	170		
	52				
<b>BoPV-2</b>	316	329	475	475	475
	159	146			
<b>BoPV-3</b>	319	472	369	472	472
	153		90		
			13		
<b>BoPV-4</b>	324	469	469	230	469
	145			182	
				87	
<b>BoPV-5</b>	469	254	469	469	469
		145			
		70			
<b>BoPV-6</b>	321	384	369	472	472
	151	88	103		
<b>BoPV-7</b>	403	271	484	484	484
	81	119			
		94			
<b>BoPV-8</b>	469	317	469	322	469
		152		147	



<b>BoPV-9</b>	316 153	344 125	469	469	469
<b>BoPV-10</b>	319 90 63	381 91	373 99	472	472
<b>BoPV-11</b>	420 55	407 68	370 105	475	475
<b>BoPV-12</b>	351 118	317 152	469	469	469
<b>BoPV-13</b>	316 109 50	329 146	475	475	475
<b>BoPV-14</b>	475	400 75	475	475	475
<b>BoPV-15</b>	243 226	381 88	469	469	469
<b>BoPV-16</b>	173 159 152	484	388 96	484	484
<b>BoPV-17</b>	283 204	177 155 155	375 112	487	487



<b>BoPV-18</b>	198 135 129 16	478	478	478	478
<b>BoPV-19</b>	307 168	475	475	237 211 27	475
<b>BoPV-20</b>	379 93	315 175	472	472	472
<b>BoPV-21</b>	307 171	478	478	478	478
<b>BoPV-22</b>	295 75 63 33 24	490	490	407 83	490
<b>BoPV-23</b>	426 43	261 178 30	366 90 13	469	469
<b>BoPV-24</b>	469	283 157 29	469	469	469

Fuente: MVZ, MsC, PhD Antonio Vallecillo, 2019 (Vallecillo, 2019)

## 6. ASPECTOS BIOÉTICOS Y BÁSICOS DE BIOSEGURIDAD

### 6.1. Manejo adecuado

Se utilizó protección corporal adecuada, como guantes, mascarilla, mandil.

Los solventes y sus mezclas se manejaron a una temperatura de 4 °C, minimizando el tiempo de exposición de las mismas; así también como manejo y disposición adecuada de los desechos de laboratorio. La toma de muestras se realizó con la mayor asepsia posible con el fin de evitar contaminar la muestra y preservando nuestra salud.

### 6.2. Área de estudio

Camales Municipales de Zaruma, Piñas, Marcabelí, Nobol.

### 6.3. Ubicación política y geográfica de donde se realizó el estudio.

Las muestras se colectaron en los camales de Marcabelí, Piñas, Zaruma cantones pertenecientes a la provincia de El Oro; y del camal de Nobol perteneciente a la provincia del Guayas.

Las muestras fueron tomadas del camal de Nobol debido que muchos animales de la parte alta como Zaruma, Piñas y del cantón Marcabelí son llevados para el faenamamiento en ese camal.



El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de biología molecular, de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.



## 7. RESULTADOS

En esta sección se describen los resultados obtenidos en cada una de las actividades realizadas en el transcurso del trabajo.

### 7.1. Colecta de muestras.

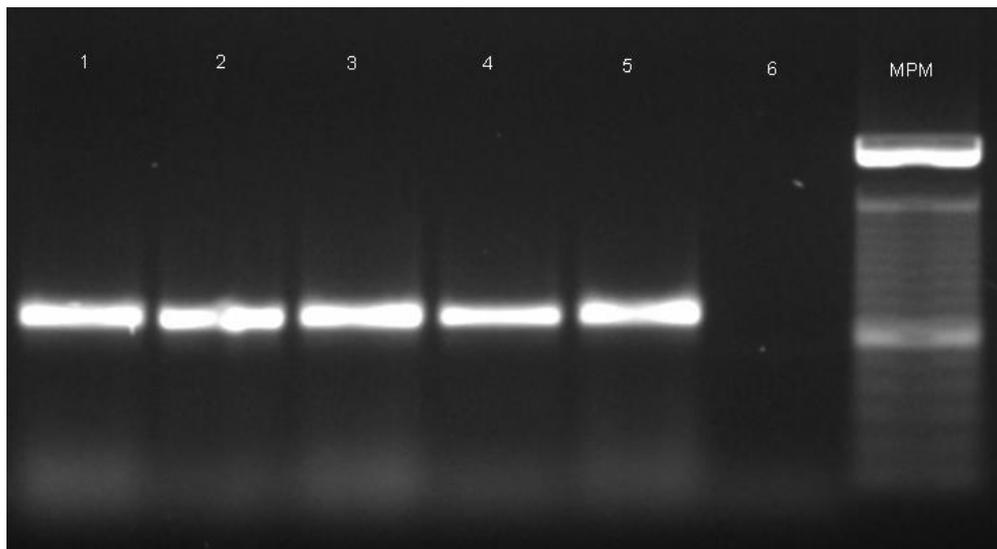
En este trabajo para la identificación y genotipificación molecular de los diferentes tipos de BPV se colectaron post-mortem 65 muestras de tumoraciones en vejiga de bovinos, 65 muestras procedentes de 500 bovinos que fueron faenados en los camales municipales de Piñas, Zaruma y Marcabelí y Nobol. La descripción de cada una de las muestras se detalla en el **Anexo 6**.

Las muestras colectadas y mantenidas en la solución de conservación se transportaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca, en donde se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento y obtención del ADN total puro.

