

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE UN
PÉPTIDO SINTÉTICO CONTRA EL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO.**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

PRESENTA:

L.B.G. PAOLA LEONOR GARCÍA CORONADO

JUNIO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE UN PÉPTIDO
SINTÉTICO CONTRA EL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO”**

COMITÉ DE TESIS

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Director

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dra. Diana Ginette Zarate Treviño
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Santiago Saavedra Alonso
Vocal





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE UN PÉPTIDO
SINTÉTICO CONTRA EL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO”**

DIRECCIÓN DE TESIS

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Romo Sáenz", written over a horizontal line.

Director

A handwritten signature in black ink, appearing to be "César Iván Romo Sáenz", written over a horizontal line.

Dr. César Iván Romo Sáenz
Co-Director Externo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE UN PÉPTIDO
SINTÉTICO CONTRA EL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO”**

TESISTA

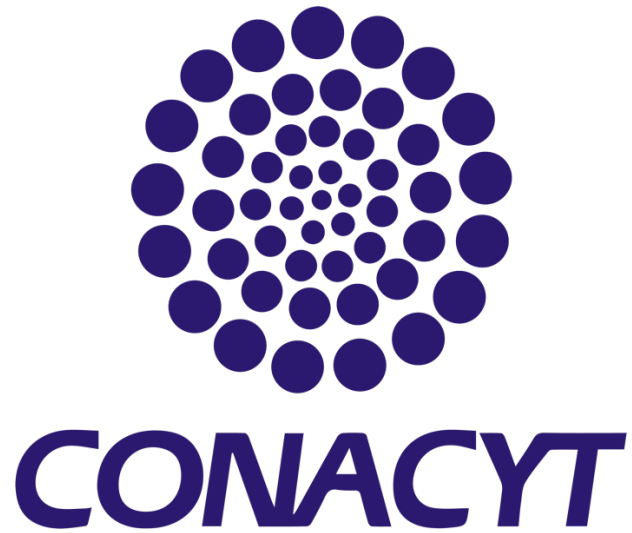
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paola Leonor García Coronado".

L.B.G. Paola Leonor García Coronado

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a mis padres Juana María Coronado Tolentino y Jorge Arturo García González. Gracias por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS



El desarrollo de esta Tesis se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología y al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología.

Agradecimiento especial a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de Investigación.

Le agradezco principalmente mi familia, especialmente a mis padres, porque gracias a ellos soy la persona que soy. Por estar siempre para mí. Gracias a mi madre por su amor incondicional y siempre hacerme palomitas para estudiar o ver películas; a mi padre por sus clases desde pequeña. Gracias a mis hermanos, por los buenos y malos momentos. Especialmente a mi hermana Katia por las tardes de sábado de películas y siempre ser mi cómplice en todo ¡Te quiero mucho!.

También le agradezco a los maestros que tuve a lo largo de la maestría. Por enseñarme no solo conocimientos, si no como obtenerlos.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, por ayudarme en el trayecto, a Mario, Erick, Gustavo, Yarellys, Silvia, Kenia Cristie, Tony, Pedro. Gracias al Dr. Moisés Franco por darme la oportunidad de entrar al laboratorio, su amistad y consejos.

Gracias a mis amigos que me acompañaron dentro o fuera del laboratorio: Andrea Cepeda, Fernando gracias por tu amistad incondicional y aguantarme, Pedro A. por tu apoyo y comprensión, Juan por tu amistad, ánimos y soportar junto conmigo los regaños del Dr. Moisés; a Ana, Ale y Kike por siempre estar, a mis compañeros de generación, por aquellos días completos en Sayulita, a Aldo en mis crisis existenciales, apoyo incondicional y amistad, los nuevos amigos que hice como Ricardo y Ayme por aquellos momentos en los cuales reímos y lloramos en Guanajuato (cuando perdimos los posters), mis nuevos amigos de laboratorio Sofia, Oziel.. Gracias Alex por apoyarme y alimentarme.

Un agradecimiento especial al Dr. César Romo no solo por ser excelente co-director, si no también por tu gran amistad y apoyo, GRACIAS por darle pies y cabeza a este proyecto.

Gracias a mis mascotas Cactus Jack, Mufasa y Lagertha que alegran todos mis días, ¡Los amo!

Finalmente, gracias a los ratones que fueron empleados durante esta investigación. Descansen en paz. Realmente trate de hacerlo de la mejor manera posible.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-ANTECEDENTES	2
2.1.-PAPILOMATOSIS BOVINA	2
2.2.-IMPORTANCIA ECONÓMICA	3
2.3.- VIRUS DE PAPILOMA BOVINO.....	6
2.4.- GENOTIPOS Y PREVALENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO.....	11
2.5.-EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE	14
2.6.- TRATAMIENTOS CONVENCIONALES PARA LA PAPILOMATOSIS BOVINA..	16
2.7.- VACUNAS INACTIVADAS PROFILÁCTICAS Y TERAPEUTICAS PARA LA PAPILOMATOSIS BOVINA.....	17
2.8.- VACUNAS DE PÉPTIDO SINTÉTICO O PARTÍCULAS TIPO VIRUS PARA LA PAPILOMATOSIS BOVINA	21
2.9.-VACUNA PROFILÁCTICA PARA EL PAPILOMA HUMANO	22
3.-JUSTIFICACIÓN	23
4.-HIPÓTESIS	24
5.-OBJETIVO GENERAL	25
6.- OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
7.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
8.- METODOLOGÍA	28
8.1.-EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL.....	28
8.2.-AMPLIFICACIÓN DE GENES VIRALES L1, L2 Y E7 DEL VPB POR PCR	29
8.3.-SECUENCIACIÓN DE DE GENES VIRALES L1 Y L2 DE VPB	30
8.4.-REALIZACIÓN DE ÁRBOL FILOGENÉTICO.....	31
8.5.-PREDICCIÓN DEL PÉPTIDO CANDIDATO A VACUNA <i>IN SILICO</i>	31
8.6.-EXTRACTO DE ANTÍGENO TOTAL INACTIVADO CON ETILENIMINA BINARIA 2M	32
8.7.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	33

8.8.-INMUNIZACIÓN EN MODELO MURINO CON PÉPTIDO CANDIDATO CONTRA VPB-1 Y OBTENCIÓN DE SUERO.....	34
8.9.-ENSAYO DE ELISA: SUERO ANTI-VERRUGA CONTRA LISADO DE VERRUGA TOTAL O PÉPTIDO.....	34
8.10.-ENSAYO DE ELISA: SUERO ANTI-PÉPTIDO CONTRA LISADO DE VERRUGA TOTAL O PÉPTIDO.....	35
8.11.-ENSAYO DE ELISA: SUERO ANTI-VERRUGA PROVENIENTE DE TORO CONTRA LISADO DE VERRUGA TOTAL O PÉPTIDO.	36
9.-RESULTADOS.....	37
9.1.-PREVALENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO EN LOS ESTADOS DE NUEVO LEÓN, VERACRUZ, CHIAPAS Y TABASCO.....	37
Diseño de un péptido sintético con función profiláctica putativa contra el Virus de Papiloma Bovino.	43
9.2.-DISEÑO <i>IN SILICO</i> DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO DERIVADO DE LA PROTEÍNA VIRAL DE CÁPSIDE L1 DEL VPB.....	47
9.3.-LA INMUNIZACIÓN EN RATONES CON EL PÉPTIDO SINTÉTICO INDUCE UNA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	51
10.-DISCUSIÓN	60
11.-CONCLUSIONES	67
12.-PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	68
13.-REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Papilomatosis por el VPB en otras especies diferentes al bovino.	3
Figura 2. Intercambio comercial de carne de bovino del 2007-2017	4
Figura 3. Exportación de cabezas de bovino a los Estados Unidos de Améric...	5
Figura 4. Mapa transcripcional lineal del VPB-1	7
Figura 5. Modelo de la cápside del VPB.	9
Figura 6. Expresión de proteínas virales de VPB-1 en capas de la dermis	10
Figura 7. Árbol filogenético de genotipos reportados del VPB	11
Figura 8. Fibropapilomas por VPB-1/5/6	12
Figura 9. Tinción con Hematoxilina y Eosina ilustrando lugar de acción de las...	14
Figura 10. Papilomatosis en ubre.	18
Figura 11. Reducción de volumen em verrugas cutáneas por VPB tratadas ...	19
Figura 12. Cortes histológicos de verrugas cutáneas por VPB	20
Figura 13. Estrategia Experimental General	27
Figura 14. Inmunización con péptido sintético o extracto de Ag total en BALB-c	33
Figura 15. Inmunización con extracto de Ag total en toro Beef Master de 4 ...	33
Figura 16. VPB-1 en ranchos 1-11, 13-14 y 16-25.	38
Figura 17. Análisis de identidad de las secuencias de nucleótidos obtenidas ...	39
Figura 18. VPB-2 en ranchos 8-11, 13-14 y 18-25.	40
Figura 19. Gel de electroforesis ilustrativo de co-infección con VPB-1 y VPB-...	41
Figura 20. Análisis de identidad de las secuencias de nucleótidos obtenidas ...	42
Figura 21. Validación de controles de PCR para VPB-1 y VPB-2.	43
Figura 22. Árbol filogenético de VPB-1 de ranchos ubicados en Nuevo Le...	45
Figura 23. Árbol filogenético de VPB-2 de ranchos ubicados en Veracruz y ...	46
Figura 24. Región C-terminal de L1 como candidata a péptidos sintéticos.	47
Figura 25. El péptido sintético es capaz de inducir una respuesta inmune en...	48
Figura 26. Posible doble especificidad del péptido basado en VPB-1 contra ...	48
Figura 27. Homología entre el péptido sintético candidato contra el VPB-1	49
Figura 28. La secuencia aminoacídica del péptido candidato posee antigeni...	50

Figura 29.	Espectro de masas de péptido candidato a vacuna contra VPB-1.	50
Figura 30.	Reactividad de suero anti- verruga contra LVT en dilución 1:00 en ...	52
Figura 31.	Reactividad de suero anti-péptido contra péptido en dilución 1:100...	53
Figura 32	Reactividad de suero anti- verruga contra péptido en dilución 1:200...	54
Figura 33	Reactividad de suero anti-péptido contra LVT en dilución 1:200 al ...	55
Figura 34	Ausencia de reactividad de suero anti-adyuvante completo de Freund ...	56
Figura 35	Reactividad de suero anti- verruga contra LVT en dilución 1:100...	57
Figura 36.	Reactividad de suero anti-toro contra LVT en dilución 1:100-1:160...	58
Figura 37	Reactividad de suero anti-toro contra péptido sintético en dilución ...	59
Figura 38	Propuesta de vacuna de ADN con epítotope derivado de la prote...	66

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1 Predicción de ganancia de canal por exportación por un valor de \$4100 dólares por tonelada al mayoreo.....	5
Tabla 2 Blancos para genotificación de VPB.....	13
Tabla 3 Blancos para genotificación de VPB por PCR y tamaño de amplicon.....	29
Tabla 4 Condiciones de corrimiento de reacción de PCR.....	30
Tabla 5 Distribución de genotipos de VPB por estado.....	43

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
aa	aminoácido
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
BoLA	Antígeno leucocitario de bovino
BPV	Bovine Papilloma Virus
FMDV	Picornavirus Virus de fiebre aftosa
G	Gramos
HDI	Antígeno leucocitario de murino
HLA	Antígeno leucocitario humano
HPV	Virus de Papiloma Humano
IBT	Instituto de Biotecnología
Ig	Inmunoglobulina
LVT	Lisado de verruga total
M	Molar
min	minutos
mL	Mililitros
N.L.	Nuevo León
° C	Grados Celsius
ARN	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
T _a	Temperatura ambiente
UNAM	Universidad Autónoma de México
VSV	Estomatitis vesicular
µL	Microlitros
µM	Micromolar
Da	Dalton
BEI	Etilenimina binaria
VLP	Partícula tipo virus

RESUMEN

En México la ganadería es un sector de importancia económica, reportes de la SENASICA indican que no se ha cumplido con la demanda de cabezas y canal de exportación debido a diversos factores, entre estos están las enfermedades. La papilomatosis bovina se caracteriza por la aparición de verrugas cutáneas, mucosas y/o genitales y es provocada por el virus del papiloma bovino (VPB el cual icosaédrico no envuelto con ADN circular de doble cadena de 8 kb) el cual ingresa a través de una herida en la piel y se disemina de un individuo a todo el ganado a través del contacto directo o indirecto. Infecta no solo en bovinos si no en equinos, jirafas, caninos, etc. El sector más susceptibles a infección son los bovinos jóvenes (hasta 2 años). En México no hay disponible un tratamiento ni vacuna profiláctica específica para el virus. Surge la necesidad de crear estrategias para el control de la enfermedad, por lo cual en el presente estudio se diseñó un péptido sintético derivado de la proteína viral mayor de cápside L1 derivada del genotipo mayormente circulante en los estados de Nuevo León, Chiapas, Veracruz y Tabasco (VPB-1). El genotipo de prevalencia en dichos estados fue el VPB-1 y VPB-2. Se observó en las muestras representativas de VPB-1 y VPB-2 locales que las secuencias de L1 y L2 son altamente conservadas, en especial la primera (incluso mayormente presente) por medio de un árbol filogenético en MEGA 10.1. La predicción *in silico* de epitope de célula B arrojó que el péptido candidato pertenece a la región C terminal de la proteína viral L1. Para probar la inducción de la respuesta humoral se realizaron inmunizaciones (3 dosis) en un modelo murino de BALB-c y se obtuvo suero sanguíneo por semana. Se comparó la reactividad de los anticuerpos específicos por ELISA indirecta con el anti-suero producto de la inmunización con un extracto de antígeno total inactivado con BEI 2M en un modelo murino de BALB-c. Se comprobó la especificidad de los anticuerpos producto de la inmunización con el péptido sintético contra un lisado de verruga total/ péptido sintético, observándose reactividad hasta título 1:200 comprobándose así como epitope inmunogénico.

ABSTRACT

Livestock is a sector of economic importance in Mexico, SENASICA reports indicate that the demand for bovine carcass has not been reached due to various factors, among these are diseases. Bovine papillomatosis is characterized by the appearance of cutaneous, mucous, and / or genital warts and is caused by the bovine papillomavirus (BVP, an icosahedron not enveloped virus with 8 kb double-stranded circular DNA) which enters through a wound on the skin and spreads from one individual to all livestock through direct or indirect contact. It infects not only in cattle but also in horses, giraffes, canines, etc. The most susceptible sectors to infection is young cattle (up to 2 years old). In Mexico, there is no specific prophylactic vaccine or treatment available. There is a need to create strategies for control of disease, which is why in this study a synthetic peptide was designed derived from the major viral capsid L1 protein derived from the mostly circulating genotype in the states of Nuevo León, Chiapas, Veracruz and Tabasco (BPV-1). Genotype prevalence in states previously mentioned were VPB-1 and VPB-2. VPB-1 and BPV-2 were observed in local representative samples, L1 and L2 sequences were highly conserved, especially the first one (almost all samples were positive for BPV-1) by means of a phylogenetic tree in MEGA 10.1. *In silico* B-cell epitope prediction showed that the candidate peptide belongs to C-terminal region of L1 viral protein. To test the induction of the humoral response, immunizations (3 doses) were performed in a BALB-c murine model and blood serum was obtained weekly. Reactivity of specific antibodies by indirect ELISA was compared with anti-serum product of immunization with an extract of total antigen inactivated with BEI 2M in same model. Specificity of the antibodies induced by synthetic peptide against a total wart lysate/ synthetic peptide was verified, with reactivity up to titer 1:200. Based on results the synthetic peptide is considered an immunogenic epitope.

1.-INTRODUCCIÓN

La papilomatosis bovina se caracteriza por la aparición de verrugas las cuales pueden ser cutáneas, mucosas y/o genitales debido al genotipo/s presentes en la infección. Estas pueden presentar consistencia diversa, desde pedunculada a plana con distintos tamaños y colores. La enfermedad es causada por el virus del papiloma bovino (VPB), el cual presenta una morfología icosaédrica no envuelto con ADN circular de doble cadena de 8 kb, su cápside esta compuesta principalmente por la proteína viral mayor de cápside L1 (en pentámeros ensamblados en el centro por la proteína viral menor de cápside L2). El VPB ingresa a través de una herida en la piel, diseminándose de un individuo a todo el ganado a través del contacto directo o indirecto; tiene una infección productiva en los queratinocitos donde se lleva a cabo el ensamblaje de L1 y L2 (Saveria, Grindlay & McGarvie, 2002) también dependiendo de la diferenciación epitelial escamosa (Kajitani et al., 2012). La cápsula está compuesta por 72 pentámeros de la proteína L1 unida, estando esta implicada en la entrada del virus a la célula (Modis, Trus y Harrison, 2002). Posee un período de incubación de 1-3 meses, principalmente a una edad temprana en el ganado (2 años) (Venuti et al., 2011). Además de la aparición de verrugas como manifestación de la enfermedad, la infección aumenta el riesgo de carcinogénesis e inmunosupresión (especialmente el genotipo VPB-4), lo que disminuye la salud de los animales (debido al daño en el ADN) y se traduce en pérdidas económicas. (Pinheiro *et al.*, 2016). La falta de tratamientos en México tratamientos específicos contra la enfermedad así como estrategias profilácticas, surge la necesidad de desarrollar vacunas profilácticas para controlar la aparición de la enfermedad y como consecuencia de esta la aparición de otras debido a la susceptibilidad a infecciones bacterianas. Campos y colaboradores en los noventa patentaron en Estados Unidos de América un péptido sintético capaz de inducir neutralización contra el VPB-4 derivado del mismo. Se necesita generar una estrategia profiláctica para evitar y controlar la aparición de la enfermedad por lo cual en el presente trabajo se pretende evaluar la capacidad de inducir respuesta humoral de un péptido sintético derivado de VPB-1 en un modelo murino (BALB-c).

2.-ANTECEDENTES

2.1.-PAPILOMATOSIS BOVINA

La papilomatosis es una enfermedad multifactorial neoplásica causada por el VPB, su aparición es más común en novillos de hasta 2 años de edad. El virus está asociado a la aparición de verrugas benignas y malignas. Siendo algunos sinonimias de la enfermedad: verruga, tumor o neoplasias (Mayilkumar, Kokila, Prabhu, & Gopal, 2014; Pinheiro Araldi *et al.*, 2017).

Se clasifican como tumores benignos, desprovistos de pelo, de curación espontánea, producidos por virus, que afecta a la piel y a veces a la córnea o la mucosa de los tractos genital o urinario (Mayilkumar *et al.*, 2014).

El VPB se transmiten por contacto directo o por contagio indirecto. La aparición de las verrugas o papilomatosis bovina tiene un período de incubación de 1 a 3 meses y es de rápida difusión en el ganado. Generalmente entra el virus a través de heridas en la piel. Entre los factores de riesgo se encuentran la desnutrición, inadecuada higiene, estrés y heridas. Aunque es un virus originado en bovinos puede ser transmitido hacia otras especies (Figura 1). Siendo en equinos la segunda especie más común siguiendo de los bovinos (Mattil-Fritz *et al.*, 2008). Puede haber infección en el organismo sin aun presentarse las verrugas, de manera asintomática, se ha reportado evidencia de presencia del virus en liquido seminal, e incluso semen comercial proveniente de Brasil (Fava *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016; Silva, Pontes, Da Silva, Guerra, & Freitas, 2011; Silva, Silva, Gurgel, Nascimento, & Freitas, 2014).



Figura 1. Papilomatosis por el VPB en otras especies diferentes al bovino. Papilomatosis por VPB en equinos, caprinos, caninos, porcinos y jirafas.

2.2.-IMPORTANCIA ECONÓMICA

La aparición de la papilomatosis bovina se traduce en pérdidas económicas, ya que disminuye la ganancia en exhibiciones de ganado de alto valor monetario y genético, así como su venta de ganado o la venta de canal (castigándose su precio o no vendiéndose), en caso de encontrarse en las ubres dificulta el ordeño y provoca mastitis mientras que en el caso de verrugas genitales dificulta la monta. Al verse afecta la piel, esta disminuye el valor o incluso puede no llegar a usarse al no poder trabajarse, así como también los productos derivados de los órganos en el caso de verrugas en tracto digestivo. (Orozco & Padilla, 2016).

A nivel mundial, México figura dentro de los 11 países con mayor exportación de canal de ganado bovino por tonelada (Figura 2). Nuevo León (N.L.) pertenece a uno de los estados ganaderos (Figura 3) (SENASICA, 2019), el cual es considerado

cuello de botella para la exportación las cabezas que llegan de estados del sur de la República Mexicana y estos a su vez reciben de Sudamérica.