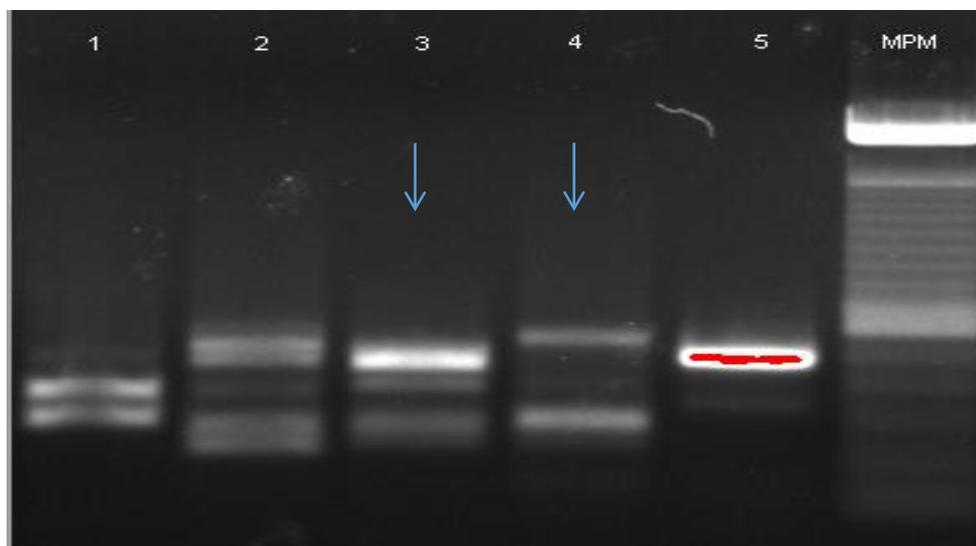
### 7.2. Detección de material genético de los BPV.

Con la aplicación de los protocolos de procesamiento y purificación de ADN total se logró obtener ADN total de 56 muestras de las 65 colectadas. En estas 56 muestras se logró obtener el amplicón en el ensayo de PCR correspondiente al control de proceso (**Figura 1**).

De las 56 muestras válidas que se logró obtener ADN total para ser amplificado, en 5 muestras se observó un producto de PCR con un tamaño similar al esperado cuando se emplearon los primers FAP59-FAP64, por lo que se les consideró como muestras positivas a la presencia de material genético de BPV (**Figura 1** y **Tabla 8**).



**Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al control de proceso.** Carriles 1, 2, 3, 4, 5: Productos de PCR; Carril 6: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder).

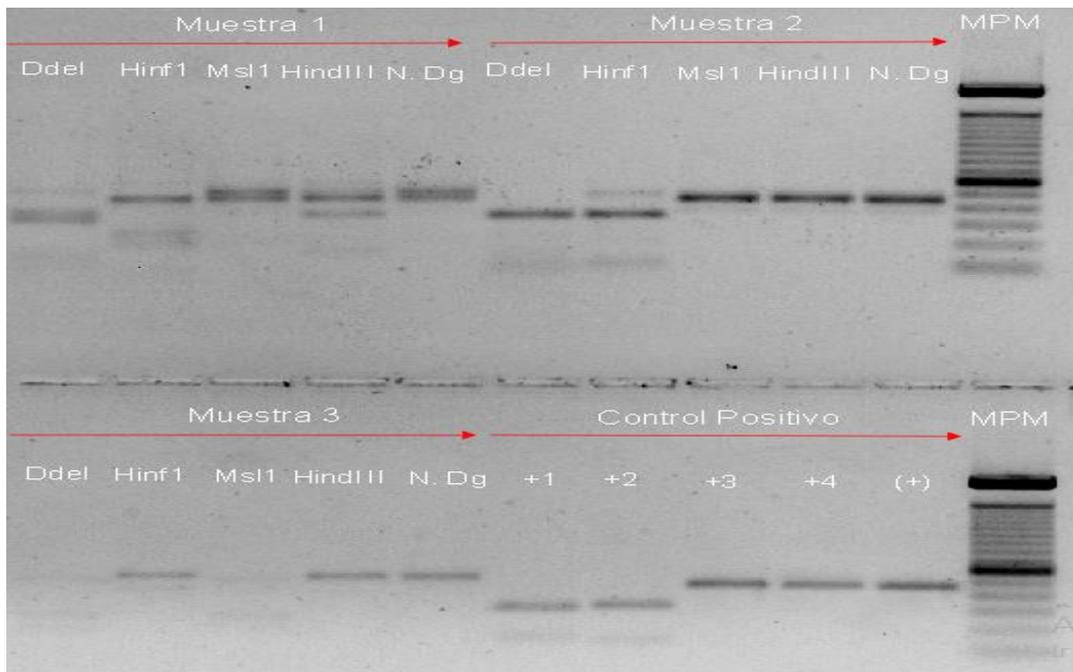


**Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a muestras positivas a la presencia de material genético de BPV (Reamplificación).** Carriles 1, 2, 3, 4: Muestras con resultados positivos; Carril 5: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). Los productos de PCR ( $\pm 470$  bp) correspondientes generados en las muestras positivas están indicados por las flechas.

### 7.3. Tipos de BPV identificados en las muestras positivas.

Las 4 muestras positivas fueron reamplificadas para la detección de material genético y los productos de PCR conseguidos se sometieron al análisis mediante el ensayo de RFLP (**Figura 3**). Con el ensayo de RFLP se logró genotipificar la presencia de 2 tipos diferentes de BPV (en la muestra 23 se encontró el BPV21, y en la muestra 31 se encontró el BPV13). En la muestra 45 no fue posible identificar un tipo de patrón de restricción claro, lo cual se propone que puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión (BPV3 o BPV16), por lo que se sugiere hacer secuenciación.