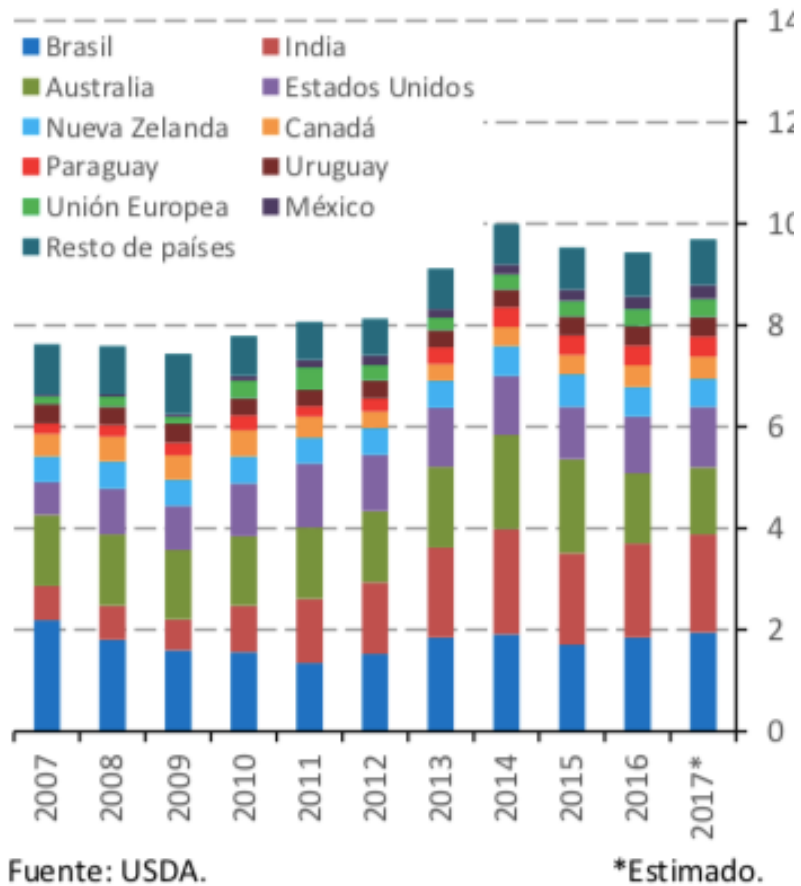
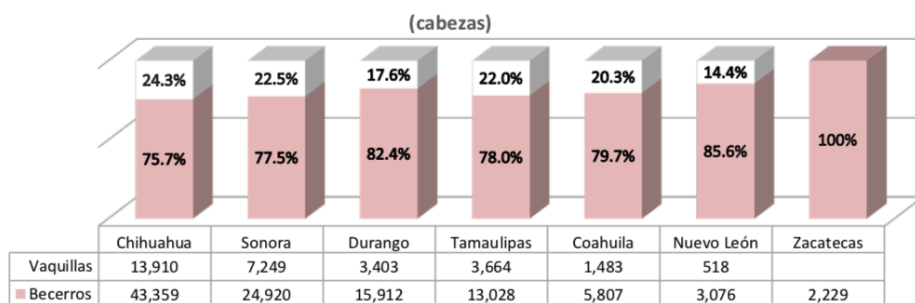


Figura 2. Intercambio comercial de carne de bovino del 2007-2017. (Millones de toneladas equivalente en canal). Tomado de SIAP, 2019, México figura dentro de los 11 países ganaderos del mundo.



Fuente: Elaborado por el SIAP con información del SENASICA

Figura 3. Exportación de cabezas de bovino a los Estados Unidos de América por estado de México. Tomado de SIAP, 2019. Exportación de cabezas al extranjero por estado de México.

México ha estado por debajo de la demanda de canal en los últimos años predicha por el gobierno de México, con un valor de \$4,100 dólares por tonelada de carne de bovino al mayoreo (SIAP, 2019). En la tabla 1 se expone la predicción de millones de dólares por tonelada de canal para los próximos años; estos valores pueden verse afectados por la aparición de la papilomatosis bovina, ya que en los rastros tipo TIF no es admitida canal infectada o se castiga el precio hasta un 50%.

Tabla 1.- Predicción de ganancia de canal por exportación por un valor de \$4100 dólares por tonelada al mayoreo (SIAP, 2019)

Año	Millones de toneladas	Precio en dólares
2019	70	287,000,000,000
2021	75	307,500,000,000
2025	78	319,800,000,000

2.3.- VIRUS DE PAPILOMA BOVINO

La enfermedad se transmite por medio del VPB perteneciente a la familia papilomaviridae. Es un virus no citolítico que no causa viremia, entra a través de heridas, su naturaleza es de ADN de doble cadena circular de 8 Kb, el cual provoca la aparición de verrugas cutáneas, genitales y de epitelio, pudiendo incluso integrarse en el genoma del hospedero. El genoma del VPB se compone de genes de expresión temprana (implicados en el mantenimiento del genoma) y los expresión tardía (implicados en el ensamblaje e infección productiva en las células, además de la entrada a células no infectadas), en la Figura 4 se observa la representación de los genes dentro del genomas.

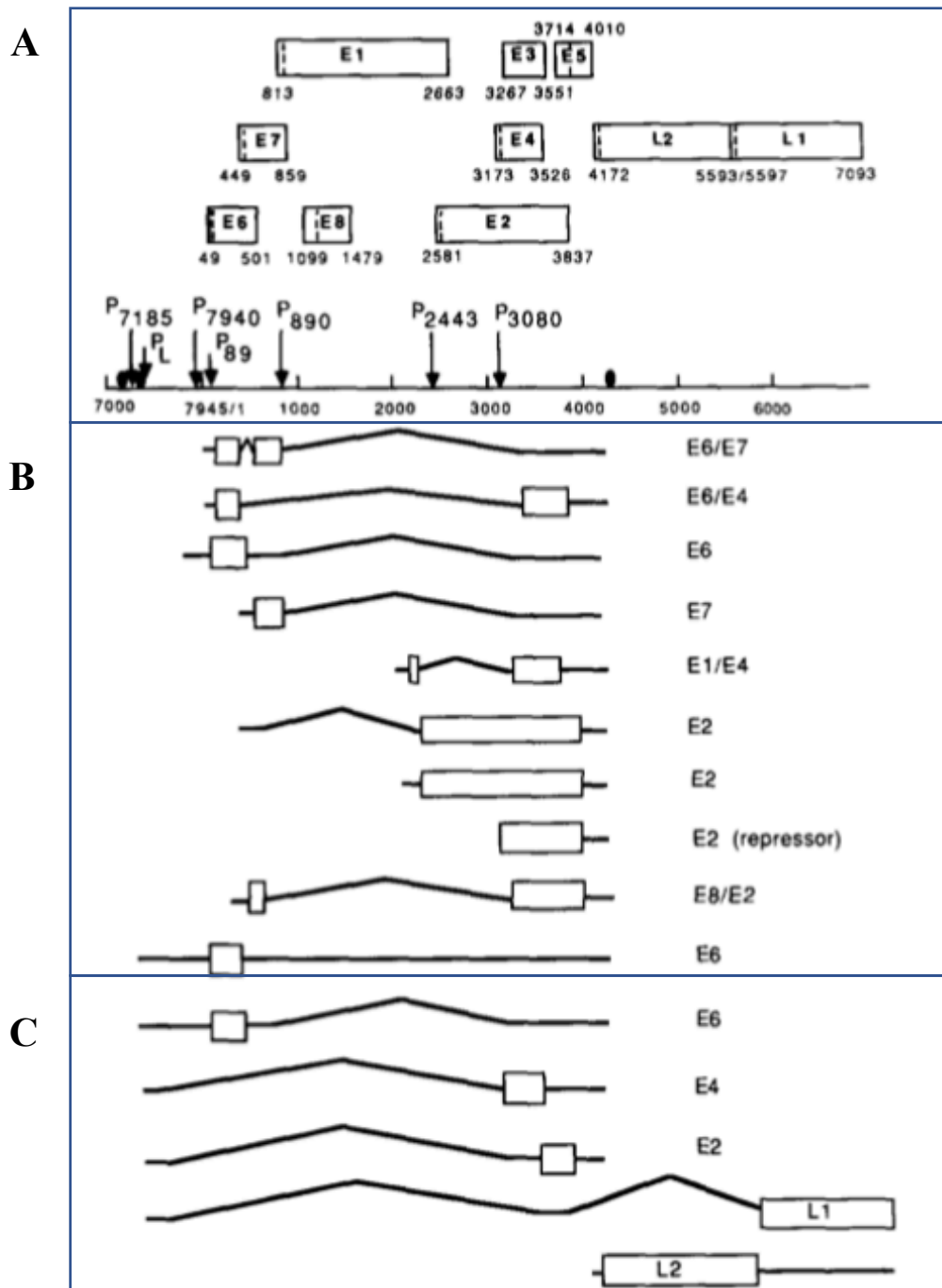


Figura 4. Mapa transcripcional lineal del VPB-1. Tomado y modificada de Sousa *et al.*, 1990. A. Se observan los genes de expresión temprana E1-E8 con sus sitios de poliadenilación en las flechas. B. Se ilustra el ADN codificante de genes virales en células transformadas C. Se ilustra el ADN codificante de genes específicos de fibropapilomas. Las líneas indican regiones no traducidas y las líneas inclinadas sitios de splicing.

El genoma del VPB se mantiene episomal durante la transformación de células en especies no hospederas como las observadas en la Figura 1 con la característica de la expresión de genes virales de expresión temprana como los observados en la Figura 4 B, para mantener el número de copias del genoma y controlar el crecimiento celular. Se da la expresión de proteínas de capsida en queratinocitos diferenciados de bovino (Sousa *et al.*, 1990). Existen reportes que indican que se mantiene el ADN del VPB hasta 6 pases en cultivos primarios de papiloma cutáneo, fibropapilomas y carcinomas de esófago; dichos cultivos muestran como características un fenotipo de adquisición de células madre y de migración como biomarcadores (Pinheiro *et al.*, 2017). Se ha observado que el VPB se integra solo en caso de carcinogénesis como el inducido por VPB-4 (Sousa *et al.*, 1990).

Su cápside está compuesta en su mayoría por la proteína L1 y L2, la primera formando pentámeros unida la proteína L1 con otra proteína L1 a través del brazo invasor (Figura 4) (C-terminal) (Modis, Trus, & Harrison, 2002; Touzé *et al.*, 2000). La proteína L1 es conservada entre los diferentes genotipos del virus. La L1 es de importancia para el ciclo viral ya que permite la correcta unión estando especialmente implicada la región entre los residuos 402-446, especialmente los aminoácidos 420-429 que conectan el loop en la “corona” del pentámero como se observa en la Figura 4.

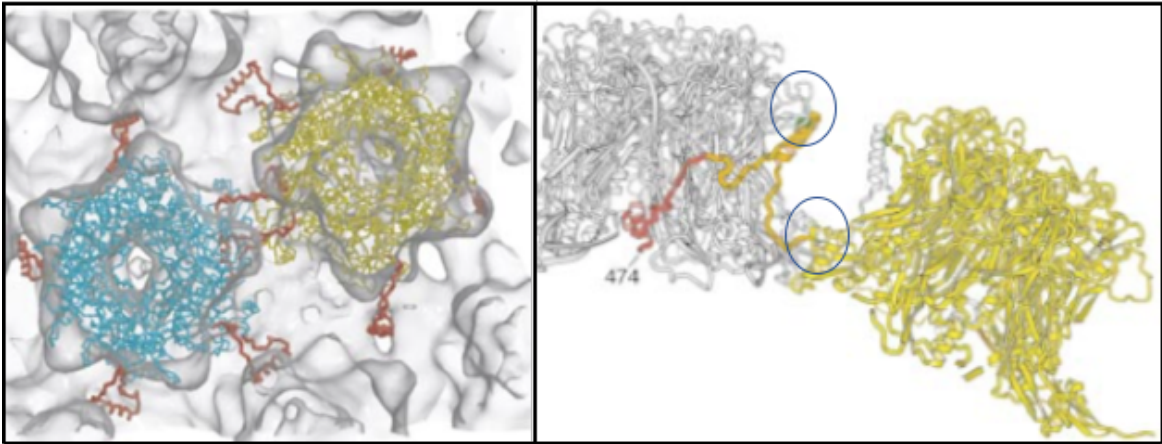


Figura 5. Modelo de la cápside del VPB. Conexión del brazo invasor de la proteína L1 con otra L1. Tomado de Mudis, Trus & Harrison, 2002.

En la Figura 5 se observan en el panel derecho 2 círculos azules que ilustran los puntos de conexión del brazo C-terminal de la L1 con horquillas estructurales de la misma proteína, dicha distancia es considerada suficiente para permitir el acceso a un anticuerpo o receptores de células B según Mudis y colaboradores.

La proteína L1 está implicada en la entrada, se ha sugerido como mecanismo de entrada a través de la α -integrina 6 (Región no reconocida de la L1), pero se sabe que la región C-terminal está implicada en la unión del ADN y su empacamiento, así como también está implicada en la entrada por glicoaminoglicano y por la unión a heparán sulfato (Touzé *et al.*, 2000).

El VPB promueve daños en el ADN que pueden originar cáncer, mediante la unión de la oncoproteína E6 al producto génico del gen supresor de tumor (p53), ya que cuando se forma el complejo E6-p53 es degradado provocando fallos en proliferación y apoptosis (Pinheiro Araldi *et al.*, 2017; León & Bosques, 2005). Se ha observado en cultivos primarios derivados de células de papiloma cutáneo, de esófago y vejiga urinaria infectadas con VPB presentan mutaciones cromosomales, similares a las presentadas por linfocitos infectado con VPB (Pinheiro Araldi *et al.*, 2017). Estas mutaciones coinciden en otros modelos, como el canino y el de equinos (Pinheiro *et al.*, 2017). En células sarcoides derivadas de fibroblastos

infectados con VPB-1 presentan pérdida del potencial de la membrana mitocondria (Pinheiro *et al.*, 2017).

Las principales oncoproteínas en la infección son la E6 y E7, pero también la E5 tiene un rol en la carcinogénesis. La proteína E5 perturba la actividad fisiológica de la V-ATPasa al inhibir el ensamblaje correcto de la V-ATPasa y el bombeo de H⁺, lo que induce una alcalinización persistente de las vesículas de Golgi y endosomas (Venuti *et al.*, 2011).

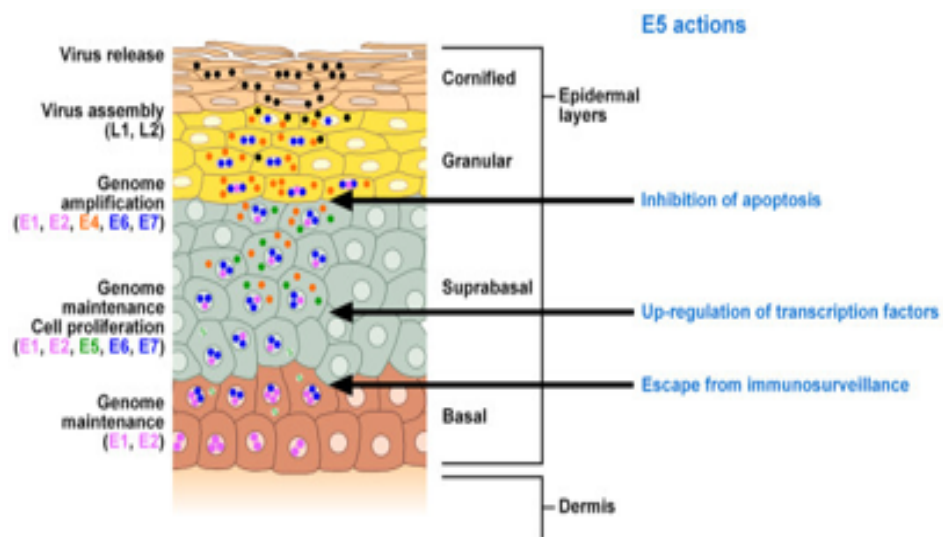


Figura 6. Expresión de proteínas virales de VPB-1 en capas de la dermis. Tomado de Venuti *et al.*, 2011. Existe expresión de proteínas virales específicas por capa de dermis.

2.4.- GENOTIPOS Y PREVALENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO

Hasta la fecha hay 24 genotipos reportados. Los causantes de la papilomatosis bovina se pueden agrupar en 3 géneros: (Figura 7)

- Deltapapillomavirus (VPB-1/2/13): Formación de papilomas principalmente en piel y genitales.
- Epsilonpapillomavirus (VPB-5/8): Formación de papilomas epiteliales.
- Xipapillomavirus (VPB-3/4/9/10/11/12): Formación de papilomas cutáneos. (Venuti *et al.*, 2011).

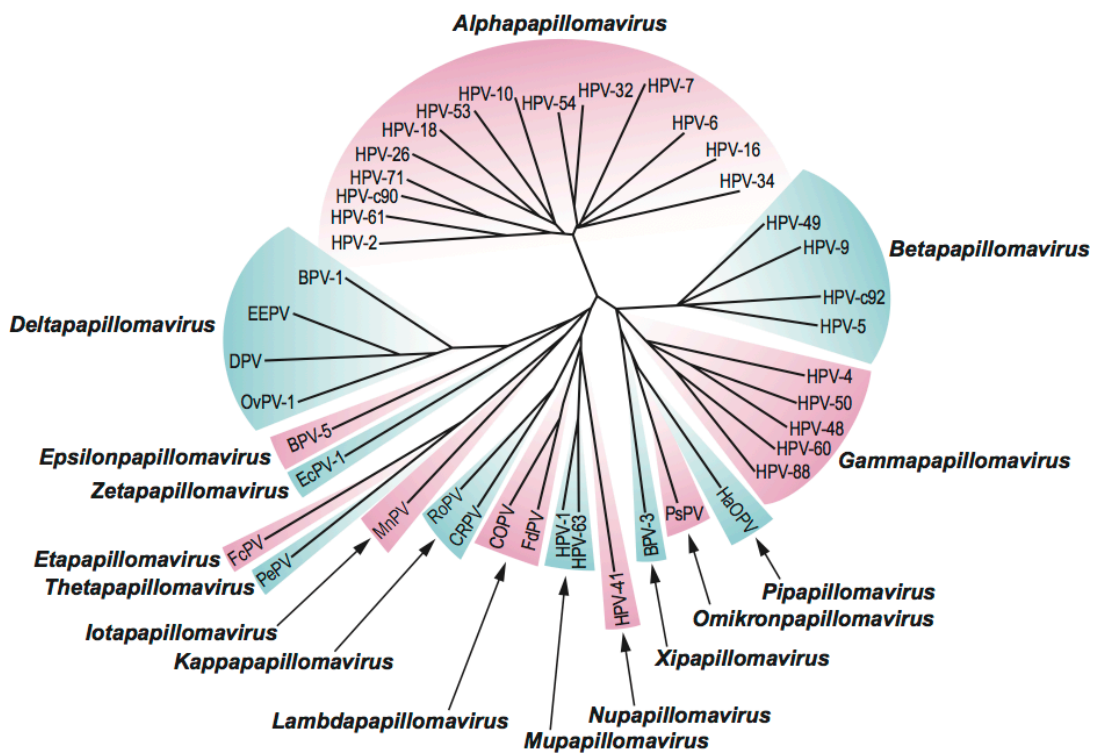


Figura 7: Árbol filogenético de genotipos reportados del VPB. Tomado de Venuti *et al.*, 2011.

Las verrugas presentan una morfología diversa, tienden a ser similar a una coliflor, con superficie rugosa, cubierta de costras y de colores variados. Se ha

reportado que en una misma área pueden ocurrir co-infecciones con la aparición de diferente tipo de verrugas cada una correspondiendo a un diferente genotipo como se puede observar en la Figura 8 (PaVE, n.d.). La morfología de las verrugas es específica del genotipo del virus, así que la inmunidad de una no necesariamente confiere inmunidad a otro genotipo (Mayilkumar *et al.*, 2014), aunque se ha reportado co-infecciones en una misma verruga (PaVE, n.d.).

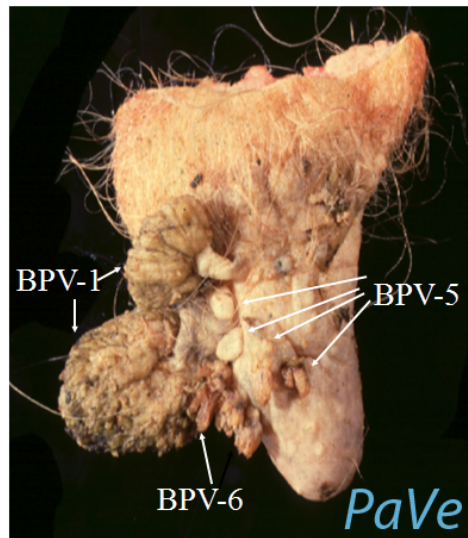


Figura 8. Fibropapilomas por VPB-1/5/6. Tomado de (PaVE, n.d.). A nivel mundial los genotipos de mayor prevalencia del VPB son el 1, 2 y 4. Los cuales son causantes de la aparición de verrugas y en el caso de VPB-4 está asociado a carcinoma de esófago (Pinheir *et al.*, 2017).

Hasta la fecha a nivel nacional son pocos los reportes oficiales de la prevalencia e incidencia de la enfermedad. Se ha reportado la presencia de la enfermedad a nivel rancho en los estados de Yucatán y Veracruz. Únicamente se ha reportado a nivel estado en Tamaulipas así como los únicos reportando la prevalencia de la enfermedad con los genotipos VPB-1 y VPB-2 (Touzé, & Coursaget, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2016).

En países de Sudamérica se ha reportado la prevalencia del virus, coincidiendo con los genotipos de mayor prevalencia a nivel mundial en los países de Nicaragua y Brasil, así como en Iraq (Mansour, Naser, & Hussain, 2019; Torres

et al., 2016). En el caso de los segundos, realizaron la genotipificación por PCR amplificando para diferente blanco según el genotipo, ya que comúnmente se amplifica la proteína L1 para identificar al VPB pero esta es altamente conservada entre los distintos genotipos. Para lo cual amplificaron para los blancos que se muestra en la tabla 2, emplearon diferente blanco por genotipo ya que no se puede emplear la proteína L1 para todos los genotipos ya que su secuencia es altamente conservada.