En las muestras que no se logró identificar el tipo o los tipos de virus causales de la lesión, ya sea porque pueden corresponder a una la mezcla de virus o por ser nuevos tipos de BPV (Nuevos patrones de restricción).



**Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de los perfiles de digestión de los productos de PCR de muestras positivas a BPV (RFLP).** Para cada una de las muestras 1, 2 y 3, más el Control (+); Carril DdeI: Producto de PCR digerido con la enzima *DdeI*; Carril HinfI: Producto de PCR digerido con la enzima *HinfI*; Carril MsL1: Producto de PCR digerido con la enzima *MsL1*; Carril HindIII: Producto de PCR digerido con la enzima *HindIII* y Carril N.Dg. Producto de PCR no digerido y Carril MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder.

**Tabla 8: Resultados de la identificación de material genético de los BPV presente en vejiga y su genotipificación.**

**IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL MATERIAL GENETICO DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO**

N° DE MUESTRAS	CP	PCR	RFLP	TIPO BPV
1	Válida			
2	No válida			
3	Válida			
4	Válida			
5	Válida			
6	Válida			
7	Válida			
8	No válida			
9	Válida			
10	Válida			
11	Válida			
12	Válida			
13	Válida			
14	Válida			
15	Válida			
16	Válida			
17	Válida			
18	Válida			
19	Válida			
20	Válida			
21	Válida			
22	Válida			
23	Válida	<b>Positivo</b>	Identificable	BPV 21
	Válida	<b>Positivo</b>	No identificable	Probable una mezcla
24	Válida			
25	No válida			
26	Válida			
27	Válida			
28	No válida			
29	No válida			
30	Válida			
31	Válida	<b>Positivo</b>	No Identificable	Probable es BPV 13



32	Válida			
33	No válida			
34	No válida			
35	No válida			
36	Válida			
37	Válida			
38	Válida			
39	Válida			
40	Válida			
41	Válida			
42	Válida			
43	Válida			
44	Válida			
45	Válida	<b>Positivo</b>	No Identificable	No se sabe si es BPV 3 o BPV 16
46	Válida			
47	Válida			
48	Válida			
49	Válida			
50	Válida			
51	Válida			
52	Válida			
53	Válida			
54	Válida			
55	Válida			
56	Válida			
57	Válida			
58	Válida			
59	Válida			
60	Válida			
61	Válida			
62	Válida			
63	Válida			
64	Válida			
65	Válida			



#### 7.4. Métodos estadísticos:

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0,59	1	0,4435
Irwin-Fisher bilateral	0,13		>0,9999

Estadístico	Estimado	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Odds Ratio 1/2	sd	sd	sd

Dentro de las pruebas de significancia estadística, se establece que conducen a conocer la magnitud de las diferencias y la significancia de los resultados; en este caso, no existe diferencia estadística debido a que el valor encontrado es 0,59 y la  $p \geq 0.05$ . Además esto hace que se acepte la pregunta de investigación ¿es posible encontrar en ellos ADN de virus de papiloma bovino?.



## 8. DISCUSIÓN

En la investigación realizada por (Vázquez, et. al., 2012), (1), se informa que la infección por Deltapapillomavirus (BVP13) lleva a la formación de papilomas y fibropapilomas principalmente en piel y genitales, de acuerdo a los datos obtenidos en el trabajo en este caso el BVP13 no hay relación ya que las muestras fueron obtenidas de la vejiga y no hay coincidencia alguna pero es muy importante decir que estos virus también pueden hallarse en el tejido de la vejiga.

El trabajo de (Violet, Montes, & Cardona, 2017), (42), explica que el BPV2 afecta el trato digestivo superior y vejiga por lo que está relacionado con el carcinoma de vejiga urinaria que en conjunto con el helecho (*Pteridium aquilinum*) son los causantes de la hematuria enzoótica bovina, se ha hecho comparación con este tipo de virus debido a que está presente en la vejiga de los bovinos por ello en esta investigación, no fue posible encontrar este tipo de virus.

En otro estudio, (Daudt, et. al., 2017), (43), describe que el BVP21 es un nuevo tipo de virus recientemente descrito; son representantes de un género no clasificado, se encuentra distribuido en Brasil, además son papilomas cutáneos; sin embargo al virus previamente descrito se lo encontró en la vejiga por lo que los virus del papiloma bovino pueden estar en cualquier parte del cuerpo del animal.

En la misma publicación (Daudt, et. al., 2017), (43), nos explica que la identificación genética por PCR utilizando los pares primarios diseñados para la detección del virus del papiloma bovino (FAP59/FAP64), que amplifica una región altamente conservada de papiloma bovino L1 gene ha permitido la identificación y caracterización de varios tipos del virus del papiloma en casi todas las especies afectadas; así como en nuevos tipos de BPV en ganado. Además, se han publicado recientemente nuevos tipos de virus de papiloma bovino parcial o totalmente secuenciados por Sanger o NGS que ha permitido el descubrimiento de nuevos tipos de BPV que no se amplificaron utilizando pares de cebadores FAP.

Por tal motivo, estudios realizados expresan que los virus del papiloma bovino se encuentren en determinada zona del cuerpo del animal, sin embargo es posible encontrarlos en otros lugares o también en una misma zona pueden existir varios tipos de virus, en este caso en la muestra número 23 se encontró dos tipos el BVP 21 y el otro no es identificable.