Tabla 2. Blancos para genotipificación de VPB (Pinheiro *et al.*, 2016)

Genotipo	Primers	Blanco
VPB-1	forward 5'- GAGCGCCTGCTAACTATAGGA-3' reverse 5'- ATCTGTTGTTTGGGTGGTGAC-3'	Gen L1
VPB-2	forward 5'- GTTATACCACCCAAAGAAGACCCT-3' reverse 5'- TGGTTGCAACAGCTCTCTTTCTC-3'	Gen L2
VPB-4	forward 5'- GCTGACCTTCCAGTCTTAAT-3' reverse 5'- CAGTTTCAATCTCCTCTTCA-3'	Gen E7

2.5.-EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE

El VPB se caracteriza por entrar a través de heridas, llega a las capas bajas de la dermis (Figura 9). El VPB entra a las células basales del epitelio y tiene mayor tasa de replicación en queratinocitos. Pasa indetectado por el sistema inmune ya que es un virus no citolítico, no causa viremia y se encuentra mayormente en área avascular coincidiendo con el virus de papiloma humano (Immunopaedia, n.d.; Orozco & Padilla, 2016).

A nivel molecular la proteína E6 y E7 interfieren con respuestas de IFN tipo 1, además de que la proteína E5 impide el ensamblaje del Antígeno Leucocitario de Bovino (BoLA), por lo cual se escapa al reconocimiento por células CD3⁺. Por otro lado, al ser en los queratinocitos las células donde mayor cantidad de virus hay, estas no liberan citocinas de efecto inflamatorio, por lo cual se induce poca activación de las células de Langerhan (Immunopaedia, n.d.; Orozco & Padilla, 2016).

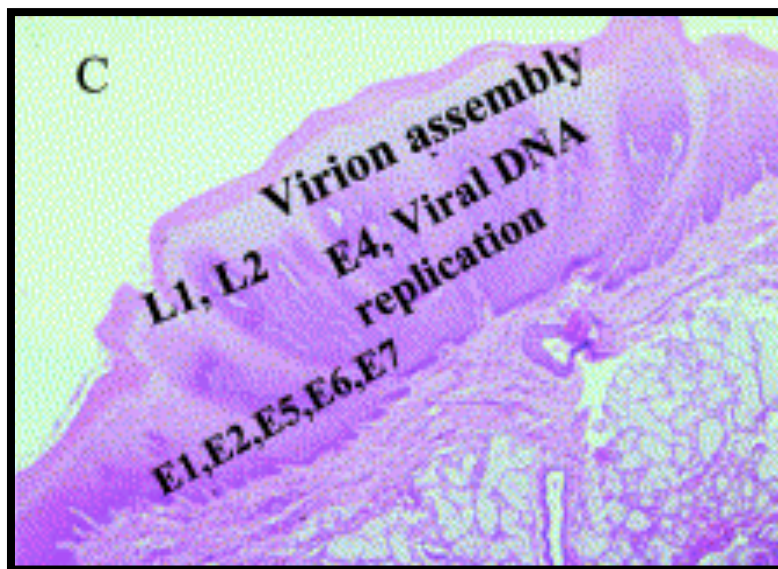


Figura 9. Tinción con Hematoxilina y Eosina ilustrando lugar de acción de las proteínas virales del VPB. Tomado de Saveria, 2002.

Por lo cual este virus tiene la capacidad de no solo infectar células derivadas de bovino, si no de otros animales (ilustrados en en la Figura 1) ya que se permite la entrada del virus a través de la interacción entre la proteína viral de cápside L1 con α -integrinas, heparán sulfato o con gliccoaminoglicanos (región C-terminal de la proteína L1) (Touzé et al., 2000). Además de la entrada, que sean permisivas las células es otro factor a considerar, especialmente aquellas pertenecientes o derivadas de epitelio diferenciado (hipergranulosos) (Pinheiro *et al.*, 2017).

2.6.- TRATAMIENTOS CONVENCIONALES PARA LA PAPILOMATOSIS BOVINA

Las terapias convencionales para tratar la infección generalmente no son específicas para el virus. Se pueden clasificar en remoción de verrugas, inmunoterapia y vacunas. En la primera clasificación entra la extracción quirúrgica de la verruga con una posterior aplicación de yodo o aluminio en spray para sanar la herida, también la aplicación de pomadas no específicas contra el virus, como Wartsoff (contiene ácido sialicílico con 2 aplicaciones por día) y Cobrex que tienen como propósito reducir y/o evitar la replicación del virus. Dentro de la inmunoterapia esta la autohemoterapia, consiste en la extracción de sangre del bovino y su posterior aplicación intramuscular con el motivo de promover la presentación de antígeno e inducir una respuesta inmune celular. Todas las terapias previamente mencionadas reportan regresión espontánea común (Bahnemann, 1975; Mayilkumar *et al.*, 2014; Barthold *et al.*, 1976; Pangty *et al.*, 2010; Van Dyk *et al.*, 2009). Existe la vacuna comercial inactivada “Fusogard Cattle Vaccine” de Elanco Animal Health. Consiste en la aplicación de dosis (la segunda a las 3-5 semanas) reportándose un 8.8% de eficacia; pero no se comercializa en México.

2.7.- VACUNAS INACTIVADAS PROFILÁCTICAS Y TERAPEUTICAS PARA LA PAPILOMATOSIS BOVINA

Actualmente se encuentra en investigación la elaboración de vacunas inactivadas de manera profiláctica y terapéutica que se abordaran a continuación. La replicación de VPB es dependiente de la diferenciación celular (Capas del epitelio hipergranuloso); por lo cual Bahnemann tomó muestra de piel y realizó la inactivación de diferentes virus con etilenimina binaria (BEI) (0.001 M) a 37 °C en suero. El BEI afecta los grupos sulfidril en las proteínas. Este procedimiento se aplicó a: 3 cepas de FMDV (picornavirus), 2 cepas de estomatitis vesicular (VSV, rabdovirus) y cepa de virus de rinotraqueitis (herpes) obteniendo buenos resultados (Bahnemann, 1975). Aunque también se han reportado otras concentraciones para la inactivación de varias cepas de virus con EI, a 5-10 mM a 37 °C por periodos de hasta 72 horas. Estos trabajos siendo *in vitro* tras obtener muestras de tejidos infectado por los diferentes virus mencionados.

Mayilkumar y colaboradores inmunizaron con una vacuna autógena inactivada en formalina semanal para un total de 3 dosis a una vaca lechera adulta. Las verrugas cutáneas tenían un tamaño de 2-3 cm de tamaño irregulares, planos y circulares con costras secas (Figura 9). Al tercer día del tratamiento se redujo el tamaño de los nódulos, reportaron que al día 7 las costras comenzaron a caerse y para la tercera semana de tratamiento los nódulos se habían desechado y dejaron pequeñas cicatrices en el área afectada (Mayilkumar *et al.*, 2014). Mencionan que la producción de leche no se vió afectada.



Figura 10. Papilomatosis en ubre. A. Nódulos de papilomatosis en la ubre y muslo interno. b. Ubre y muslo interno tras el tratamiento con vacuna inactiva por formalina. Tomado de Mayilkumar *et al.*, 2014.

La vacuna elaborada por Mayilkumar y colaboradores se realizó con formalina (0.5 mL de formalina al 10% por cada 100 mL de solución filtrada) más antibiótico (2 mg/mL de Estrepto-penicilina); la reacción fue detenida al agregar 10 veces el volumen de tiosulfato de sodio. La vacuna la administraron una vez por semana con una dosis de 1 mL/20 kg de peso vía subcutánea.

Cabe aclarar que la cirugía no es una opción, ya que cuando se presenta la papilomatosis se extiende a muchas áreas del cuerpo, lo cual lo dificulta. Mientras que los tratamientos con vacunas autógenas producidas por suspensión en formalina de tejido con verrugas muestran una eficacia del 93.5% (Turk *et al.*, 2005). Además de que las vacunas comerciales de verrugas muestran menor eficacia (Barthold *et al.*, 1976; Pangty *et al.*, 2010). Otros autores también han reportado que la vacuna autógena inactivada por verrugas causadas por VPB-1 y VPB-2 en caballos con sarcoma del Parque nacional Bontebok en Sudáfrica ha tenido éxito, mostraron mayor tasa de recuperación en comparación con los tratados con vacunas autólogas basadas únicamente en VPB-1 de la Reserva natural de Gariep Dam también de Sudáfrica (Van Dyk *et al.*, 2009).

Pangty y colaboradores elaboraron vacunas como terapia y profilácticas basadas en VPB-1 y VPB-2. Inactivaron un extracto de verruga con BEI (10:1) incubando a 37 °C por 36-48 horas. Al grupo con vacuna terapéutica se le administró de manera subcutánea 2 mL incrementando 1 mL por dosis subsecuente, hasta alcanzar una dosis final de 20 mL. En un segundo grupo inocularon con extracto

crudo de verruga. Obtuvieron como resultado la reducción del volumen en verrugas cutáneas como se observa en la Figura 11.

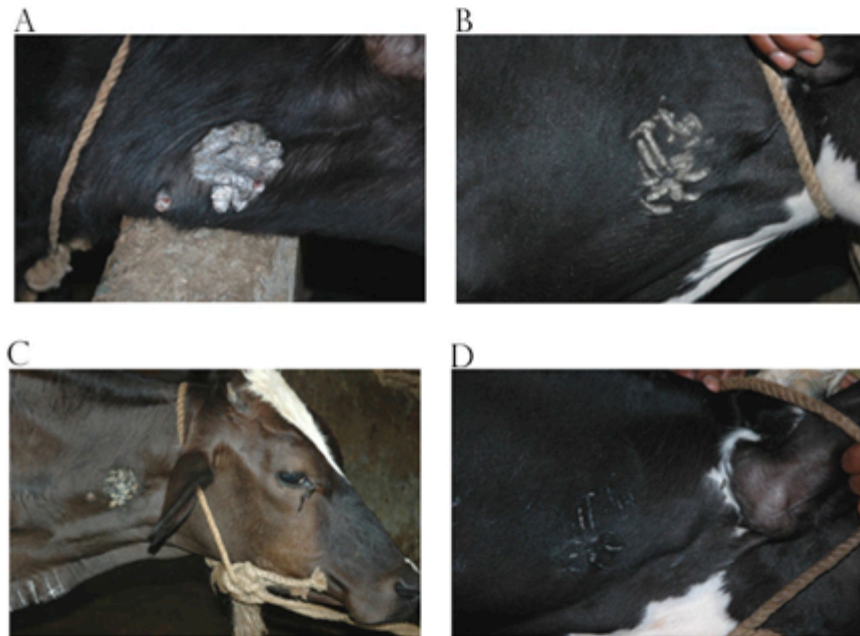


Figura 11. Reducción de volumen en verrugas cutáneas por VPB tratadas con vacuna autóloga. Tomado de Pangty *et al.*, 2010. Grupo de vacunación terapéutica con vacuna autóloga de VPB-1 y VPB-2. A) Crecimiento de color marrón claro, similar a la coliflor, inducido experimentalmente en la cría de toro. Antes de la vacunación terapéutica. B) Crecimiento de color pardo claro, lineal, de crecimiento lento, inducido experimentalmente en terneros. Antes de la vacunación terapéutica. C) Crecimiento similar a la coliflor de regresión lenta inducido experimentalmente en becerros. Vacunación post terapéutica. D) Crecimiento lineal de regresión rápida inducido experimentalmente en becerros. Vacunación post terapéutica (Pangty *et al.*, 2010).

En el estudio anterior obtuvieron como resultados regresión de las verrugas y su secado. Dejando al final del tratamiento pequeña cicatriz. Pangty y colaboradores reportan que las vacunas autógenas tienen mayor éxito e animales jóvenes, preferentemente a las 4-6 semanas de vida para tener éxito en cuanto vacunas profilácticas. Demostraron que hay una correlación entre mayor regresión de verrugas con una mayor infiltración de monocitos y linfocitos a las verrugas; y mientras más depósitos de colágeno menor infiltración de monocitos. También mostrándose una regresión mas rápida en fibromas que en fibropapilomas (Pangty

et al., 2010). Las verrugas pueden regresar, pero en un tiempo menor al que toma para desarrollar resistencia a la infección por VPB (Pangty *et al.*, 2010).

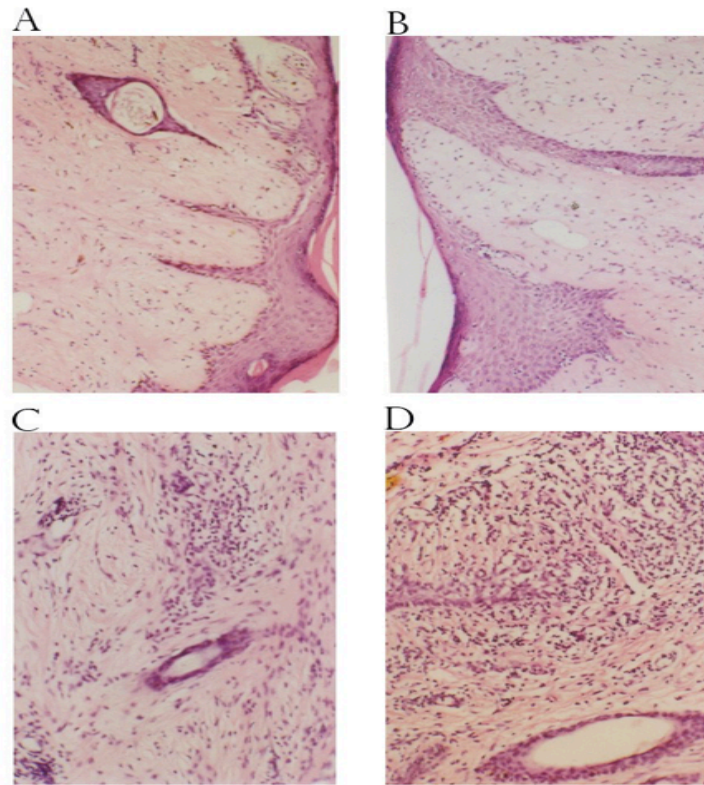


Figura 12. Cortes histológicos de verrugas cutáneas por VPB. Tomado de Pangty *et al.*, 200. A) Adelgazamiento de la epidermis, estacas rete alargadas y estroma tumoral transparente. Papiloma de tipo fibroblástico oculto / temprano (similar a la coliflor). H&E X100. B) Adelgazamiento / hiperplasia focal de la epidermis, retículas pegadas y estroma tumoral transparente. Papiloma tipo fibroblástico oculto / temprano (lineal). H&E X 100. C) Infiltración celular mononuclear leve. Papiloma de tipo fibroblástico oculto / temprano (similar a la coliflor). H&E X 150. D. Se pronuncia la infiltración celular mononuclear. Papiloma tipo fibroblástico oculto / temprano (lineal) (Pangty *et al.*, 2010).

Las vacunas comerciales proporcionan una protección parcial si se administran repetidamente antes de que tenga lugar la infección (Pinheiro *et al.*, 2016).

2.8.- VACUNAS DE PÉPTIDO SINTÉTICO O PARTÍCULAS TIPO VIRUS PARA LA PAPILOMATOSIS BOVINA

Actualmente existe la patente de un péptido sintético basado en la región N-terminal de la proteína viral de cápside L2 del VPB-4 empleada como vacuna profiláctica; induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Fleming & Jarrett, 2001). Se ha observado que al administrarse un solo péptido basado en un epítipo se pueden llegar a producir lesiones primarias que no progresan a papilomas y regresan de manera rápida, pero al vacunar con 3 péptidos diferentes de 3 epítipos provenientes de la región N-terminal de la L2 se forma un complejo de neutralización que promueve la prevención de la enfermedad en modelo bovino (Campo *et al.*, 1997). Campo y colaboradores se centran en la proteína L2 porque no requiere conformación nativa, es efectiva a bajas dosis e induce inmunidad de largo término.

Campo y colaboradores en 1997 emplearon 2 dosis (50 µg) separadas por un mes con péptido-KLH solo (péptido 11, 14 y 16 del VPB-4), los 2 péptidos o en combinación con 330 µg de GST-L2a (VPB-4) en alhydrogel como adyuvante en bovinos de 8-12 meses de edad. Verificaron la respuesta humoral de los péptidos con sueros de bovinos vacunados con L2a; todos los péptidos de manera individual reaccionaron con L2a confirmando la especificidad; obtuvieron títulos similares en terneros vacunados con péptidos individuales solo contra el péptido presente en la vacuna pero se obtuvo mayor título de anticuerpos en los terneros vacunados con los 3 péptidos. Lo anterior concuerda con que en los grupos vacunados con los 3 péptidos, L2a y el péptido 14 no se presentaron lesiones a las 10 semanas.

Sueros de conejos inmunizados con partículas desnaturalizadas de VPB-1 y terneros vacunados con proteína de fusión L1 recombinante no neutralizan al virus en cultivo de C127 ni en xenoinjertos de piel fetal bovina. Por otra parte los sueros provenientes de conejos y terneros inmunizados con viriones intactos o desnaturalizados de VPB-1 o VPB-2 si neutralizan la infección en los modelos previamente mencionados (Ghim, Christensen, Kreider, & Bennett Jenson, 1991).

Por lo cual el estudio indica que para promover la neutralización de VPB-1 en la línea celular C127 se requieren epítopes de capsíde conformacionales. También se ha identificado que la región de aminoácidos 300-400 no posee epítopes o hay una falta de respuesta de estos para promover la neutralización de la infección en C127. Esto no quiere decir que epítopes lineales no reconocimiento y neutralización del virus, ya que epítopes lineales provenientes de la L1 si muestran reactividad (Jenson *et al.*, 1991).

2.9.-VACUNA PROFILÁCTICA PARA EL PAPILOMA HUMANO

Existen vacunas comerciales compuestas por la proteína viral de cápside L1 recombinante abarcando solo algunos genotipos. Entre ellas está la vacuna Gardasil 9 que promueve protección contra 9 tipos de HPV (HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -45, -52 y -58) que son los que provocan el 90% de los cánceres cervicales (Li *et al.*, 2018). Se emplean dosis grandes (3 en total), como el caso de la vacuna Gardasil 9 que requiere 270 µg de proteína en una sola dosis. Pero Li y colaboradores identificaron que hay regiones específicas de la secuencia de L1 que se consideran antigénicas. Por lo cual proponen el diseño de diferentes vacunas abarcando defensa contra 3 genotipos, teniendo buenos resultados con las siguientes combinaciones: HPV16/35/31, HPV56/66/53, HPV39/68/70, HPV18/45/59. Empleando solo las regiones más antigénicas (Li *et al.*, 2018).

3.-JUSTIFICACIÓN

Debido a la presencia y fácil distribución de la papilomatosis en la población de bovinos de México surge la necesidad de desarrollar una vacuna a base de un péptido sintético derivado de la proteína viral de cápside L1 del Virus de Papiloma Bovino para la prevención de esta enfermedad, ya que en la actualidad en México no se comercializa una vacuna preventiva. Con el fin de evitar y/o controlar la aparición de la enfermedad que se encuentra dentro de las enfermedades que influyen en la aparición de otras o la muerte del animal afectando gravemente en la economía del sector ganadero, el cuál es de fuerte importancia para México, uno de los 11 países ganaderos del mundo. Se propone el diseño de una vacuna basada en un péptido sintético derivado de la proteína viral mayor de cápside L1 del VPB para su evaluación en modelo murino.

4.-HIPÓTESIS

La vacuna de péptido sintético derivado de la proteína viral mayor de cápside L1 del Virus de Papiloma Bovino induce una respuesta inmune humoral.

5.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad inmunogénica de un péptido sintético derivado de la proteína viral mayor de cápside L1 del Virus de Papiloma Bovino.

6.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar los genotipos del Virus de Papiloma Bovino circulantes en los estados de N.L., Veracruz, Chiapas y Tabasco.
2. Diseñar *in silico* un péptido derivados de la proteína viral de cápside L1 del Virus de Papiloma Bovino.
3. Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por el péptido sintético derivado de la proteína viral de cápside L1 del Virus de Papiloma Bovino en un modelo murino.

7.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

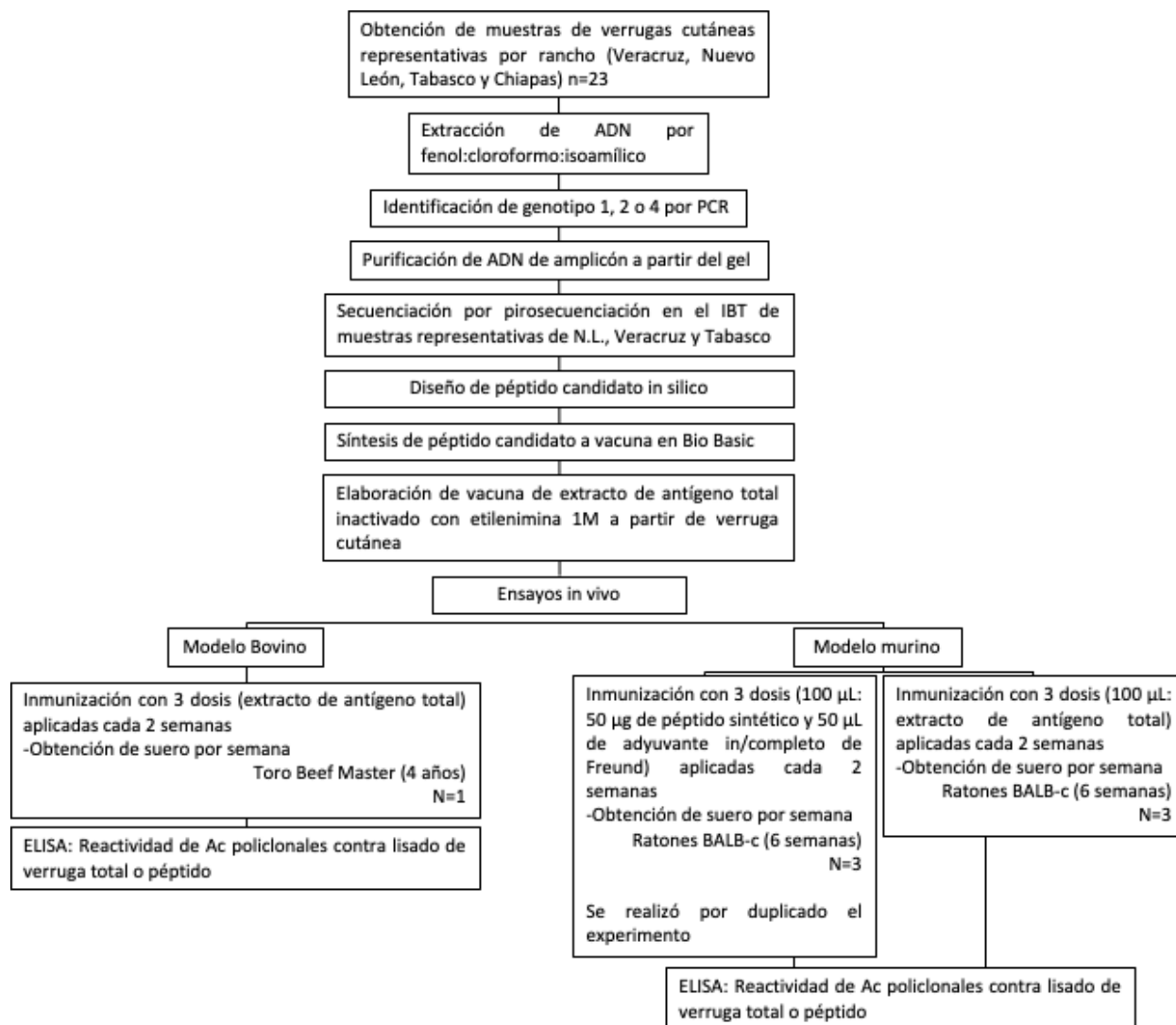


Figura 13. Estrategia Experimental General

8.- METODOLOGÍA

8.1.-EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

Se colocaron las muestras representativas de verruga total por rancho por 10 min. a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se trituraron por separado en placas petri y con el embolo de una jeringa de 10 mL en PBS 1X estéril. Se tomó solo la suspensión celular para colocarla en 1 mL de buffer de lisis (CTAB 2X) precalentado a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. en un tubo de 1.5 mL. Después de mezclar por inversión se incubaron los tubos a temperatura ambiente (T_a) por 5 min y luego en hielo también por 5 min. Posteriormente se agregaron $50\text{ }\mu\text{L}$ de RNAsa-A por tubo, se mezclaron por inversión e incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min (mezclando 2 o 3 veces). Pasado el periodo de incubación se agregaron $3\text{ }\mu\text{L}$ de proteinasa-K (en frío) y se mezclaron por inversión e incubaron a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. (mezclando 2 o 3 veces). Luego se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente se agregaron $600\text{ }\mu\text{L}$ de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) por tubo, se agitaron por inversion y centrifugaron a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 min. Se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se colocó en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 mL. Después se agregaron $50\text{ }\mu\text{L}$ de acetato de amonio 10 M (previamente calentado para disolver) y mezcló por inversión varias veces. Se agregaron $500\text{ }\mu\text{L}$ de isopropanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se mezclaron por inversión varias veces e incubaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche. Luego se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min y se eliminó el sobrenadante cuidando de no desprender el botón blanco. Después se agregó 1 mL de etanol al 70% ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por tubo y se mezcló por inversión hasta desprender el boton. Se dejaron reposar a T_a por 5 min. Se centrifugó a 10,000 rpm a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. y se eliminó el sobrenadante cuidando de no desprender el botón de ADN. Se colocaron los tubos en el termomixer a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ destapados para evaporar el etanol hasta que los tubos estuvieran secos. Se rehidrató el ADN con $50\text{ }\mu\text{L}$ de agua inyectable. Finalmente se calculó la cantidad de ADN en el nanodrop al leer absorbancia a 260/280. Se trabajo en la técnica del siguiente apartado únicamente cuando el ADN tuviera una pureza de 1.8-2.

8.2.-AMPLIFICACIÓN DE GENES VIRALES L1, L2 Y E7 DEL VPB POR PCR

Se realizó un mix de reacción por genotipo, en la siguiente tabla se muestran los primers empleados para identificar cada genotipo y su respectivo amplicon esperado. Se tomó como control negativo mix de reacción sin ADN. Una vez que se mandó a secuenciar 7 muestras provenientes del estado de Nuevo León (N.L.), estas se tomaron como control positivo.

Tabla 3. Blancos para genotificación de VPB por PCR y tamaño de amplicon (Pinheiro *et al.*, 2016)

Genotipo	Primers	Tamaño de amplicon	Blanco
VPB-1	forward 5'- GAGCGCCTGCTAACTATAGGA-3' reverse 5'- ATCTGTTGTTTGGGTGGTGAC-3'	300 pb	Gen L1
VPB-2	forward 5'- GTTATACCACCCAAAGAAGACCCT-3' reverse 5'- TGGTTGCAACAGCTCTCTTTCTC-3'	167 pb	Gen L2
VPB-4	forward 5'- GCTGACCTTCCAGTCTTAAT-3' reverse 5'- CAGTTTCAATCTCCTTTCA-3'	400 pb	Gen E7

Se realizó una volumen de reacción de 20 µL por muestra, que incluía 10 µL de Ruby master mix (Jena Bioscience, Löbstedter, Alemania), 0.8 µL de cada primer (10 mM Forward y Reverse), 6 µL de ADN y 2.4 µL de H₂O. Se tomaron las siguientes condiciones para el termociclador.

Tabla 4. Condiciones de corrimiento de reacción de PCR (Pinheiro *et al.*, 2016).

Etapas	Condición
Desnaturalización inicial	3 min. 94°C
Desnaturalización	35 ciclos de 50 seg. a 94°C
Alineamiento	1 min. a 60°C
Extensión	1 min. a 60°C
Extensión Final	5 min. a 72°C

Después se realizó un gel de electroforesis en agarosa 1.5% preparado en Buffer TAE 1X, el cual se colocó a un corrimiento constante a 70 Volts por 50 min. en Buffer TAE 1X, posteriormente se sometió el gel a tinción con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

8.3.-SECUENCIACIÓN DE DE GENES VIRALES L1 Y L2 DE VPB

Las muestras que amplificaron positivas para VPB-1 de los ranchos 1 al 7 provenientes del estado de N.L. y de los ranchos 8 y 13 provenientes de Veracruz y Tabasco respectivamente, estos últimos presentando co-infección con VPB-1 y VPB-2, se volvieron a amplificar por PCR para un volumen final de 40 µL. Después se realizó un gel de electroforesis en agarosa 1.5% preparado en Buffer TAE 1X, el cual se colocó a un corrimiento constante a 70 Volts por 50 min. en Buffer TAE 1X, posteriormente se sometió el gel a tinción con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Posteriormente se cortaron las bandas del gel de electroforesis y a partir de estas se purificó el ADN con el kit Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience Cat. # PP-202S, Löbstedter, Alemania)). Después se cuantificó la cantidad de ADN en el Nanodrop. Se realizó la secuenciación de los amplicones positivos para VPB-1 y VPB-2 en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, mediante el método de pirosecuenciación.

Una vez obtenidas las secuencias en formato .ab1 se analizaron las secuencias forward por BLASTn para la confirmación de su identidad como VPB-1 o VPB-2 .

8.4.-REALIZACIÓN DE ÁRBOL FILOGENÉTICO

Se alinearon las secuencias forward con reverse (a estas últimas se les realizó la función de reverso complementario) y se alinearon con el algoritmo Clustal W en MEGA X. posteriormente se alinearon con secuencias reportadas por otros países en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el mismo algoritmo. Se cortaron las regiones de las secuencias en los extremos que no se encontraran alineados al igual que gaps internos para después realizar el árbol filogenético de likelihood máxima con el algoritmo de Bootstrap con 1000 repeticiones. Se tomaron las secuencias de las siguientes secuencias para el árbol filogenético de VPB-1.- Japón: AB626705.1 y LC426023.1, Egipto: MH543316.1, Suiza MF384294.1, Turquía: MH197482.1 y HPV-16: S71514.1. Para el árbol filogenético del VPB-2 se tomaron las siguientes secuencias.- Brasil: MH187961.1 y KU674833.1, China: KM455051.1 y MF045490.1, E.U.A.- X01768.1 e Inglaterra HPV-45: KU049750.1.

8.5.-PREDICCIÓN DEL PÉPTIDO CANDIDATO A VACUNA *IN SILICO*

Para la predicción de epítopes para células B se emplearon las secuencias aminoacídicas de la proteína viral de cápside L1 de VPB-1, VPB-2 y VPB-4 reportadas en PaVE (<https://pave.niaid.nih.gov/>), exclusiva de virus de papiloma de animales y se analizaron en el servidor en línea BepiPred 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). Una vez obtenida la región predicha

como epítope por genotipo, se analizaron para epítopes de MHC II en el servidor en línea MHC II predictor (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html) con los alelos murinos: H-D-I y bovinos: BoLA-AW10, BoLA-D18.4, BoLA-JSP.1 y BoLA-n:00101; y se tomó el epítope predicho como “good binder” por genotipo. Finalmente se mandó a sintetizar en la compañía BioBasic el péptido candidato derivado de la proteína L1. Para evaluar la antigenicidad de los aminoácidos en el péptido candidato se evaluó en el programa en línea Bepipred Linear Epitope Predictor (IEDB Analysis Resource), y para propiedades físicas y químicas en los programas Compute pI/Mw tool de Expasy y ProtParam también de Expasy.

8.6.-EXTRACTO DE ANTÍGENO TOTAL INACTIVADO CON ETILENIMINA BINARIA 2M

Se tomaron 10 gr. de muestra de verruga completa cutánea y se congeló a -80 °C por 10 min. y se trituró en una placa petri con el embolo de una jeringa (10 mL) en PBS. Se tomó la suspensión celular y se colocó en etilenimina binaria 2M por 37 °C por 24 horas y se detuvo la reacción con tiosulfato de sodio a una concentración final de 2M (Pangty *et al.*, 2010).

8.7.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE ENSAYOS *IN VIVO*.

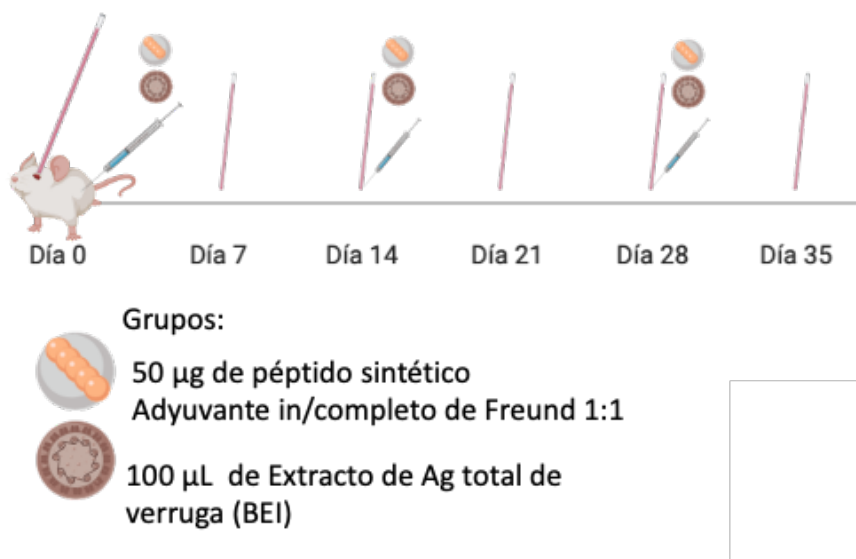


Figura 14. Inmunización con péptido sintético o extracto de Ag total en BALB-c, N=3 por grupo.

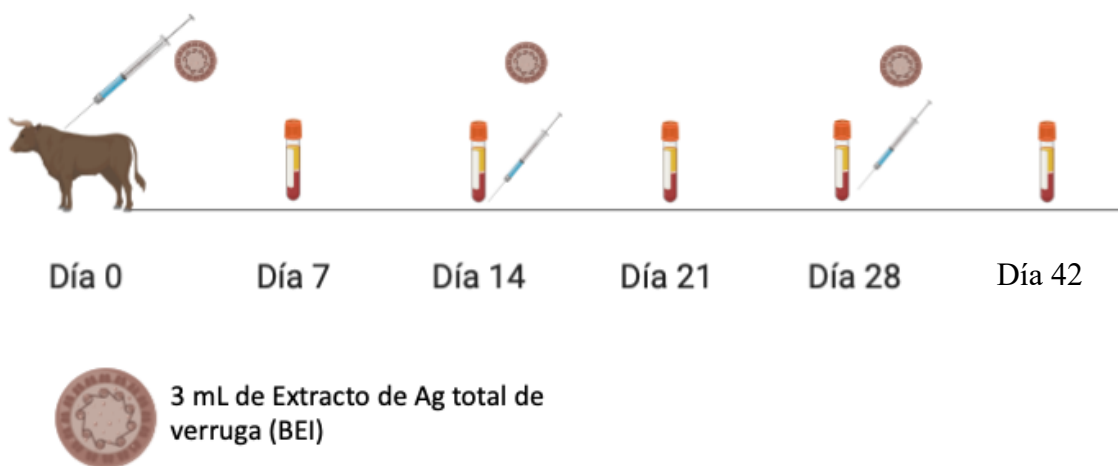


Figura 15. Inmunización con extracto de Ag total en toro Beef Master de 4 años de edad.

8.8.-INMUNIZACIÓN EN MODELO MURINO CON PÉPTIDO CANDIDATO CONTRA VPB-1 Y OBTENCIÓN DE SUERO

Ratones BALB-c (6 semanas de edad) fueron inmunizados con 50 µg de péptido sintético diluido con agua inyectable a 50 µL y 50 µL de Adyuvante completo de Freund en la primera dosis y el adyuvante incompleto de Freund en las siguientes dosis para un total de 3 dosis aplicadas cada 2 semanas vía subcutánea (n=3) (Aguilar *et al.*, 2013). El grupo control positivo se inmunizó con 100 µL de extracto de antígeno total inactivado con BEI 2M cada 2 semanas con un total de 3 dosis vía subcutánea (n=3). Se realizaron sangrados retro-orbitales por semana después de la primera dosis y el día 0 (el día que se aplicó la primera dosis antes de inyectar) (hasta 1 semana después de la última dosis) con capilar y se centrifugo la sangre a 1600 rpm por 30 min para separar el suero. Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

8.9.-ENSAYO DE ELISA: SUERO ANTI-VERRUGA CONTRA LISADO DE VERRUGA TOTAL O PÉPTIDO.

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con lisado de verruga total, ambos diluidos en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1:1) o péptido sintético (5 µg/pozo), las cuales se incubaron 4 °C toda la noche. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo), después se bloquearon las placas con leche descremada 5% en PBS-Tween 0.1% y se incubaron a 37 °C por 1.5 horas (200 µL por pozo). Después de 4 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo). Una vez diluidos los sueros de los días 0, 7, 14 y 35 de la inmunización con extracto de Ag total inactivado con BEI 2M a dilución 1:100-1:1600 se agregaron a la placa e incubaron a 37 °C por 1 h. Después de 4 lavados se agregaron 75 µl/pozo de Ac-conjugado con HRP anti-ratón a dilución 1:3000 y se incubaron a 37 °C por 40 min. Posterior a 4 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo) se agregaron 50 µL/pozo de sustrato TMB e incubaron a 37 °C por 20 min. Después se agregaron 50 µl/pozo de SDS 1% para detener la reacción y se leyeron las placas a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas. El criterio para determinar el

título de anticuerpos contra el lisado de verruga total o péptido fue la dilución del suero en la cual la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo (Contreras *et al.*, 2011).

8.10.-ENSAYO DE ELISA: SUERO ANTI-PÉPTIDO CONTRA LISADO DE VERRUGA TOTAL O PÉPTIDO.

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con lisado de verruga total, ambos diluidos en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1:1) o péptido sintético (5 µg/pozo), las cuales se incubaron a 4 °C toda la noche. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo), después se bloquearon las placas con leche descremada 5% en PBS-Tween 0.1% y se incubaron a 37 °C por 1.5 horas (200 µL por pozo). Después de 4 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo). Una vez diluidos los sueros de los días 0, 7, 14 y 35 de la inmunización con péptido sintético a dilución 1:100-1:1600 se agregaron a la placa e incubaron a 37 °C por 1 h. Después de 4 lavados se agregaron 75 µl/pozo de Ac-conjugado con HRP anti-ratón a dilución 1:3000 y se incubaron a 37 °C por 40 min. Posterior a 4 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo) se agregaron 50 µL/pozo de sustrato TMB e incubaron a 37 °C por 20 min. Después se agregaron 50 µl/pozo de SDS 1% para detener la reacción y se leyeron las placas a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas. El criterio para determinar el título de anticuerpos contra el lisado de verruga total o péptido fue la dilución del suero en la cual la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo (Contreras *et al.*, 2011).

8.11.-ENSAYO DE ELISA: SUERO ANTI-VERRUGA PROVENIENTE DE TORO CONTRA LISADO DE VERRUGA TOTAL O PÉPTIDO.

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con lisado de verruga total, ambos diluidos en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1:1) o péptido sintético (5 µg/pozo), las cuales se incubaron a 4 °C toda la noche. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo), después se bloquearon las placas con leche descremada 5% en PBS-Tween 0.1% y se incubaron a 37 °C por 1.5 horas (200 µL por pozo). Después de 4 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo). Una vez diluidos los sueros de los días 0, 7, 14 y 35 de la inmunización con péptido sintético a dilución 1:100-1:1600 se agregaron a la placa e incubaron a 37 °C por 1 h. Después de 4 lavados se agregaron 75 µl/pozo de Ac-conjugado con HRP anti-bovino a dilución 1:3000 y se incubaron a 37 °C por 40 min. Posterior a 4 lavados con PBS-Tween 20 0.1% (200 µL/pozo) se agregaron 50 µL/pozo de sustrato TMB e incubaron a 37 °C por 20 min. Después se agregaron 50 µl/pozo de SDS 1% para detener la reacción y se leyeron las placas a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas. El criterio para determinar el título de anticuerpos contra el lisado de verruga total o péptido fue la dilución del suero en la cual la absorbancia sea 2 veces mayor al promedio de la absorbancia del control negativo (Contreras *et al.*, 2011).

9.-RESULTADOS

9.1.-PREVALENCIA DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO EN LOS ESTADOS DE NUEVO LEÓN, VERACRUZ, CHIAPAS Y TABASCO.

Para realizar la reacción de PCR se emplearon únicamente las muestras de ADN que mostraron buena calidad de pureza ($A_{260}/A_{280} = 1.98-2.0$) tras la extracción mediante Fenol:cloroformo:isoamílico. Se trabajo con verrugas cutáneas y genitales con una n de 23 provenientes de los 4 estados mencionados. Se trabajo solo con las muestras de ADN con la pureza mencionada con el fin de una vez obtenido el producto de PCR correspondiente de los ranchos 1-7 que amplificaron para VPB-1 (Figura 16) purificarlo y secuenciarse por pirosecuenciación (Figura 17) y se validaron como VPB-1 tras el análisis en BLAST nucleotide (NCBI). En la Figura 16 se observan amplicones de 300 pb pertenecientes a la proteína viral de cápside L1, una región exclusiva del VPB-1.

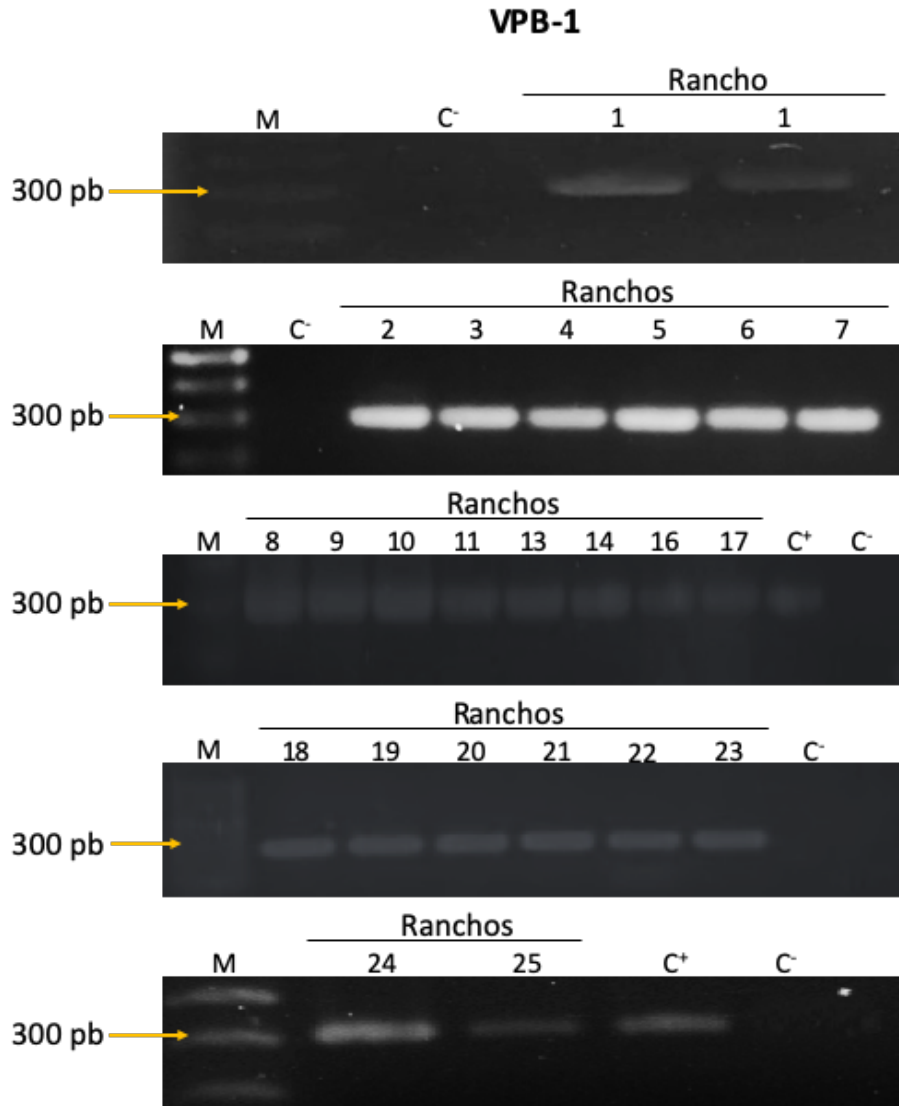


Figura 16. Presencia de VPB-1 en ranchos 1-11, 13-14 y 16-25. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de la expresión de VPB-1. Se realizó extracción de ADN (fenol:cloroformo:isoamílico) y se identificó genotipo por PCR punto final. **M.** Marcador de peso molecular de Jena Bioscience 100 Kb. **C⁺.** VPB-1 de N.L. **C⁻.** Mix de reacción sin ADN.