El artículo de (MacLachlan & Dubovi, 2011), (44), manifiesta que el BVP3 pertenece al género *Xipapillomavirus*; infecta solo a células epiteliales. En la muestra 45 se encontró un tipo de virus que no es detectable ya que, puede ser el BVP3 o el BVP16, por ello, basado en lo que el expone autor, el BVP3 no está relacionado con la vejiga urinaria por lo que esa muestra puede ser objeto de estudio para otro trabajo de investigación.

(Daudt, et. al., 2017), (43), expone que el virus de papiloma bovino BVP 16 pertenece al género *Dyokappa* y está dentro de una especie no clasificada que fue detectado en Brasil. Este virus BVP16 es causante de fibromatosis pulmonar y se encuentra ubicado en el cuerpo; sin embargo este virus no está asociado con el tejido de la vejiga urinaria y al igual que el BVP3 se puede apartar para investigaciones futuras.



## 9. CONCLUSIONES

- Se concluye que la mayor presencia de tumoraciones en vejiga es en las hembras mayores a 24 meses de edad, de la raza Criolla y Holstein, y muy pocas en machos; a diferencia de los bovinos menores a esa edad ya que no presentaban ninguna lesión en el tejido vesical.
- Del total de animales faenados se observó que los machos con lesión en la vejiga es del 0.6%, y los machos sin lesión en la vejiga es del 99.4%, mientras que en las hembras sin lesión en la vejiga corresponden al 45% y las hembras con lesión en la vejiga es del 55%.
- Mediante la genotipificación de las muestras se encontró el BPV21, en la muestra 45 no fue posible identificar un tipo de patrón de restricción, lo cual se propone que puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión (BPV3 o BPV16).



## 10. RECOMENDACIONES

- Dar a conocer los resultados obtenidos a las personas que están inmersas en la ganadería sobre los virus del papiloma y así brindar asesoría a los propietarios, ya que nos permitirá compartir conocimientos sobre cómo pueden mejorar el tipo de suelos, alimentación de sus animales, etc., y así disminuir la incidencia de la Hematuria Vesical Bovina, ya que esta tiene gran impacto económico y a la vez afecta la salud humana.
- Realizar la secuenciación de los productos de PCR de las muestras que no se logró determinar el tipo de BPV; y así ponerlo en observación para futuros estudios por lo que la información obtenida nos permitirá determinar el tipo de virus para observar con los ya descritos.
- La actual investigación en conjunto con estudios ya realizados nos ayudó a conocer más sobre los BPV, lo cual nos ayudará a desarrollar herramientas terapéuticas y profilácticas para la papilomatosis bovina que existe en el Ecuador



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Vázquez Díaz, R., Escudero Duch, C., Doménech Gómez, A., Gómez, E., & Benítez Rico, L. (2012). Papilomatosis bovina: epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Rev. complut. cienc. vet.* , 6(2), 38-41. Obtenido de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/41086/39322>
- (2) Borzacchiello, G. (2007). *Bovine papillomavirus infections in animals*. Obtenido de <http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages673-679.pdf>
- (3) Herencia, K., Falcón, N., García, M., Chavera, A., & Gonzáles, C. (2013). Prevalencia de hematuria vesical enzoótica bovina determinada mediante urianálisi en Oxampa, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú* , 24(1), 51. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v24n1/a07v24n1>
- (4) Rodríguez, R., Cordero, L., Gutiérrez, E., Castro, M., Chi, M., Navarro, R., & Castro, J. (2015). Papilomatosis bovina en el trópico mexicano: presentación clínica y control. *Bioagrocencias*, 8(1), 46. Obtenido de <http://www.ccba.uady.mx/bioagro/V8N2/BC%208.2%20Papilomatosis.pdf>
- (5) Dagalp, S., Dogan, F., Farzani, T., & Bastan, A. (2017). The genetic diversity of bovine papillomaviruses (BPV) from different papillomatosis cases in dairy cows in Turkey. *Arch. Virol.*, 162(6), 3. doi: 10.1007/s00705-017-3258-8
- (6) Merchán, M., Torres, M., & Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev haban cienc méd* , 16(5). Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000500012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012)
- (7) Borzacchiello, G. (05 de Julio de 2013). Bovine papillomavirus on the scene of crime: is E5 oncogene the only guilty party? *Infect Agent Cancer*, 26(8). doi:10.1186 / 1750-9378-8-26
- (8) Hamad, M., Al-Banna, A., & Yaseen, N. (2011). Cell culture established from warts of bovine papilloma. *Al-Anbar J. Vet. Sci*, 4, 78. Obtenido de <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=39450>



- (9) Borzacchiello, G. (10 de Marzo de 2011). *Bovine papillomavirus*. (M. Schwab, Ed.) Obtenido de [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-16483-5\\_693](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-16483-5_693)
- (10) Lunardi, M., Alfieri, A., Arellano, R., & Alfieri, A. (2013). Bovine Papillomaviruses — Taxonomy and Genetic Features. En *Bovine Papillomaviruses — Taxonomy and Genetic Features, Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications* (págs. 113-127). IntechOpen. Obtenido de <https://www.intechopen.com/books/current-issues-in-molecular-virology-viral-genetics-and-biotechnological-applications/bovine-papillomaviruses-taxonomy-and-genetic-features>
- (11) Carter, G., Wise, D., & Flores, E. (2005). *Virología Veterinaria*. New York. Obtenido de <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Virologia/images/Documentos/2009/VIROLOGIA%20VETERINARIA.pdf>
- (12) Araldi, R., Giovanni, D., Melo, T., Diniz, N., Mazzuchelli-de-Souza, J., Sant'Ana, T., . . . Beçak, W. (2014). Bovine papillomavirus isolation by ultracentrifugation. *j.viromet.*, 208, 119-124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.029>
- (13) Mariz, F., Jesus, A., & Silva, M. (2016). The challenges inherent in the control and prevention of bovine papillomaviruses. *J. Genet. Genome Res.*, 3(1). Obtenido de <https://austinpublishinggroup.com/genetics-genomic-research/fulltext/ajggr-v3-id1017.php#Top>
- (14) Carvalho, T., Pinto, C., & Conceicao, M. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *J. Comp. Path.*, 134(4), 336-346. doi:10.1016 / j.jcpa.2006.01.001
- (15) Ausech, G., & Satie, C. (2005). Clastogenic activity of 2-chlorodeoxyadenosine in mammalian somatic cells. (A. E. Menck, Ed.) *Gineta. Mol. Biol.*, 28(2), 339-343. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572005000200027>
- (16) Carvalho, T., Pinto, C., & Conceicao, M. (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *J. Comp. Path.*, 134(4), 336-346. doi:10.1016 / j.jcpa.2006.01.001



- (17) Roperto, S., Russo, V., Ozkul, A., Corteggio, A., Sepici-Dincel, A., Catoi, C., . . . Roperto, F. (7 de Mayo de 2013). Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the urothelial cells of naturally occurring urinary bladder tumors in cattle and water buffaloes. *Plos one*, 8(5), 1-7. doi:10.1371/journal.pone.0062227
- (18) Blanco, F. (2011). Valores analíticos de ganado vacuno en régimen extensivo expuestos al consumo de helecho. Obtenido de <http://eprints.ucm.es/15023/1/T33695.pdf>
- (19) Villablobos, A., Arraga de Alvarado, C., García, D., Pino, D., Villaroel, R., & Boscán, J. (2004). Observaciones clinicopatológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *Rev. Cientif. FCV-LUZ*, XIV(4), 317-318. Obtenido de <http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15060/15037>
- (20) Guzmán, V. (2010). *Avances en el diagnóstico de la hematuria vesical enzoótica bovina en Perú*. Obtenido de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/719/Guzman\\_sv.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/719/Guzman_sv.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- (21) Herencia, K., Falcón, N., García, M., Chavera, A., & Gonzáles, C. (2013). Prevalencia de hematuria vesical enzoótica bovina determinada mediante urianálisi en Oxampa, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 24(1), 51. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v24n1/a07v24n1>
- (22) Turchi-Roudsari, M. (2014). Multiple Effects of Bracken Fern under in vivo and in vitro Conditions. *Asia Pac. J. Cancer Prev.*, 15(18), 7505-7513. doi:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.18.7505>
- (23) Cianciolo, R., & Mohr, C. (2016). Causes of immune-mediated glomerulonephritis in domestic animals. En M. G. Maxie (Ed.), *Pathology of Domestic Animals* (Sexta ed., Vol. 2). Elsevier. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/ptaquiloside>
- (24) Gil da Costa, R., Bastos, M., Oliveira, P., & Lopes, C. (2011). Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological. 7. Obtenido de <https://www.researchgate.net/requests/r29518528>



- (25) Orozco, N., & Padilla, H. (2016). *Alternativas de tratamiento contra la papilomatosis bovina*. Universidad Nacional Agraria, Managua. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/3419/1/tnl73o74.pdf>
- (26) Archana, S., Prasad, A., Davis, J., & Seena, T. (2019). Bovine papillomatosis and its treatment under farm condition. (E. publisher, Ed.) *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, 8(04), 2881. doi:<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.336>
- (27) Jana, D., & Mukherjee, S. (2013). Therapeutic management of bovine cutaneous papillomatosis with ivermectin in farm bred calf crops of west bengal, India. *Explor. Anim. Med. Res.*, 3(2), 129. Obtenido de [http://animalmedicalresearch.org/Vol.3\\_Issue-2\\_December\\_2013/D%20Jana.pdf](http://animalmedicalresearch.org/Vol.3_Issue-2_December_2013/D%20Jana.pdf)
- (28) Kale, M., Saltik, H., Hasircioglu, S., Yildirim, Y., Yavru, S., Mamak, N., & Atli, K. (June de 2019). Treatment of Bovine papillomavirus-induced teat warts in a cow by using Podophyllin magistral formula and autologous vaccine applications together. *Indian J. Anim. Res.*, 53(6), 832-836. doi:10.18805 / ijar.B-911
- (29) Jana, D. (2015). *Studies on bovine and bubaline papillomatosis with special reference to its epidemiology, clinicopathology and therapeutics*. Obtenido de [https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/99496/15/15\\_synopsis.pdf](https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/99496/15/15_synopsis.pdf)
- (30) Avki, S., Turutoglu , H., Simsek, A., & Unsal , A. (2004). Clinical and immunological effects of Newcastle disease virus vaccine on bovine papillomatosis. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 98(1-2), 9-16. doi:10.1016/j.vetimm.2003.10.003
- (31) Sharma, R., Bhat, T., & Sharma, O. (2013). The Environmental and Human Effects of Ptaquiloside Induced Enzootic Bovine Hematuria A Tumorous Disease of Cattle. En *Reviews the environmental contamination and toxicology* (págs. 54,73,74). Himachal Pradesh, India: Springer. doi:10.1007/978-1-4614-5882-1\_3
- (32) Carvalho, R., Sakata, S., Giovanni, D., Mori, E., Brandão, P., Richtzenhain, L., . . . Stocco, R. (16 de Mayo de 2013). Bovine papillomavirus in brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *Biomed. Res. Int.*, 1-7. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2013/270898>