<p>Bovine papillomavirus type 1 strain BRA/UEL-SARCI/11 L1 gene, partial cds Sequence ID: KC595244.2 Length: 429 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 3 to 267 GenBank Graphics ▼ Next Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>472 bits(255)</td> <td>7e-129</td> <td>262/265(99%)</td> <td>2/265(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 7 CAGTGTCTATCGGGG--AAAACCTGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Sbjct 3 CAGTGTCTATCGGGGCAAAAATGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Query 65 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Sbjct 63 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Query 126 GTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Sbjct 123 GTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Query 185 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Sbjct 183 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Query 245 GAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 269 Sbjct 243 GAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 267</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	472 bits(255)	7e-129	262/265(99%)	2/265(0%)	Plus/Plus	<p>Bovine papillomavirus type 1 strain BRA/UEL-SARCI/11 L1 gene, partial cds Sequence ID: KC595244.2 Length: 429 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 3 to 268 GenBank Graphics ▼ Next Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>479 bits(259)</td> <td>3e-131</td> <td>264/266(99%)</td> <td>2/266(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 6 CAGTGTCTATCGGGG--AAAACCTGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Sbjct 3 CAGTGTCTATCGGGGCAAAAATGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Query 64 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Sbjct 63 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Query 124 GTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Sbjct 123 GTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Query 184 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Sbjct 183 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Query 244 GAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 269 Sbjct 243 GAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 268</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	479 bits(259)	3e-131	264/266(99%)	2/266(0%)	Plus/Plus
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
472 bits(255)	7e-129	262/265(99%)	2/265(0%)	Plus/Plus																	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
479 bits(259)	3e-131	264/266(99%)	2/266(0%)	Plus/Plus																	
<p>Bovine papillomavirus type 1 strain BRA/UEL-SARCI/11 L1 gene, partial cds Sequence ID: KC595244.2 Length: 429 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 27 to 268 GenBank Graphics ▼ Next Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>436 bits(236)</td> <td>4e-118</td> <td>240/242(99%)</td> <td>0/242(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 33 TTCTATGTTCTCTGACACAGTATAGGGTATTTAAATACAACTACTGATCCCAAT Sbjct 27 TTCTATGTTCTCTGACACAGTATAGGGTATTTAAATACAACTACTGATCCCAAT Query 93 AAATACAACTACTGACAGGACTGTTCCAAACCCAAATGAGAGGGCTGGTGTGGGCA Sbjct 87 AAATACAACTACTGACAGGACTGTTCCAAACCCAAATGAGAGGGCTGGTGTGGGCA Query 153 TCAATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTTGGGGGTACTGTAACTGGGCAACCC Sbjct 147 TCAATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTTGGGGGTACTGTAACTGGGCAACCC Query 213 CTTTTAAAGCTTCTGTGATCCGAAAATGTGAAATGAAAAGTCACCAACCAACCA Sbjct 207 CTTTTAAAGCTTCTGTGATCCGAAAATGTGAAATGAAAAGTCACCAACCAACCA Query 273 AT 274 Sbjct 267 AT 268</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	436 bits(236)	4e-118	240/242(99%)	0/242(0%)	Plus/Plus	<p>Bovine papillomavirus type 1 strain BRA/UEL-SARCI/11 L1 gene, partial cds Sequence ID: KC595244.2 Length: 429 Number of Matches: 2</p> <p>Range 1: 8 to 268 GenBank Graphics ▼ Next Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>464 bits(251)</td> <td>2e-126</td> <td>258/261(99%)</td> <td>2/261(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 15 TCTATCGGGG--AAAACCTGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTTAAAT Sbjct 8 TCTATCGGGGCAAAAATGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTTAAAT Query 73 CAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCAAACCCAAATAA Sbjct 68 CAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCAAACCCAAATAA Query 133 GAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTTGGGG Sbjct 128 GAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTTGGGG Query 193 ACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAATGAAA Sbjct 188 ACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAATGAAA Query 253 GTCACCCACCAACACAGAT 273 Sbjct 248 GTCACCCACCAACACAGAT 268</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	464 bits(251)	2e-126	258/261(99%)	2/261(0%)	Plus/Plus
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
436 bits(236)	4e-118	240/242(99%)	0/242(0%)	Plus/Plus																	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
464 bits(251)	2e-126	258/261(99%)	2/261(0%)	Plus/Plus																	
<p>Bovine papillomavirus type 1 strain BRA/UEL-SARCI/11 L1 gene, partial cds Sequence ID: KC595244.2 Length: 429 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 3 to 268 GenBank Graphics ▼ Next Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>473 bits(256)</td> <td>2e-129</td> <td>264/267(99%)</td> <td>3/267(1%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 7 CAGTGTCTATCGGGG--AAAACCTGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Sbjct 3 CAG--TGTCTATCGGGGCAAAAATGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Query 65 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Sbjct 62 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Query 135 AGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Sbjct 122 AGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Query 185 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Sbjct 182 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Query 245 AGAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 271 Sbjct 242 AGAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 268</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	473 bits(256)	2e-129	264/267(99%)	3/267(1%)	Plus/Plus	<p>Bovine papillomavirus type 1 strain BRA/UEL-SARCI/11 L1 gene, partial cds Sequence ID: KC595244.2 Length: 429 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 3 to 268 GenBank Graphics ▼ Next Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>468 bits(253)</td> <td>6e-128</td> <td>263/267(99%)</td> <td>4/267(1%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 8 CAGATGTCTATCGGGG--AAAACCTGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Sbjct 3 CAG--TGTCTATCGGGGCAAAAATGTTCTTAGGCTCTCCGAAATCAGTATAGGGTATTT Query 64 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Sbjct 62 AAATACAACTACTGATCCAAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Query 126 AGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Sbjct 122 AGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Query 186 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Sbjct 182 GGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Query 246 AGAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 271 Sbjct 242 AGAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 268</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	468 bits(253)	6e-128	263/267(99%)	4/267(1%)	Plus/Plus
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
473 bits(256)	2e-129	264/267(99%)	3/267(1%)	Plus/Plus																	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
468 bits(253)	6e-128	263/267(99%)	4/267(1%)	Plus/Plus																	
<p>Bovine papillomavirus type 1 isolate IPV 08 major capsid protein (L1) gene, partial cds Sequence ID: KJ224652.1 Length: 333 Number of Matches: 1 See 4 more titles ▼</p> <p>Range 1: 11 to 219 GenBank Graphics ▼ Next Match + Previous</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>281 bits(206)</td> <td>2e-101</td> <td>208/209(99%)</td> <td>0/209(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 68 TTAATAATGACTACTGATCCCAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Sbjct 11 TTAATAATGACTACTGATCCCAATCAATTTGCACCTGACAGGACTGTTCCACAAACCC Query 128 CAAATTAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Sbjct 71 CAAATTAAGAGCGGCTGGTGTGGGCACTATAGGTGTCCAGGTGTCCAGAGGGCGGCTCTT Query 188 TGGGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Sbjct 131 TGGGGGTACTGTAACTGGGCAACCCCACTTTAAAGCTTCTGTGAGCAGAAAATGTGAAAT Query 248 ATGAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 274 Sbjct 191 ATGAAAAGTCACCCACCAACACAGAT 239</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	281 bits(206)	2e-101	208/209(99%)	0/209(0%)	Plus/Plus											
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand																	
281 bits(206)	2e-101	208/209(99%)	0/209(0%)	Plus/Plus																	

Figura 17. Análisis de identidad de las secuencias de nucleótidos obtenidas de la secuenciación de fragmentos de L1 de ranchos 1-7 positivos para VPB-1 con 99% de homología, pertenecientes a Nuevo León. Las secuencias fueron analizadas en BLASTn en la secuencia forward.

De igual manera para la reacción de PCR, se emplearon únicamente muestras de ADN que mostraron buena calidad de pureza ($A\ 260/280 = 1.98-2.0$). En la Figura 18 se ilustra el fragmento de 167 pb correspondiente a la proteína viral de cápside L2, una secuencia exclusiva a VPB-2.

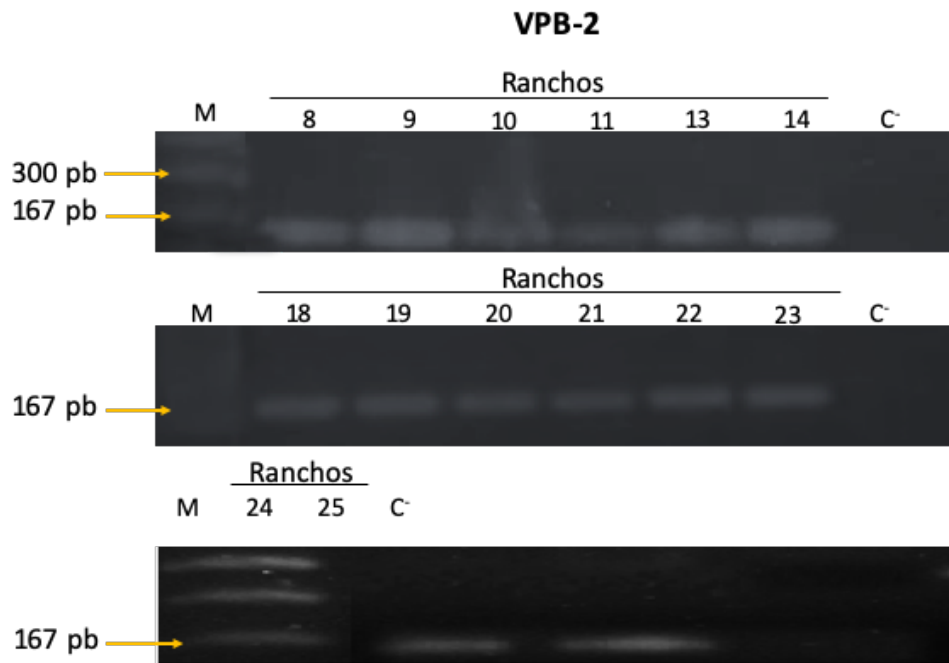


Figura 18. Presencia de VPB-2 en ranchos 8-11, 13-14 y 18-25. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de la expresión de VPB-2. Se realizó extracción de ADN (fenol:cloroformo:isoamílico) y se identificó genotipo por PCR punto final. **M.** Marcador de peso molecular de Jena Bioscience 100 Kb. Presencia de VPB-2 en Ranchos 8-11, 13-14 y 18-25. **C.** Mix de reacción sin ADN.

Una vez obtenidos los amplicones de PCR, se purificaron los productos de 2 muestras con co-infección de los ranchos 8 y 13 (pertenecientes a los estados de Veracruz y Tabasco) ilustrados en la Figura 19, se secuenciaron por pirosecuenciación (Figura 20) tanto el fragmento correspondiente a L1 como el de L2.

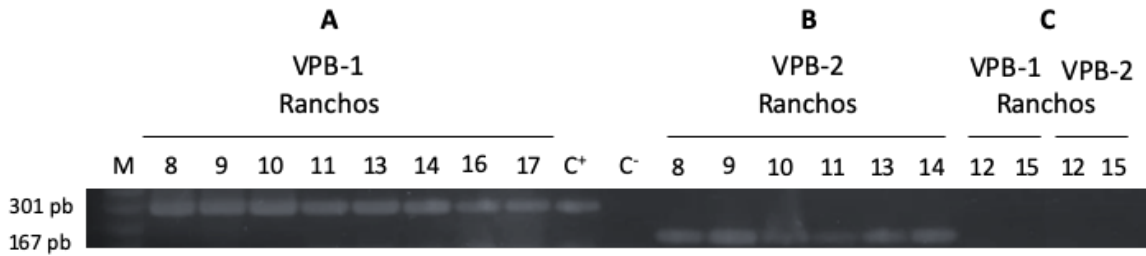


Figura 19. Co-infección con VPB-1 y VPB-2 en ranchos 8-11 y 13-14 analizado mediante gel de electroforesis. Gel de electroforesis de agarosa (1.5%). A. VPB-1 en ranchos 8-11, 13-14 y 16-17. B. VPB-2 en ranchos 8-11 y 13-14. C. Ranchos 12 y 15 no amplificaron para VPB-1, VPB-2 ni VPB-4.

Una vez obtenidas las secuencias provenientes de los productos de PCR de fragmentos de L1 y L2 e identificadas como VPB-1 y VPB-2 respectivamente se validaron como controles positivos de dichos genotipos, tras el análisis en BLAST nucleotide (NCBI). Se determinó un porcentaje de identidad de 99% de homología para L1 de VPB-1 y 91-97% de homología para la L2 de VPB-2 (Figura 21). Además se repitió la reacción de PCR con dichos controles para su validación (Figura 21).

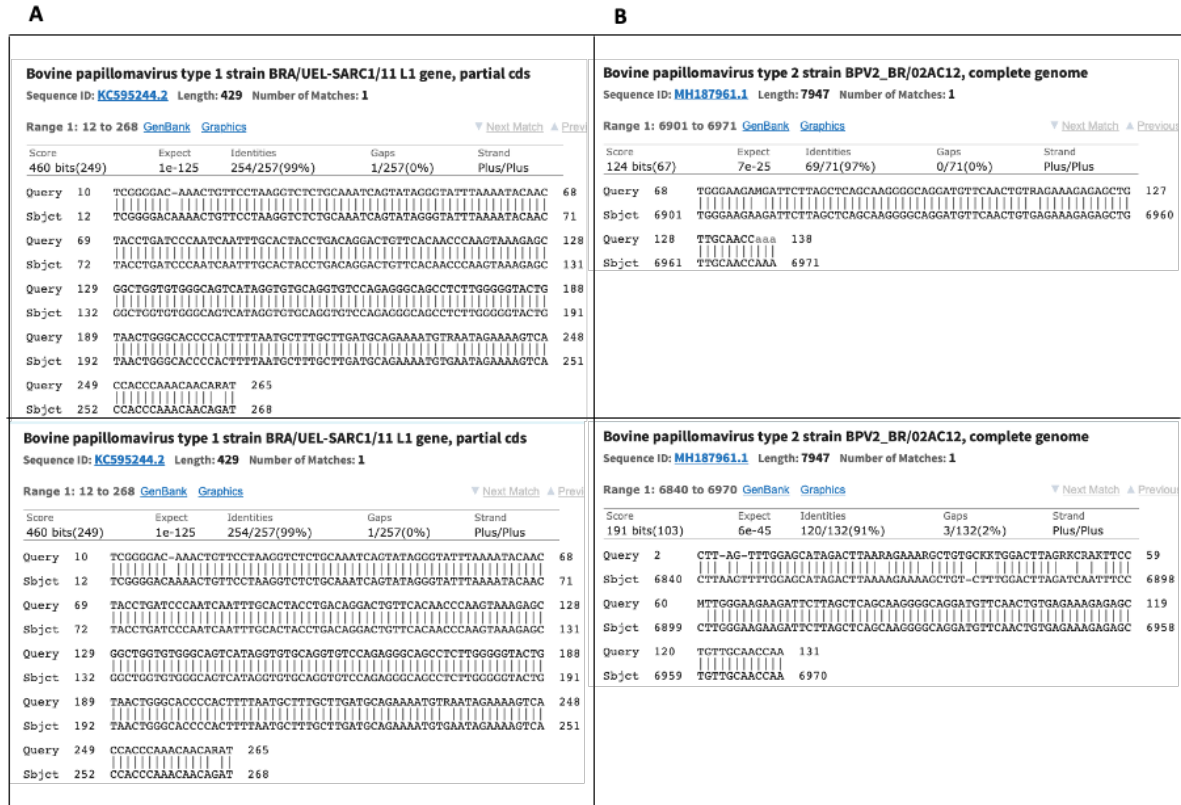


Figura 20. Análisis de identidad de las secuencias de nucleótidos obtenidas de la secuenciación de fragmentos de L1 de VPB-1 y L2 de VPB-2 pertenecientes a Tabasco y Veracruz. Las secuencias fueron analizadas en BLASTn en la secuencia forward. **A.** Secuencias de Tabasco y Veracruz respectivamente correspondientes a VPB-1 con 99% de homología **B.** Secuencias de Tabasco y Veracruz respectivamente correspondientes a VPB-2 con 91-97% de homología.

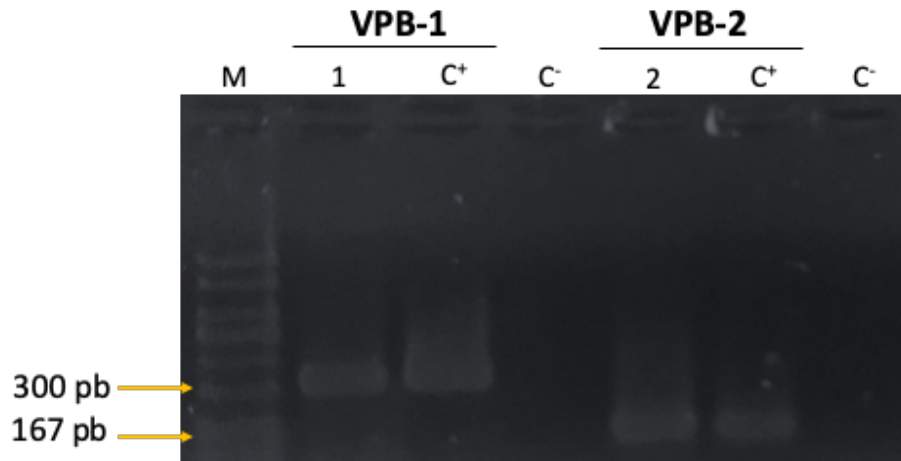


Figura 21. Validación de controles de PCR para VPB-1 y VPB-2. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de validación **1.** VPB-1. **2.** VPB-2. **C⁺**. Secuencia perteneciente a N.L. (VPB-1) o Veracruz (VPB-2) **C⁻**. Mix de reacción sin ADN.

El genotipo con mayor prevalencia es el VPB-1 en las muestras analizadas, y no se observaron muestras positivas para VPB-4. Se observaron un total de 8 muestras positivas para VPB-2 pero únicamente encontradas en co-infección con VPB-1 (un total de 14 muestras), pero si encontrando muestras positivas para VPB-1 exclusivamente (un total de 9 muestras). Todas las muestras de Veracruz mostraron tener co-infección con los genotipos previamente mencionados.

Tabla 5: Distribución de genotipos de VPB por estado

Estado:	VPB-1	VPB-2	Co-infección VPB-1 y 2	No identificado	n
Nuevo León	77.77%		22.2%		9
Veracruz			100%		10
Tabasco			66.66%	33.33%	3
Chiapas	66.66%			33.33%	3
					N=25

Una vez confirmada la identidad de las muestras secuenciadas, se procedió a realizar un árbol filogenético (Figuras 22 y 23) para el genotipo VPB-1 y otro para genotipo VPB-2. En el árbol filogenético de VPB-1 (Figura 22) se ilustran muestras de N.L., Veracruz y Tabasco además de internacionales (números de acceso en

metodología). Las muestras de N.L. (2, 4, 6 y 7) se localizan en un clado distinto al de secuencias de otras nacionalidades, mientras que otros 2 clados se encuentran secuencias de N.L. (5), Veracruz y Tabasco y en otro clado otras 2 secuencias de N.L. (1 y 3); con 0.2 de escala. Todos los clados se encuentran a una distancia cercana uno de otro.