- (33) Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I., & Shirasawa, H. (August de 2004). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J. Gen. Virol.*, 85(8), 2191-2196. doi:<https://doi.org/10.1099/vir.0.80086-0>
- (34) Antonsson, A., & Hansson, B. (2002). Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.*, 76(24), 12537-12541. doi:10.1128 / jvi.76.24.12537-12542.2002
- (35) Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 2(2), 70-78. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- (36) Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (pág. 57). Cipamex. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
- (37) Pérez de Castro, A., & Picó Sirvent, M. (28 de 05 de 2014). Marcadores basados en restricción e hibridación: RFLPs (restriction fragment length polymorphisms). Obtenido de [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38353/articulo\\_docente\\_RFLPs.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/38353/articulo_docente_RFLPs.pdf?sequence=1)
- (38) Asthon, Q. (2012). Detection and quantification of bovine papillomavirus type 2 (BVP-2) by real time PCR in urine and urinary bladder lesions in enzootic bovine haematuria (EBH) affected cows. En ScholarlyEditions (Ed.), *Advances in DNA Research and Application: 2012 Edition*. Obtenido de [https://books.google.com.ec/books?id=IRhH-Hcht5sC&pg=PT88&lpg=PT88&dq=Detection+and+quantification+of+bovine+papilloma+virus+type+2+\(BPV-2\)+by+Real-PCR+in+urine+and+urinary+bladder+lesions+in+enzootic+bovine+haematuria+\(EBH\)-affected+cows.&source=bl&ots=g](https://books.google.com.ec/books?id=IRhH-Hcht5sC&pg=PT88&lpg=PT88&dq=Detection+and+quantification+of+bovine+papilloma+virus+type+2+(BPV-2)+by+Real-PCR+in+urine+and+urinary+bladder+lesions+in+enzootic+bovine+haematuria+(EBH)-affected+cows.&source=bl&ots=g)
- (39) Turk, N., Župančić, Ž., Starešina, V., Kovač, S., Babić, T., Kreszinger, M., . . . Milas, Z. (2005). Severe bovine papillomatosis: detection of bovine papillomavirus in tumour



- tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and parammunity inducer. *Vet. Arhiv* , 75(5), 391-397. Obtenido de <https://hrcak.srce.hr/31727>
- (40) Aguilar, J., Alvarado, C., & Romero , R. (2006). Observaciones personales en zonas endémicas. En *Hematuria Vesical Bovina* (pág. 25). Zaruma, El Oro.
- (41) Vallecillo, A. (2019). LI FAP segment digestion profiles of the BPVs 1- to 24 for DdeI, HinfI, MslII and HindIII.
- (42) Violet, L., Montes, D., & Cardona , J. (2017). Frecuencia de papilomatosis en bovinos (*Bos taurus*) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 2(9), 295. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/321660299\\_Frecuencia\\_de\\_papilomatosis\\_en\\_bovinos\\_Bos\\_taurus\\_del\\_departamento\\_de\\_Cordoba\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/321660299_Frecuencia_de_papilomatosis_en_bovinos_Bos_taurus_del_departamento_de_Cordoba_Colombia)
- (43) Daudt, C., Da Silva, F., Lunardi, M., Alves, C., Weber, M., Cibulski, S., . . . Canal, C. (2017). Papillomaviruses in ruminants: an update. *Transbound. Emerg. Dis.*, 65. doi:10.1111/tbed.12868
- (44) MacLachlan, J., & Dubovi, E. (Edits.). (2011). Papillomaviridae and polyomaviridae. *Veterinary virology*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/bovine-papillomavirus-type-3>

## 12. ANEXOS

12.1. **Anexo 1:** Camal Municipal del Piñas, lugar donde se recolectaron las muestras.



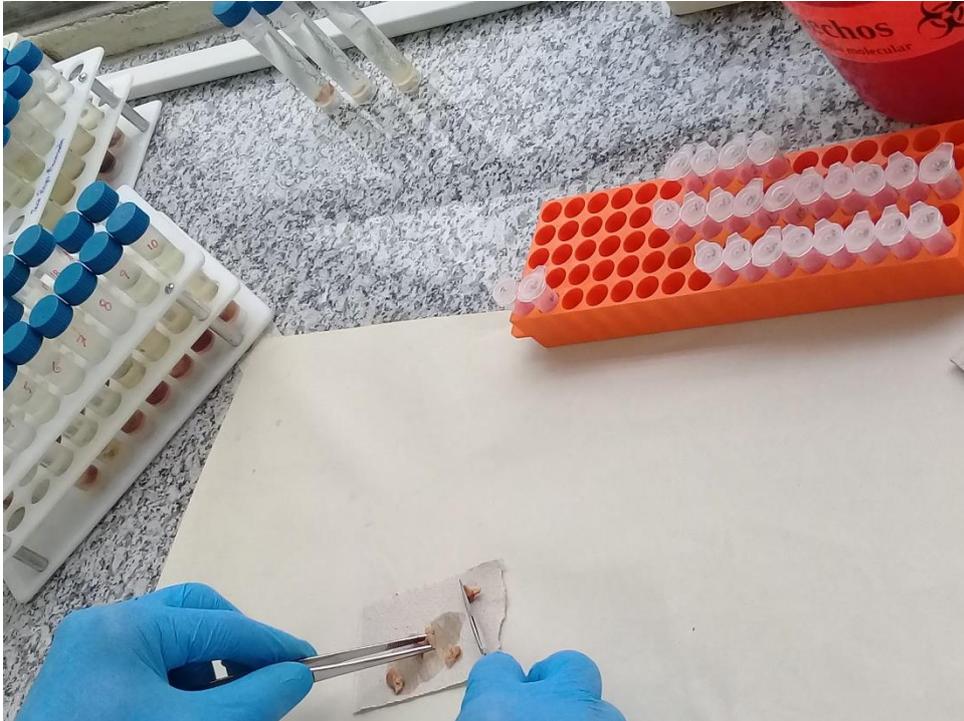
12.2. **Anexo 2:** Observación de las vejigas que presentan tumoraciones.