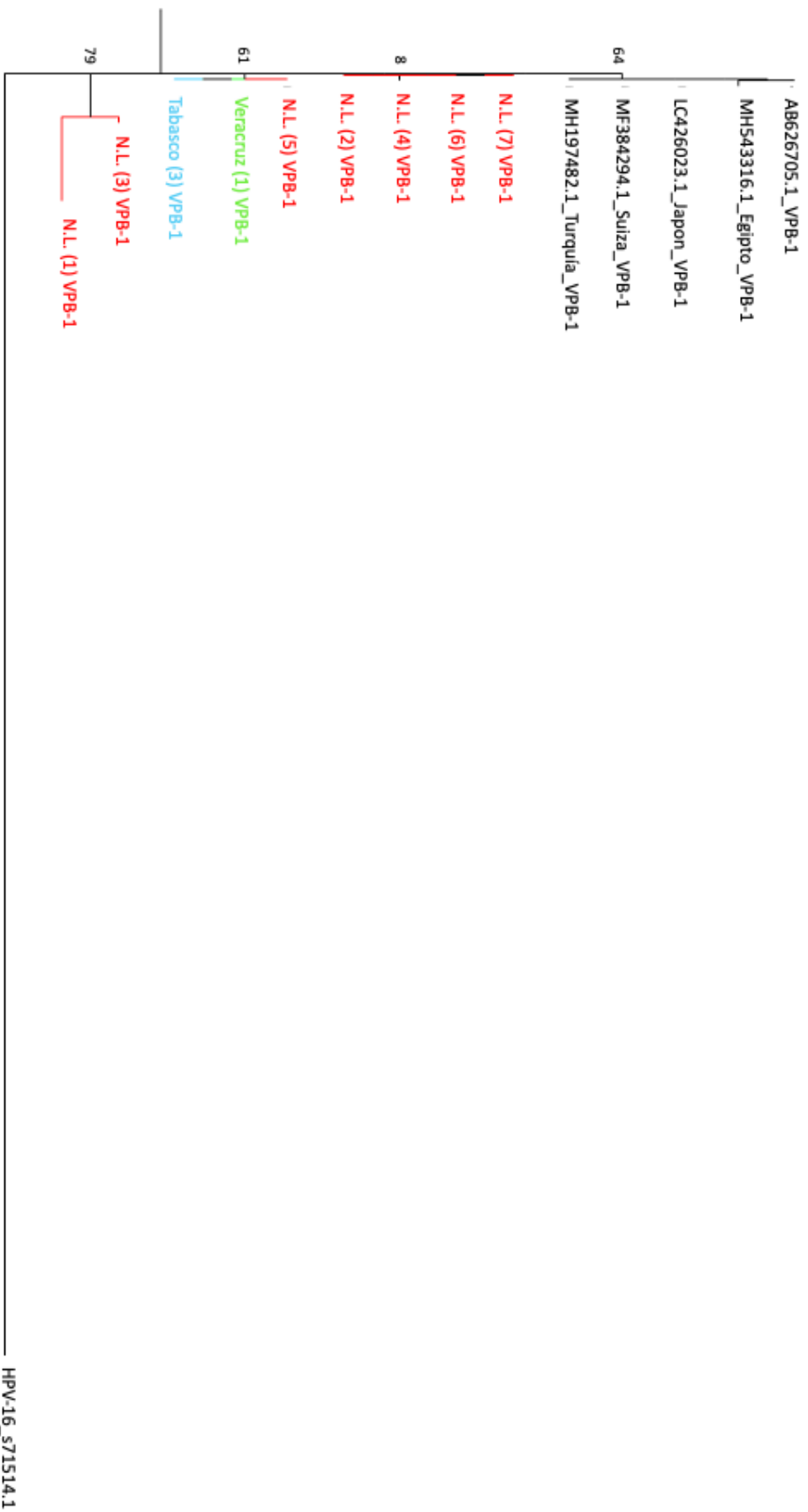


Figura 22: Árbol filogenético de L1 de VPB-1 de ranchos ubicados en Nuevo León (ranchos 1 a 7). Se purificaron las bandas a partir del gel (Agarose Gel Extraction, Kit-Jena Bioscience) y se secuenció por Pirosecuenciación de Sanger (IBT) para finalmente ser analizado en MEGA 10.1 (Las secuencias pertenecientes a otros países se obtuvieron del NCBI).

De igual manera, en la Figura 23 se observan en un clado las secuencias de otras nacionalidades. Mientras que en otro clado la secuencia de Tabasco y en otro la de Veracruz. El árbol tiene un valor de escala de 0.06. Este último valor indica que las secuencias analizadas se encuentran cercanas una de la otra.

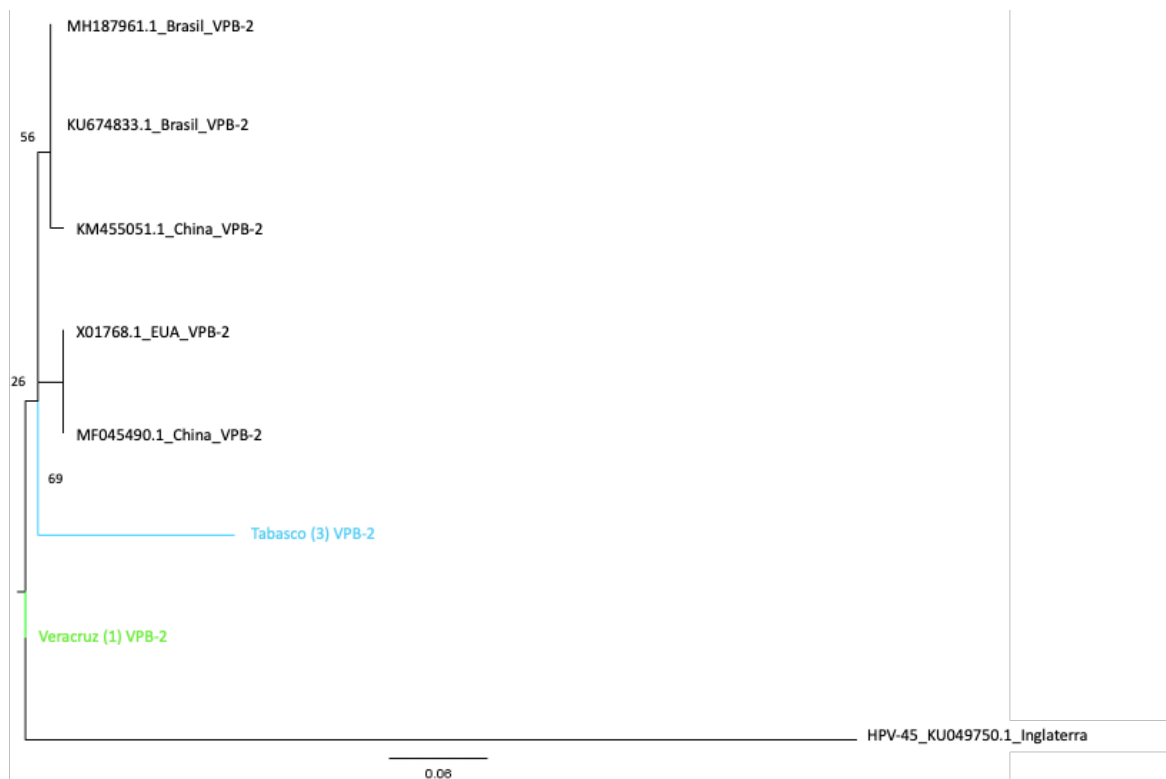


Figura 23: Árbol filogenético de L2 de VPB-2 de ranchos ubicados en Veracruz y Tabasco. Se purificaron las bandas a partir del gel (Agarose Gel Extraction, Kit-Jena Bioscience) y se secuenció por Pirosecuenciación de Sanger (IBT) para finalmente ser analizado en MEGA 10.1 (Las secuencias pertenecientes a otros países se obtuvieron del NCBI) por el método de Maximum Likelihood.

9.2.-DISEÑO *IN SILICO* DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO DERIVADO DE LA PROTEÍNA VIRAL DE CÁPSIDE L1 DEL VPB.

Ya que en el apartado anterior se ilustra que las secuencias son conservadas se decidió tomar las secuencias del genoma reportadas en la base de datos PaVE exclusiva de papiloma virus de animales de diferentes especies con especial atención a bovinos para realizar la predicción de epítopes inmunogénicos. La primera predicción que se realizó fue empleando los genomas de VPB-1, VPB-2 y VPB-4 arrojando como resultado el programa en línea Bepipred 2.0 (para predicción de epítopes de células B) las regiones C-terminal como altamente inmunogénicas; esa región se comparó con la posición de aminoácidos que se mencionan como inmunogénicos en el modelo de la cápside elaborado por Mudis y colaboradores (Figura 5).

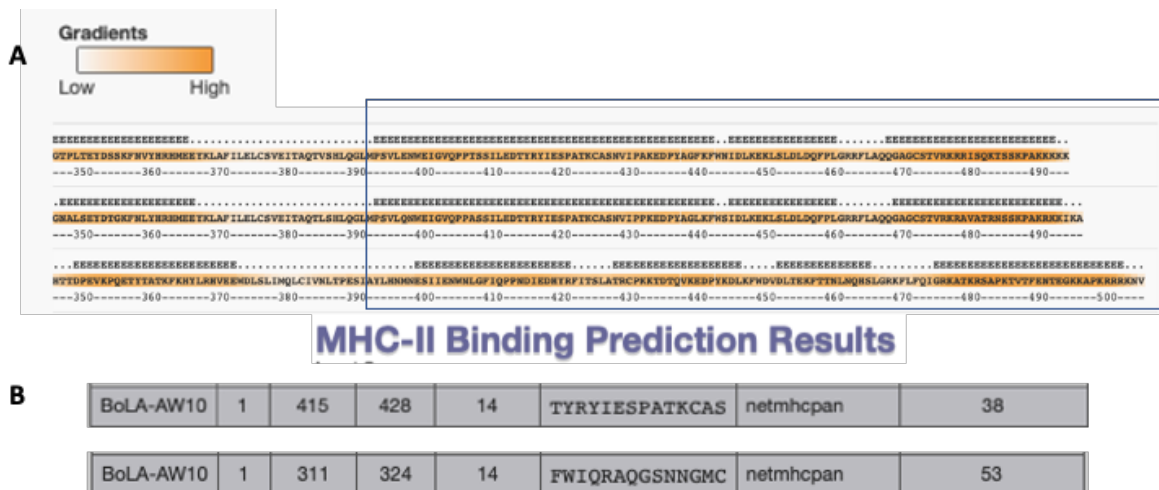


Figura 24: Región C-terminal de L1 como candidata a péptidos sintéticos. A. Predicción de epítopes de células B en el software en línea BepiPred-2.0. **B.** Predicción de epítopes de MHC-II para receptores BoLA en el software en línea MHC-II predictor.

Posteriormente se tomo la región C-terminal (300 nucleótidos) y se realizó la predicción de epítopes de MHC I sin resultados para modelo bovino y murino, mientras que para MHC II se se obtuvieron para los alelos ilustrados en la Figura 25 coincidiendo una secuencia de 14 aminoacidos para la región C-terminal de VPB-1 y VPB-2 (Figura 23)

VPB-1/2: TYRYUESLATKCAS
VPB-4: FWIQRALVSNNGMC



BoLA-AW10
 BoLA-D18.4
 BoLA-JSP.1
 BoLA-n:00101
 H-D-I

Figura 25: El péptido sintético es capaz de inducir una respuesta inmune en modelo bovino y murino. El péptido candidato se muestra resaltado en negritas con respuesta contra VPB-1/2. Se realizó la predicción en los programas MHC I y MHC II predictor. Los péptidos se catalogan con “buena probabilidad” de ser considerados epítopes.

Una vez obtenido el péptido candidato como vacuna para VPB-1 se realizó una alineación en BLASTp contra el péptido candidato para VPB-2 obteniendo como resultado 100% de homología en detección de VPB-1 y 89.1% contra VPB-2 como una posible doble especificidad (Figura 26).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
capsid protein L1 (Delta papillomavirus 4)	212	212	100%	1e-64	100.00%	NP_056744.1
L1 protein (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	3e-64	99.02%	AF077573.1
L1 protein (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	3e-64	99.02%	BAJ04338.1
L1 (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	4e-64	99.02%	AY901245.1
L1 protein (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	4e-64	99.02%	ATX74896.1
L1 protein (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	4e-64	99.02%	ATW01070.1
L1 (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	4e-64	99.02%	AFV52367.1
L1 protein (Delta papillomavirus 4)	211	211	100%	4e-64	99.02%	ATW01140.1
late protein 1 (Delta papillomavirus 4)	210	210	100%	4e-64	99.02%	AYE34073.1
L1 protein (Delta papillomavirus 4)	209	209	100%	2e-63	98.04%	ATW01105.1
L1 capsid protein (Bos taurus papillomavirus 13)	194	194	99%	1e-57	89.11%	YP_009272579.1
major capsid protein (Bovine papillomavirus type 2)	191	191	99%	1e-56	89.11%	AHY28934.1
L1 (Bovine papillomavirus type 2)	191	191	99%	1e-56	89.11%	AMQ04146.1
L1 protein (Bovine papillomavirus type 2)	191	191	99%	1e-56	89.11%	AY355520.1
Reichardt-Fuhrman capsid protein L1	190	190	99%	3e-56	88.12%	P06458.2
unnamed protein product (Bovine papillomavirus type 2)	189	189	99%	5e-56	87.13%	CAA25908.1
L1 protein (Bovine papillomavirus type 13)	189	189	99%	1e-55	88.12%	AYM94395.1
L1 protein (Bovine papillomavirus type 2)	189	189	99%	1e-55	86.14%	APP14126.1
L1 (Bovine papillomavirus type 2)	189	189	99%	1e-55	86.14%	AS489644.1

Figura 26: Posible doble especificidad del péptido basado en VPB-1 contra VPB-2. Se realizó un Blast proteína (BLASTp) del péptido basado en VPB-1.

También se realizó un BLASTp del péptido candidato a vacuna para VPB-1 contra el VPB-1 y se obtuvo como resultado la detección de VPB-1 como se puede observar en la Figura 26 por lo cual en base a estos resultados se ordenó la síntesis del péptido candidato a vacuna contra VPB-1 (Figura 27).

L1 [Bat papillomavirus]

Sequence ID: [ART66906.1](#) Length: 503 Number of Matches: 1

Range 1: 422 to 433 [GenPept](#) [Graphics](#)

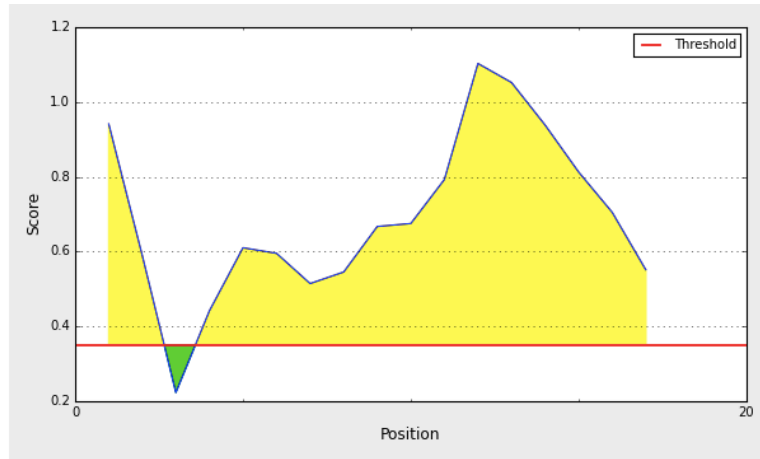
[▼ Next Match ▲ P](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
37.1 bits(80)	0.22	11/12(92%)	11/12(91%)	0/12(0%)
Query	1	TYRYUESLATKC	12	
		TYRY ESLATKC		
Sbjct	422	TYRYIESLATKC	433	

Figura 27. Homología entre el péptido sintético candidato contra el VPB-1. El péptido sintético posee especificidad contra el VPB-1. Se realizó un alineamiento en BLASTp del péptido sintético contra el VPB-1.

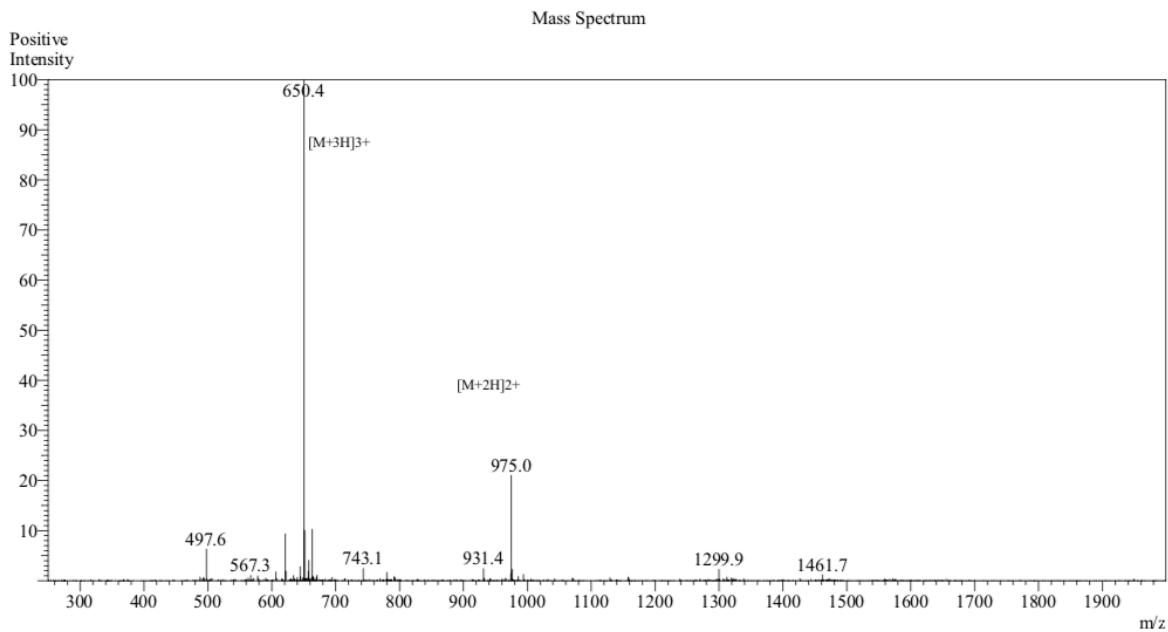
Una vez obtenido el péptido sintético, este se entregó con un gráfico de espectrometría de masas/masas el cual identifica el péptido empleado durante el proyecto. Las especificaciones fueron estandar y mostradas en la Figura 29.

El programa ProtParam indicó que el péptido candidato posee un periodo de vida media de 1 hora en células de mamífero (Reticulitos *in vitro*). También se indicó que es péptido soluble en agua. La predicción de antigenicidad del péptido candidato por Bepipred Linear Epitope Predictor (IEDB Analysis Resource) indicó que la mayoría de la secuencia aminoacídica posee antigenicidad (Figura 28 color amarillo) con excepción de un solo aminoácido (Figura 28 color verde). También se evaluó el punto isoelectrico y peso molecular en el programa en línea Compute pI/Mw tool de Expasy obteniendose como resultado un punto isoeléctrico de 4.68 y un peso de 1948.09 Da por lo cual es considerado un hapteno.



Average: 0.692 Minimum: 0.222 Maximum: 1.104

Figura 28. La secuencia aminoacídica del péptido candidato posee antigenicidad. Se realizó la predicción con valores predeterminados en Bepipred Linear Epitope Predictor (IEDB Analysis Resource).



Sample Information
 Acquired by : Gary
 Month-Day Processed : 06/26/19
 Time Processed : 12:18:11 AM
 Injection Volume : 0.3
 Sample Name : BPV-1/2
 Sample ID : U485BEE310-3
 Theoretical MW : 1948.08
 Observed MW : 1948.2

Interface :ESI
 Nebulizing Gas Flow :1.5L/min
 CDL Temp :250
 Block Temp :200

Equipment : GK11010007
 Interface Bias : +4.5 kV
 Drying Gas Flow : 5 L/min
 T.Flow :0.2 ml/min
 B.conc :50%H2O/50%MeOH

Figura 29. Espectro de masas de péptido candidato a vacuna contra VPB-1. Representación de patrón de masa del péptido empleado en el presente trabajo.

9.3.-LA INMUNIZACIÓN EN RATONES CON EL PÉPTIDO SINTÉTICO INDUCE UNA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

Se comprobó la reactividad en título de hasta 1:200, dicha inmunización se tomó como vacuna de control positivo (extracto de antígeno proteico total inactivado con BEI 2M), se realizó una ELISA indirecta para comprobar la especificidad de los anticuerpos producto de la inmunización y validación de la técnica. con los sueros del día 0, 7, 14 y 35 en una placa sensibilizada con lisado de verruga total, obteniéndose reactividad a dilución 1:100 en días 7, 14 y 35, y en dilución 1:100-1:200 al día 35 (Figura 30). Hay diferencia altamente significativa ($p > 0.001$) entre el día 0 con los demás (comparando las diluciones 1:100 y 1:200). En el día 7 hay diferencia significativa entre dilución 1:100 con 1:200 y 1:400 ($p > 0.001$). De igual manera en el día 14 ($p > 0.01$ y $p > 0.001$). Al día 35 se observó diferencia altamente significativa entre dilución 1:100 con el resto y altamente significativa entre la dilución 1:200 y 1:400 ($p > 0.001$). Se tomó como punto de corte un valor de 0.087.

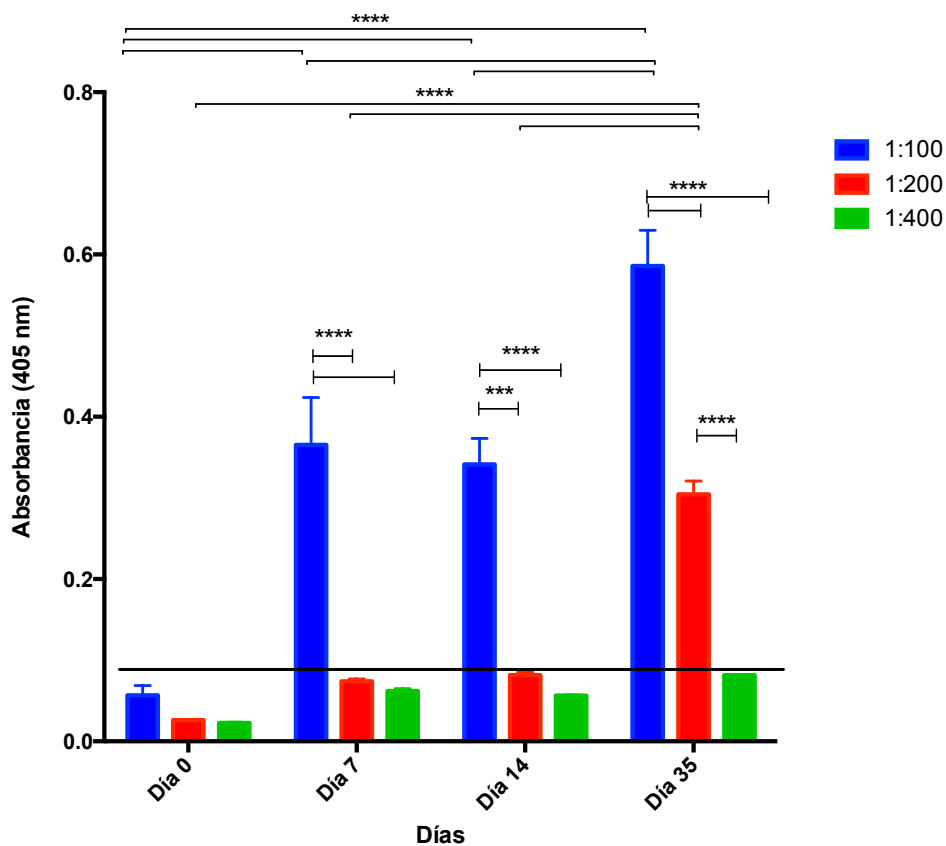


Figura 30: Reactividad de suero anti-verruga contra LVT en dilución 1:00 en día 7 y 1:100-1:200 en día 14 y 35. Se probó la especificidad por ELISA indirecta en sueros provenientes de la inmunización con extracto de antígeno total inactivado con BEI (2M). Punto de corte (0.087). **** representan diferencia altamente significativa (test de Tukey $p > 0.001$), *** representan diferencia significativa (test de Tukey $p > 0.01$) (N=2).

Posteriormente se evaluó la reactividad en suero de ratones inmunizados con péptido contra una placa sensibilizada con péptido por la técnica ELISA indirecta para evaluar la especificidad de los anticuerpos producto de la inmunización con el péptido sintético. Se evaluaron los sueros del día 0, 7, 14 y 35 y se observó reactividad a dilución 1:100 – 1:400 en días 7, 14 y 35 (Figura 31) con diferencia altamente significativa ($p > 0.001$). Hay diferencia significativa entre dilución 1:100 con 1:400 en día 14 y entre 1:100 con 1:1200 y 1:400 al día 35 ($p > 0.05$). Se tomó como punto de corte un valor de 0.053.

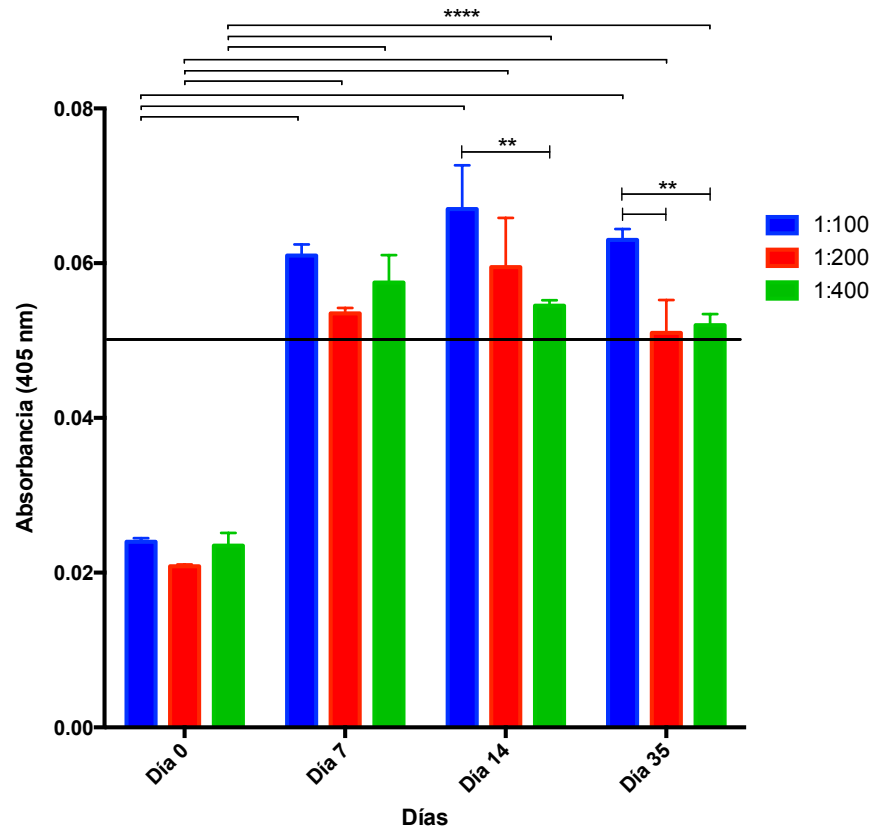


Figura 31: Reactividad de suero anti-péptido contra péptido en dilución 1:100-1:400 al día 7, 14 y 30. Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con el péptido sintético en adyuvante completo de Freund (1:1) y se probó la especificidad por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con péptido sintético en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.053). **** representan diferencia altamente significativa (test de Tukey $p > 0.001$), ** representan diferencia significativa (test de Tukey $p > 0.05$) (N=2).

Una vez comprobada la reactividad de los sueros, se probó especificidad del suero anti-verruga en una placa sensibilizada con péptido por medio de la técnica ELISA indirecta para comprobar que el péptido sintético candidato a vacuna pudiese ser considerado un epítoto inmunogénico. Se observó reactividad en días 7, 14 y 35 en dilución 1:100 y 1:200 (Figura 32). Mediante la prueba de Tukey se observó que hay diferencia significativa entre el día 0 con el día 7, 14 y 35, así como en el día 7 comparado con el día 0, 14 y 35, pero no entre los días 14 y 35 ($p > 0.05$). Se tomó como punto de corte un valor de 0.219.

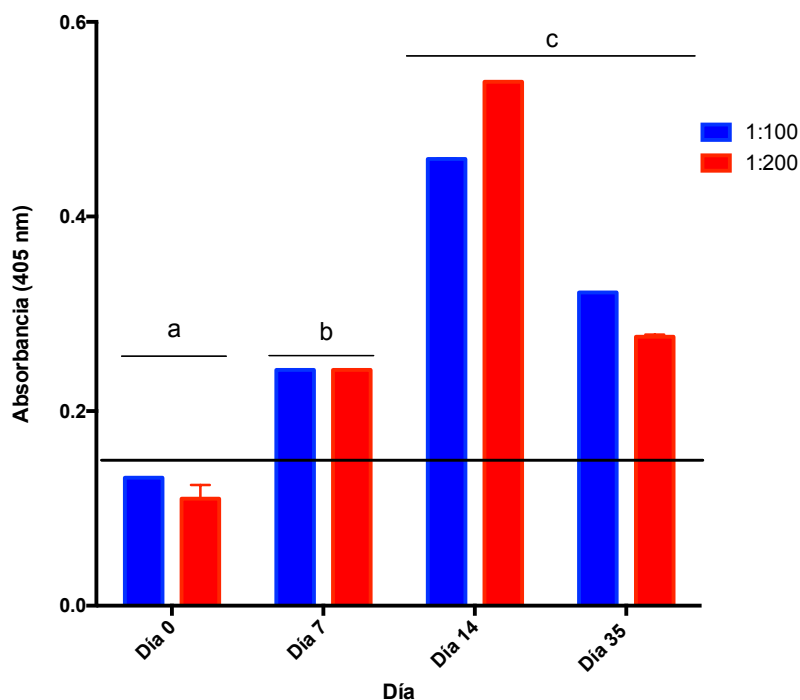


Figura 32: Reactividad de suero anti- verruga contra péptido en dilución 1:200-1:400 al día 14 y en dilución 1:200 al día 35. Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con extracto de antígeno total inactivado con BEI 2M y se probó la especificidad por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con péptido sintético en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.219) (las letras a, b y c representan diferencia significativa, test de Tukey $p > 0.05$) (N=2).

Posteriormente se probó la especificidad del suero anti-péptido en una placa sensibilizada con lisado de verruga total para comprobar la especificidad de los anticuerpos producidos por la inmunización con el péptido sintético candidato a vacuna, por medio de la técnica ELISA indirecta también para evaluar la posibilidad de ser considerado el péptido sintético un epítipo inmunogénico. Se observó reactividad en días 7, 14 y 35 en dilución 1:100 y 1:200. Mediante la prueba de Tukey se observó que hay diferencia significativa entre el día 0 con el día 7, 14 y 35, así como en el día 7 comparado con el día 0, 14 y 35, pero no entre los días 14

y 35 ($p > 0.05$) (Figura 33). Se tomó como punto de corte un valor de 0.219. El péptido sintético indujo la producción de anticuerpos específicos capaces de detectar el virus presente en el lisado de verruga total en un modelo murino.

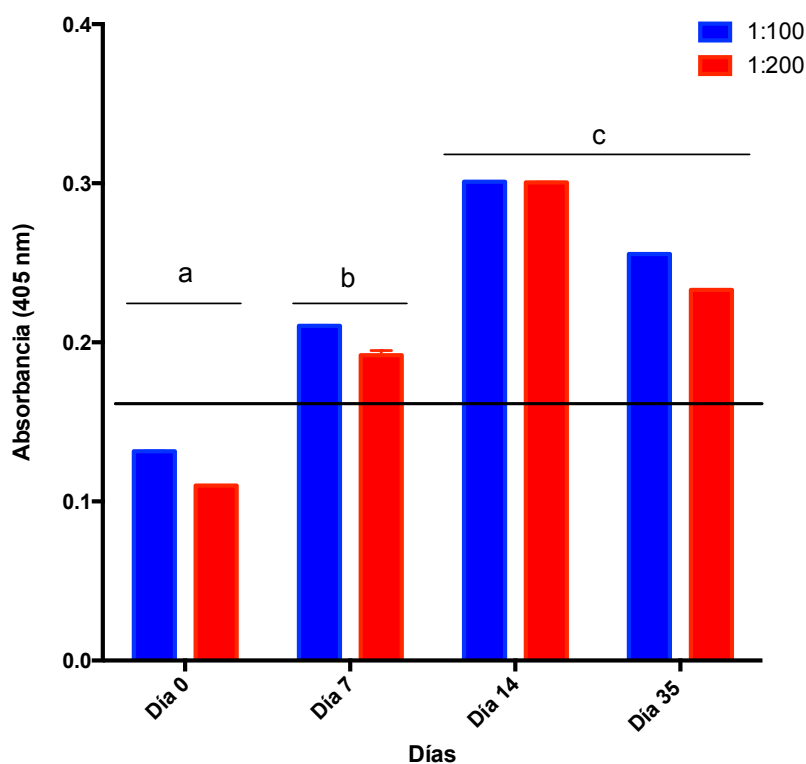


Figura 33: Reactividad de suero anti-péptido contra LVT en dilución 1:200 al día 7, 14 y 35, y en dilución 1:400 al día 14 y 35. Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con el péptido sintético en adyuvante completo de Freund (1:1) y se probó la especificidad por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con LVT en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.219) (las letras a, b y c representan diferencia significativa, test de Tukey $p > 0.05$) (N=2).

Para descartar reactividad inespecífica inducida por el Adyuvante completo de Freund se realizó una ELISA indirecta sensibilizando la placa con LVT y se agregó el suero de ratones inmunizados con el adyuvante. No se observó reactividad a ninguna dilución ni día tomando un punto de corte de 0.09 (Figura 34).

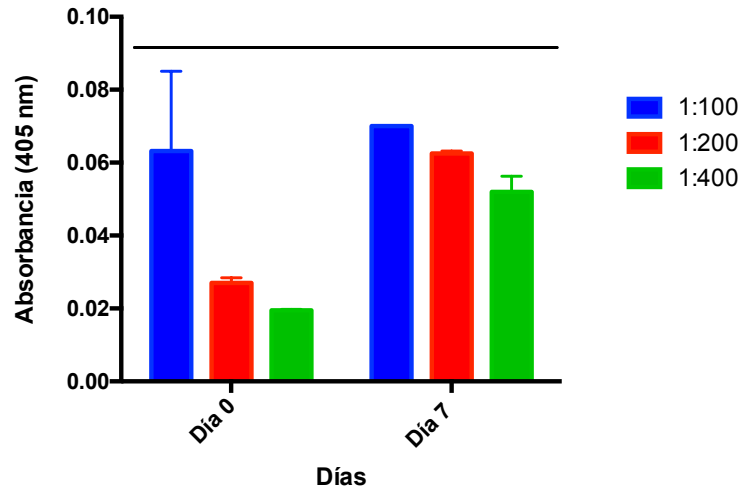


Figura 34: Ausencia de reactividad de suero anti-adyuvante completo de Freund contra LVT.

Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con solo el adyuvante completo de Freund y se probó la especificidad por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con LVT en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.09) (las letras a, b y c representan diferencia significativa, test de Tukey $p > 0.05$) (N=2).

Una vez determinada la reactividad a los días 0, 7, 14 y 35 se realizó una ELISA indirecta con los sueros del día 42, con el fin de observar reactividad 2 semanas después de la última dosis con el péptido sintético/extracto de antígeno proteico total. Comparado contra el día 0 (aV- y aP-) se encontró reactividad en dilución 1:100 y 1:200 en el suero anti-verruga y en dilución 1:100 en suero anti-péptido en una placa sensibilizada con lisado de verruga total tomando como punto de corte el valor de 0.08 (Figura 35). Se observó diferencia altamente significativa entre la dilución 1:100 respecto al resto en el suero anti-verruga y anti-péptido ($p > 0.001$) y en el suero anti-verruga entre el suero 1:200 y el resto de las diluciones ($p > 0.001$). Por lo cual se mantiene la reactividad a partir de la primera dosis y se mantiene 2 semanas después de la tercera dosis.

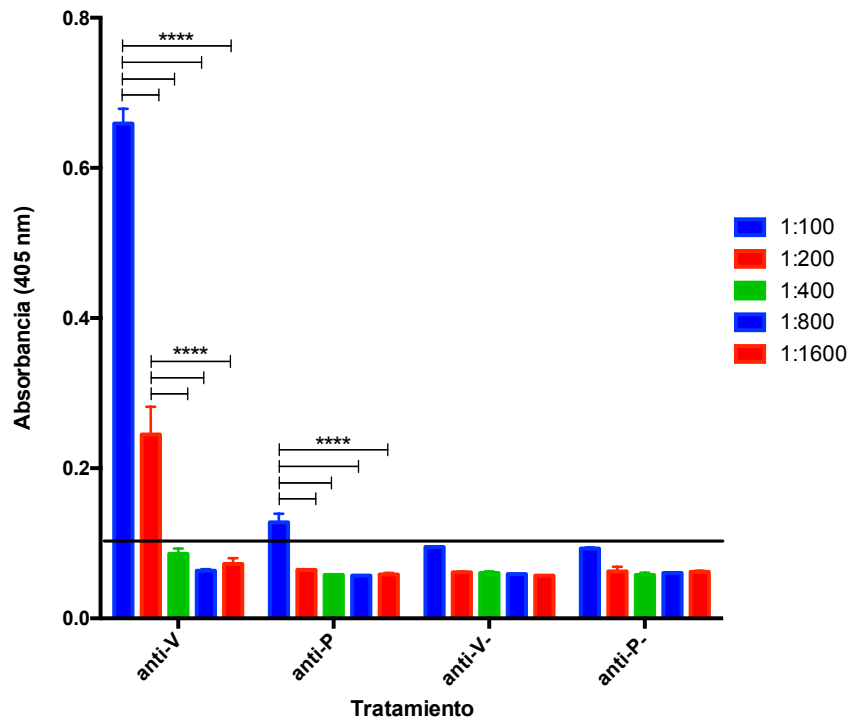


Figura 35: Reactividad de suero anti-verruga contra LVT en dilución 1:100-1:200 al día 35, y en dilución 1:100 al día 42 en suero anti-péptido contra LVT. Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con el péptido sintético en adyuvante completo de Freund (1:1) / extracto de antígeno total inactivado con BEI 2M y se probó la especificidad por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con LVT en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.08) (test de Tukey **** $p > 0.001$) (N=2).

Después se evaluó la inducción de anticuerpos en un modelo bovino, para lo cual se inmunizó un toro Beef Master de 4 años de edad con extracto de antígeno total inactivado con BEI 2M. Se evaluó la reactividad de los sueros anti-toro en una placa sensibilizada con lisado de verruga total para comprobar la especificidad de los anticuerpos producidos por la inmunización como control positivo, por medio de la técnica ELISA indirecta. Se observó reactividad en días 0, 7, 21 y 42 en dilución 1:100-1:1600. Se tomó como punto de corte un valor de 0.13. No se observa diferencia entre los días pero se consideran como positivos respecto a los pozos sin suero (Figura 36).

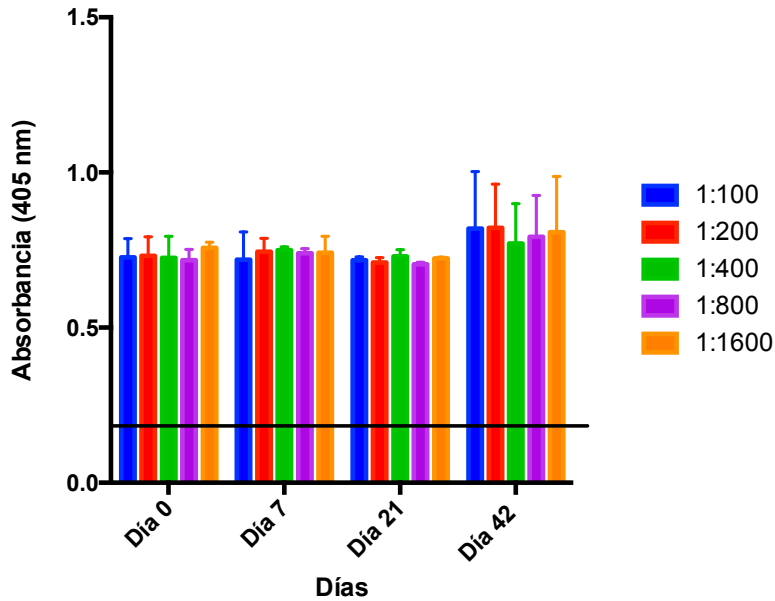


Figura 36: Reactividad de suero anti-toro contra LVT en dilución 1:100-1:1600 al día 0, 7, 21 y 42. Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con el extracto de antígeno total inactivado con BEI (2M) por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con LVT en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.13) (N=2).

Finalmente se evaluó si los anticuerpos producto de la inmunización con el extracto de antígeno total inactivado con BEI (2M) eran capaces de reconocer al péptido sintético para considerarse este último como epítipo de células B. Por lo cual se evaluó la reactividad de los sueros anti-toro en una placa sensibilizada con el péptido sintético por medio de la técnica ELISA indirecta. Se observó reactividad en días 0, 7, 21 y 42 en dilución 1:100-1:1600. Se tomó como punto de corte un valor de 0.113. No se observa diferencia entre los días pero se consideran como positivos respecto a los pozos sin suero (Figura 37). Pero se observa al día 7 un incremento en la absorbancia respecto al día 0 especialmente en dilución 1:100, también se observan los valores en dilución 1:100 en día 21 y 42 mayores respecto al día 0 pero menores que el día 7.

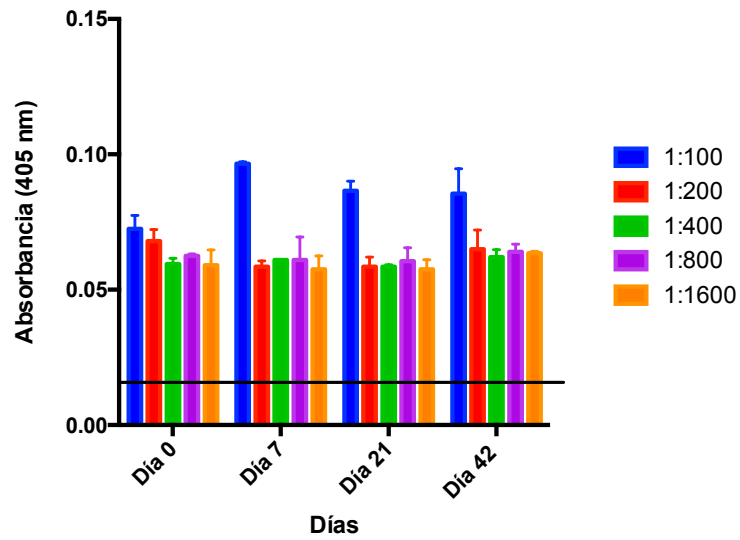


Figura 37: Reactividad de suero anti-toro contra péptido sintético en dilución 1:100-1:1600 al día 0, 7, 21 y 42. Se realizaron diluciones de los sueros provenientes de la inmunización con el extracto de antígeno total inactivado con BEI (2M) por ELISA indirecta (se sensibilizó la placa con péptido sintético en buffer carbonatos 1:1), la línea punteada indica el punto de corte (0.113) (N=2).