12.3. Anexo 3: Vejiga que presenta tumoraciones y orina con sangre.



12.4. Anexo 4: Muestras en el laboratorio (Extracción de ADN).





12.5. Anexo 5: Formato para la recolección de datos de los animales muestreados.

(6) - Ambra Prop Gilmar Logos  
Carpintero Moreno Condoz

Formulario número: \_\_\_\_\_

Raza: Crdlo Fecha: 02/09/18

Identificación del animal: \_\_\_\_\_ Arete oficial: \_\_\_\_\_  
 Otro arete: \_\_\_\_\_

Leche:  Carne:  Edad: 12-18 meses

Sexo: Macho:  Hembra:  Edad: 18-24 meses

Propietario: \_\_\_\_\_ C.I. 0707287231

Lugar de procedencia: Parícuta

Origen: Feria:  Exposición:  Predio:  Otro:

Destino: Feria:  Exposición:  Predio:  Camal:  Otro:

Tipo de alimentación: Balanceado:  Forraje:  Rechazo:  Otro:

Fuente de agua: Potable:  Río:  Acequia:  Bebederos:

Helechos en la área de pastoreo:  Sí  No  No sabe

Presencia de heridas en los animales: Sí:  No:  No sabe:

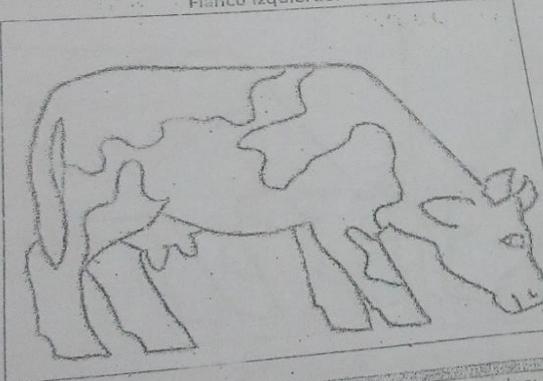
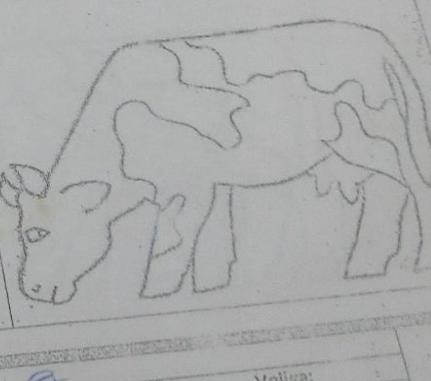
Presencia de moscas: Sí:  No:  No sabe:

Impieza-desinfección de instrumental médico: Sí:  No:  No sabe:

Reproducción de los animales: Monta:  l. artificial:  Problemas sanitarios en: Reproducción:  Leche:  Peso:  Otro:

Presencia de sangre en:  Orina:  Leche:  Otro:  NO

Lesiones: Nodulaciones en Vejiga

Flanco izquierdo:  Flanco derecho: 

Localización: Flanco izquierdo

Sangre:		Tejido:		Orina:		Vejiga:	
Número:	Identif.:	Número:	Identif.:	Número:	Identif.:	Número:	Identif.:
1		1		1		1	<input checked="" type="checkbox"/>
2		2		2		2	
3		3		3		3	
4		4		4		4	
5		5		5		5	
6		6		6		6	

**12.6. Anexo 6:** Datos de las muestras recolectadas con lesiones sugestivas a papilomatosis.

BOVINO	RAZA	SEXO	EDAD	PROVINCIA	CANTON	MUESTRAS	SITIO DE LA LESION
						Observación	
1	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Zaracay)	Orina con sangre	VEJIGA
2	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Moromoro)		
3	Brown Swiss	Macho	>24 meses	Guayas	Nobol	Pared de vejiga morada	
4	Brown Swiss	Macho	>24 meses	Guayas	Nobol	Pared de vejiga morada	
5	Brown Swiss	Hembra	>24 meses	Cotopaxi (Nobol)	Pangua		
6	Criolla	Hembra	>24 meses	Zamora Chinchipe (El Oro)	Zumba		
7	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Capiro		
8	Brahman	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Malvas)	Orina con sangre	
9	Girolando	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (La Bocana)		
10	Indubrasil	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Capiro)		
11	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Moromoro)	Vejiga rojiza	
12	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Huertas)		
13	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Muluncay)	Vejiga rojiza	
14	Brown Swiss	Hembra	>24 meses	El Oro	Portovelo (Salatí)		
15	Brahman	Hembra	>24 meses	El Oro	Portovelo (Salatí)	Orina con sangre	
16	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Portovelo (Salatí)		
17	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Portovelo (Curtincapac)	Orina con sangre	

18	BxB	Hembra	>24 meses	El Guayas	Nobol	Orina con sangre
19	Gyr	Hembra	>24 meses	El Guayas	Nobol	
20	Brahman	Hembra	>24 meses	El Guayas	Nobol	
21	Hostein	Hembra	>24 meses	El Oro	Atahualpa (Apartadero)	Vejiga rojiza
22	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Atahualpa (Apartadero)	
23	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Capiro)	
24	BxH	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Capiro)	
25	BxB	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Capiro)	
26	BxB	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Capiro)	
27	BxB	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Capiro)	
28	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Marcabelí	
29	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Marcabelí	Vejiga morada
30	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Marcabelí	
31	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Marcabelí	
32	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Balsas (Las Palmas)	
33	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Balsas (Bella María)	
34	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (San Roque)	
35	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (San Roque)	
36	Brahman	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Lozumbe)	
37	Brahman	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Lozumbe)	



38	Brahman	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Potrerito)	
39	BxB	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Mochata)	
40	BxB	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Conchicola)	
41	B	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Conchicola)	Orina con sangre
42	BxH	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Moromoro)	
43	Indubrasil	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (La Bocana)	
44	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Agua Fría)	
45	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Agua Fría)	
46	Gyr	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (La Bocana)	
47	Gyr	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (La Bocana)	
48	Brahman	Hembra	>24 meses	El Oro	Piñas (Piedras)	
49	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	
50	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	
51	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	
52	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Guizaguiña)	
53	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Zaruma)	
54	Criolla	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Zatuma Urco)	
55	Brown Swiss	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Zatuma Urco)	
56	Brown Swiss	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Zatuma Urco)	

57	Brown Swiss	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Zatuma Urco)	
58	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Malvas)	
59	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	Orina con grumos de sangre
60	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	
61	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	
62	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Arcapamba)	
63	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Salvias)	
64	BxH	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Sinsao)	
65	Holstein	Hembra	>24 meses	El Oro	Zaruma (Sinsao)	

Fuente: Giancarlo Bermeo Granda

- **BxB:** Brown Swiss x Brahman
- **BxH:** Brown Swiss x Holstein



12.7. Anexo 7: Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso.

 UNIVERSIDAD DE CUENCA Desde 1867	<b>Laboratorio de Biología Molecular</b>		01-FE-MBM-TaqPol	
	Formato de ensayo:		Versión:	1
	Taq ADN polimerasa		Fecha:	2016.08.23
			Página:	1 de 2

**A.- Información del ensayo:**

Usuario: 1			
Fecha: 2018.10.15		Nombre del programa: Bcn -CPro_2016 (Brucella)	
No:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1	12SRib-Mi	707-708	Control de proceso
2			
3			
4			
5			

**B.- Mezcla de reacción:**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	27.25 40.75 µl 181.5	2.26 µl
Buffer de amplificación 10X.	10X	1X	37.5 12.5 µl 25	1 µl
Solución de dNTP's.	10 mM	0.1 mM	3.75 1.25 µl 2.5	0.1 µl
Solución de MgCl <sub>2</sub> .	50 mM	2.0 mM	15 5 µl 10	0.2 µl
Oligonucleotido 12SRWMed-F.	100 µM	0.8 µM	3 1 µl 2	0.08 µl
Oligonucleotido 12SRVMed-R.	100 µM	0.8 µM	3 1 µl 2	0.08 µl
Oligonucleotido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido -R.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido -R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	5 U/µl	0.04 U/µl	3 1 µl 2	0.08 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	12.5 µl 25	1 µl
<b>Volumen final:</b>			125 µl 250	10 µl

**C.- Perfil de temperaturas de amplificación:**

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 35			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo (min, seg):	5'	45"	30"	45"	5'	∞
Temperatura (°C):	94.0 °C	94.0 °C	55.0-60.0 °C	72.0 °C	72.0 °C	4.0 °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.:												



12.8. Anexo 8: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de los BPV.

 <p>UNIVERSIDAD DE CUENCA desde 1867</p>	<b>Laboratorio de Biología Molecular</b>		01-FE-MBM-TaqPol	
	Formato de ensayo: <b>Taq ADN polimerasa</b>		Versión:	1
			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	BoBPV1_L1	± 430-460	Detección de BoBPV
2			
3			
4			
5			

**B.- Mezcla de reacción:**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	181.893.5 µl	391.25 µl
Buffer de amplificación 10X.	10X	1X	12.5 µl	62.5 µl
Solución de dNTP's.	10 mM	0.1 mM	1.25 µl	6.25 µl
Solución de MgCl <sub>2</sub> .	50 mM	2.0 mM	5 µl	25 µl
Oligonucleotido FAP59 -F.	100 µM	0.8 µM	1 µl	5 µl
Oligonucleotido FAP64 -R.	100 µM	0.8 µM	1 µl	5 µl
Oligonucleotido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido -R.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido -R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	5 U/µl	0.04 U/µl	1 µl	5 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	25 µl	125 µl
<b>Volumen final:</b>			120 µl	625 µl

176.5 µl H<sub>2</sub>O  
 25 µl B 10X  
 2.5 µl dNTP's  
 10 µl MgCl<sub>2</sub>  
 2 µl FAP59  
 2 µl FAP64  
 1 µl Enzima  
 20 µl  
 - 38.75

2019.01.28  
 8 + 2 envases  
 - H<sub>2</sub>O - 78.25  
 - B10X - 12.5  
 - dNTP's - 1.25  
 - MgCl<sub>2</sub> - 5  
 - FAP59 - 1  
 - FAP64 - 1  
 - Enzima - 1  
 - Muestra - 25 µl / 125

Extensión final:	Almacenamiento:
	8
°C	°C

10	11	12