10.-DISCUSIÓN

Son pocos los reportes de incidencia de papilomatosis bovina en México, probablemente debido a la falta de información de la enfermedad. Solo se ha realizado genotipificación en el estado de Tamaulipas, México, reportando a los genotipos VPB-1 y VPB-2 (Rojas *et al.*, 2016). Rojas y colaboradores la realizaron empleando como blanco para la PCR al gen E7, posicionando a las secuencias locales en un clado diferentes al de las secuencias reportadas por otros países; aun así con una distancia cercana entre las secuencias, considerándose conservadas (Rojas *et al.*, 2016). Esto coincide con los reportes a nivel mundial, que posicionan al VPB-1 y VPB-2 como los de mayor prevalencia a nivel mundial, causando verrugas cutáneas y en zonas genitales (Ñumbay *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2015; Rojas *et al.*, 2016; UNAM, n.d) así como la prevalencia reportada en el presente trabajo, también con secuencias consideradas conservadas en base a lo observado en los árboles filogenéticos. En el presente estudio solo se encontró al VPB-2 en co-infecciones con VPB-1 en el 22.2% de los ranchos de N.L., el 100% de los ranchos de Veracruz, y el 66.6% de ranchos de Tabasco muestreados. Se observó que en proporciones los estados del sur de la República presentaban un mayor porcentaje de co-infección que en el norte, esto podría deberse a que en el sur del país predomina la reproducción del ganado bovino, mientras que en el norte se maneja la engorda, además de que el norte es considerado cuello de botella para la exportación de cabezas. Por lo cual los novillos que presenten papilomatosis no serán comprados, siendo que probablemente tengan la infección/co-infección que se encuentra en mayor circulación y que aquellos que llegen al norte una vez ahí se infecten por VPB-1 y aquellos que presenten co-infección con VPB-2 ya estaba el virus del organismo en una fase asintomática. Cabe recalcar que una muestra representativa de un rancho de Tabasco y otra de Chiapas no amplificaron para VPB-1/2/4 por lo cual se confirman como papilomatosis pero no se puede asegurar que sea causada por el VPB, probablemente si sea infección por VPB debido a la morfología de cliflor de la verruga (Mansour, Naser & Hussain, 2019) pero de algún otro genotipo para el cual no se cuenta un set de primers para su genotipificación.

En centroamérica y sudamérica se reporta incidencia de otros genotipos como el VPB-3, VPB-4 y VPB-6 (Orozco & Padilla, 2016) los cuales además del VPB-2 promueven consecuencias mayores de la enfermedad como verrugas en tracto digestivo y carcinogénesis, por lo que estos animales mueren o no son atractivos para su compra por los estados del norte. Por lo que aquellos que estén infectados por VPB-2 probablemente no sobrevivan en su mayoría, ya que este genotipo está asociado a la aparición de verrugas en tracto urinario (Wosiacky *et al.*, 2005).

En el árbol filogenético de VPB-1 en base a un fragmento de la proteína mayor de cápside L1 exclusiva del genotipo, se incluyeron secuencias locales con infección por VPB-1 y co-infección con VPB-1 y VPB-2 (Figura 22 y 23) se observa que estas se encuentran en 2 clados diferentes a los clados en los que se encuentran las secuencias de otras nacionalidades, a pesar de esto la distancia filogenética no es grande por lo que la secuencia se considera conservada, como se ha observado en la genotipificación de VPB-1 en base a la secuencia de L1 (Mansour, Naser & Hussain, 2019). Aunque en el árbol filogenético del VPB-2 en base a un fragmento de la proteína menor de cápside L1 exclusiva del genotipo (Figura 23) se observan en clados separados las secuencias de Tabasco y en otro Veracruz con una mayor distancia que en la del genotipo VPB-1 también se consideran secuencias conservadas. Esto se debe a que la secuencia de la proteína viral de cápside L2 es menos conservada que la de la proteína L1 (Campo *et al.*, 1997).

Ya que la secuencia aminoacídica y nucleotídica de la proteína L1 es altamente conservada (Mansour, Naser & Hussain, 2019) la convierte en un buen blanco de anticuerpos neutralizantes, por lo que se decidió en base a la reactividad de epítopes derivados de esta en la bibliografía diseñar un péptido sintético en base a esta. Aunque las secuencias locales se encuentran en un clado separado a las de otros países, la distancia filogenética se considera cercana, por lo que se pueden emplear para la predicción del péptido tanto secuencias locales como de otro país así que se emplearon las secuencias aminoacídicas de la proteína L1 de base de datos Pave exclusiva de papilomavirus.

La predicción de epítotope de célula B se realizó con la secuencia aminoacídica de la L1 completa, y se arrojó que la región C-terminal (últimos 400 aminoácidos) se sugiere como inmunogénica, coincidiendo con el modelado de la cápside viral (Mudis, Trus & Harrison, 2002) ; se tomo como primer aminoacido del péptido candidato el aminoacido 420 de la L1, con esto saltando los aminoácidos 300-400 que se reportan como no-eficientes para promover respuesta humoral (Lim *et al.*, 1990). El péptido candidato esta en una posición superior al aminoácido 400 y en cuanto a su localización en la cápside viral se encuentra expuesto y es lineal, a pesar de que se ha reportado a los péptidos lineales como debiles al momento de inducir anticuerpos neutralizantes (Bennet *et al.*, 1991) y no se descarta la posibilidad de producción de anticuerpos capaces de controlar la enfermedad debido a la localización y naturaleza del epítotope en la cápside. Se buscó un epítotope de máximo 30 aminoácidos de longitud para que entrase en la longitud de un epítotope de células B (Owen, 2014), por lo cual el seleccionado entra dentro de este rango al componerse de 17 aminoácidos.

También se realizó una predicción de la región C-terminal como candidata a epítotope de MHC-II, además que con este software se validó la utilización del modelo murino al introducir alelos de murino, así como de bovino (Figura 25). Se mandó a sintetizar el péptido ya que posee posible doble especificidad, contra VPB-1 y VPB-2 ya que el epítotope predicho posee la misma secuencia de aminoácidos para ambos genotipos, confirmandose al realizar un BLASTp identificandose homología contra estos dos genotipos (Figura 26) apoyando su antigenicidad de casi todos sus aminoácidos (Figura 28). El péptido sintético no se puede administrar en solución salina, por lo cual se inyecta con un adyuvante que evite su degradación y permita su captación y presentación como antígeno (Schneider *et al.*, 2011), además que la predicción de sus propiedades fisico-químicas se considera con carga negativa y por su peso hapteno por lo cual requiere de un adyuvante para ser considerado inmunogénico. Por lo cual se administró con adyuvante completo de Freund en la

primera dosis y en las siguiente 2 con el incompleto como indican protocolos de inmunización con péptidos sintéticos (Aguilar *et al.*, 2013).

Una de las pruebas que se emplean para evaluar la especificidad de los anticuerpos producidos por inmunización es la prueba de ELISA, en el presente trabajo se empleó la técnica ELISA indirecta. Primero se evaluó el anti-suero proveniente de la inmunización con extracto de antígeno total inactivado con BEI 2M tomándose como fuente de anticuerpos para control positivo, dicha vacuna se ha aplicado en ganado bovino como una fuente de diversos epítopes virales, se ha demostrado clínicamente que reduce la aparición de verrugas cutáneas de manera terapéutica (Pangty *et al.*, 2010). Se confirmaron como específicos del virus al observarse reactividad en 1:200 contra LVT, esto coincide con la reactividad observada en anti-suero de bovino tras la inmunización con partículas tipo virus (VLPs), virus y virus inactivado, contra partículas virales de VPB y en un título de hasta 1:200 tras la inmunización con un péptido sintético derivado de la proteína viral L2 de VPB-2 (Campo *et al.*, 1997). Cabe aclarar que la absorbancia aumenta conforme el avance de las días y las repetidas inmunizaciones, indicando la inducción de una respuesta inmune humoral (Jenison *et al.*, 1989) con diferencia significativa entre días y diluciones (1:100 y 1:200). No se requiere que a una dilución mayor siga observándose reactividad, es suficiente observar respecto al día 0 (Antes de la primera inmunización) para considerarse epítope.

La ELISA indirecta con placa sensibilizada con péptido sintético demostró que los anticuerpos del anti-suero producto de la inmunización con el péptido sintético son específicos de epítope. Se observó reactividad hasta un título de 1:200 con alta diferencia significativa entre los días evaluados y entre diluciones. Esto coincide con la reactividad observada en 1:200 del anti-suero de conejo (tras la inmunización con proteína recombinante L1 de HPV6b) contra péptido sintéticos (aminoácidos 417-437) y en título 1:800 de anti-suero proveniente de pacientes con HPV6b contra el mismo péptido (Jenison *et al.*, 1989) observándose estas diferencia que los epítopes pueden cambiar entre HPV y VPB y entre especies. Para probar

si el péptido sería reconocido por las células B simulando la presencia del virus, se puso en contacto el anti-suero anti verruga contra el péptido sintético obteniéndose los mismo resultados que en el caso anterior con diferencia significativa entre los días con reactividad en título 1:200 incluso aumentando la absorbancia conforme los días, indicando la inducción de la respuesta inmune humoral. A su vez se comprobó el péptido sintético como epítipo específico de VPB-1 ya que en todas las pruebas de ELISA se empleó un lisado de verruga total confirmada como VPB-1 además de que el anti-suero proveniente de la inmunización con péptido sintético fue capaz de reconocer al virus presente en dicho lisado hasta un título de 1:200 con diferencia altamente significativa entre días coincide con la reactividad observada al inmunizarse con un péptido sintético derivado de la proteína L2 de VPB-2 /VPB-4 (Campos *et al.*, 1997; Jenison *et al.*, 1989).

Aunque en la Figura 32 se observa que hay mayor reactividad entre el suero anti-verruga contra el péptido que el suero anti-péptido contra LVT (Figura 33), en ambas gráficas se observa un comportamiento similar en la titulación. Lo anterior se puede explicar a que la inmunización con extracto de antígeno total posee mayor cantidad de epítopes por lo cual el suero tenga anticuerpos policlonales con reactividad cruzada contra el péptido sintético. Lo anterior coincide con anti-suero de conejos y bovinos inmunizados con partículas virales desnaturalizadas o proteína L1 de VPB-1 contra anticuerpos específicos contra el virus/ partículas virales desnaturalizadas o intactas en un título de 1:50 en suero de bovino y 1:2000 de conejo (Ghim *et al.*, 1991).

El péptido sintético si provee especificidad de anticuerpos como epítipo, ya que en la ELISA indirecta en la que se sensibilizó la plaza con el péptido y se tituló reactividad de los anticuerpos producto de la inmunización con extracto de antígeno total. Se creyó que tal vez en la manipulación de las ELISA's sensibilizadas con péptido sintético al realizar los lavados la concentración de Tween estuviese elevada, pero en las técnicas mencionadas para evaluar epítopes peptídicos hexaméricos por también la prueba ELISA emplean PBS Tween 20 0.05% (Lim *et*

al., 1990). También se observa se mantiene la reactividad después de la segunda dosis, sin diferencia con al tercera dosis, así como un aumento en la absorbancia conforme el avance de los días, esto coincide con lo publicado por Jenison y colaboradores en la prueba de ELISA conforme el avance de los días y en las inmunizaciones en conejo con L1 recombinante de VPB-1.

En la Figura 36 se observa reactividad de suero anti-toro contra LVT en todos los días evaluados, incluso el día 0. Se esperaba que al haberse realizado la inmunización en un toro que nunca había presentado papilomatosis bovino no se observase reactividad en el día 0, lo mismo se observó en el suero anti-toro contra el péptido sintético (Figura 37). Como es una inmunización se evalúa la respuesta secundaria o sea humoral con un aumento en la expresión de IgG, pero desde el día 0 ya está presente con reactividad, lo que indica dos opciones, la primera, que el epítipo no es específico del virus, la segunda, que el toro ya estaba infectado pero sea asintomático, o que haya nacido con el virus presente o insertado en su genoma. Se pensó que tal vez se requería hacer más diluciones del suero proveniente del toro para evitar reactividad en el día 0, pero se ha reportado que aun en dilución 1:50 no se debería tener reactividad en el día 0 que es el punto de comparación. (Ghim *et al.*, 1991). La segunda posibilidad anteriormente mencionada establece que al momento de ser concebido el toro, sus progenitores tuvieron activa la infección la cual se pasó a línea germinal transmitiéndose a la siguiente generación, ya que se ha reportado la presencia del virus en líquido seminal y pre-seminal incluso en comercial (Fava *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016; Silva, Pontes, Da Silva, Guerra, & Freitas, 2011; Silva, Silva, Gurgel, Nascimento, & Freitas, 2014). Aunque no se observaron diferencias significativas en las Figuras 35 y 36 se observa un aumento en la observancia del día 7 (7 días desde la primera inmunización con el extracto de antígeno total) es el pico más alto respecto a los demás días lo que indica que posiblemente no era la primera vez que el toro estuvo expuesto al virus o bien al virus inactivado.

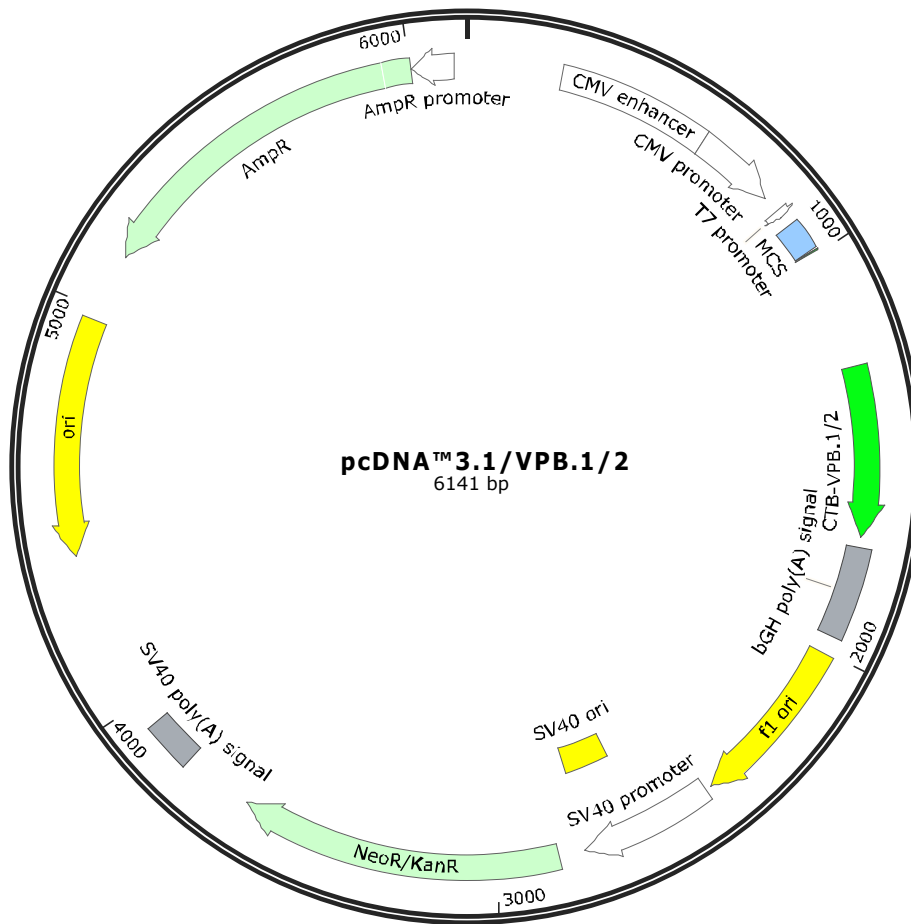


Figura 38. Propuesta de vacuna de ADN con epítipo derivado de la proteína viral mayor de cápside L1 del VPB-1. Secuencia coficiante del epítipo evaluado en el presente trabajo adjunto en C-terminal de la secuencia codificante de CTB espaciado por la secuencia codificante de 2 lisinas.

Ya que el epítipo es considerado inmunogénico, por lo cual se realiza la propuesta de una vacuna de ADN (en un vector de expresión de células de mamíferos) (Figura 38) que incluya la secuencia codificante de dicho péptido para su evaluación en modelo murino y bovino.

11.-CONCLUSIONES

- Los genotipos circulantes en las muestras obtenidas de los estados de Nuevo León, Tabasco, Veracruz y Chiapas son el VPB-1 y VPB-2.
- El genotipo del VPB-2 solo se encuentra en co-infección con el VPB-1.
- Se observaron muestras con infección exclusivamente con el VPB-1.
- La secuencia aminoacídica de los fragmentos secuenciados de VPB-1 y VPB-2 es altamente conservada dentro de los genotipos.
- El péptido sintético por medio de las pruebas *in silico* es un epítotope de células B para modelo murino y bovino.
- El péptido sintético en un modelo murino induce anticuerpos específicos de epítotope (título de anticuerpo 1:100-1:200).
- Los anticuerpos policlonales específicos contra VPB-1 (de bovino) poseen reactividad contra el péptido sintético en un modelo murino, por lo cual se puede considerar este último como epítotope inmunogénico.

12.-PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

El presente trabajo nos permitirá en futuros trabajos incorporar el péptido inmunogénico en un plásmido de expresión que nos permita la producción de el péptido en modelos animales, como el murino y bovino. En donde se determinará su protección contra la infección del virus de papiloma bovino. Se propone realizar el diseño de una vacuna de ADN en el plásmido pcDNA3.1(+) el cual puede expresarse en mamíferos, para de esta manera ser probado en modelo murino y bovino vía intramuscular (pegilado) (Figura 38). Se propone adjuntar (en N-terminal) la secuencia de la subunidad B de la toxina del Colera (CTB) unido (mediante los aminoácidos KK) al epítotope evaluado en el presente trabajo ya que se ha reportado que esta secuencia posee el efecto de adyuvante aumentando la captación de la vacuna por las células, pudiendose a escalar a grandes especies como es el caso de los bovinos (Urrutia *et al.*, 2019). Tambien se propone evaluar si los anticuerpos producto de la inmunización con la vacuna de ADN poseen actividad neutralizante por medio de un ensayo de neutralización *in vitro* en la línea celular de TVT que ha sido probada como permisiva en el Laboratorio de Inmunología y Virología de FCB, UANL.

13.-REFERENCIAS

1. Aguilar, A., Camacho, F., Amin, N., Prieto, J., Garay, H., Reyes O., & Acosta, A. 2013. Comparación de la antigenicidad de dos construcciones peptídicas de mimotopos del virus de la hepatitis A mediante suero de ratones inmunizados. *VaccineMonitor*; 22 (3): 43-46.
2. Bahnemann, H. G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Archives of Virology*,47(1), 47-56. doi:10.1007/bf01315592
3. Banchereau, J., Schuler-Thurner, B., Palucka, A. K., & Schuler, G. 2001. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell*, 106(3), 271–274. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00448-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00448-2)
4. Barthold S. W., Olson, C. Y Larson, L. 1976. Precipitin response of cattle to commercial wart vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 37: 449-451.
5. Campo, M. S., O'Neil, B. W., Grindlay, G. J., Curtis, F., Knowles, G., & Chandrachud, L. 1997. A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papillomavirus-4 prevents disease. *Virology*, 234(2), 261–266. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8649>
6. Contreras JF., Menchaca GE., Infante R., Hernandez CE, Rodriguez CR., Tamez., S. 2011. Evidence of conserved epitopes in variable region of VP8* subunit of VP4 protein of rotaviruses of P[8]-1 and P[8]-3 lineages. *Acta virológica* 55: 273 – 278, 2011.
7. De Martel, C. et al. 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 13, 607–615.
8. Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. 2012. *The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses*. *Vaccine*,30. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
9. Fava, C. Del, Okuda, L. H., Scarelli Vicente, M. E., de Souza Hunold Lara, M. do C. C., Cassaro Villalobos, E. M., Mori, E., ... Maristela Pituco, E. 2019. Bovine Papillomavirus Type 1 in Brains of Cattle with a Neurological Syndrome: Pathological and Molecular Study. *Journal of Carcinogenesis &*

- Mutagenesis, 10(1). <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000330>
10. Fleming, W., & Jarrett, H. (2001). (12) United States Patent. 1(12).
 11. Fleury, M. J. J., Touzé, A., & Coursaget, P. 2014. Human papillomavirus type 16 pseudovirions with few point mutations in L1 major capsid protein FG loop could escape actual or future vaccination for potential use in gene therapy. *Molecular Biotechnology*, 56(5), 479–486. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9745-1>
 12. Ghim, S., Christensen, N. D., Kreider, J. W., & Bennett Jenson, A. 1991. Comparison of neutralization of BPV-1 infection of C127 cells and bovine fetal skin xenografts. *International Journal of Cancer*, 49(2), 285–289. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910490224>
 13. Gonzalez, F. E., Gleisner, A., Falcon-Beas, F., Osorio, F., Lopez, M. N., & Salazar-Onfray, F. 2014. Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(11), 3261–3269. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.982996>
 14. Graham, S. 2017. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. *Clinical Science*, 131(17), 2201-2221. doi:10.1042/cs20160786
 15. Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
 16. Hagemann, T. et al. 2008. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-κB. *J. Exp. Med.* 205, 1261–1268
 17. Immunopaedia. n.d.. evasion inmune hpv inimmunopaedia.org.pdf.
 18. Jenison, S. A., Yu, X. P., Valentine, J. M., & Galloway, D. A. (1989). Human antibodies react with an epitope of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame which is distinct from the type-common epitope. *Journal of Virology*, 63(2), 809–818.
 19. Jenson, B., Lim, P., Ghim, S., Cowser, L., Olson, C., Lim, L., Farquhar, C., & Pilacinski, W. 1991. Identification of Linear Epitopes of the BPV-1 L1 protein

- recognized by Sera of Infected or Immunized Animals. *Pathobiology*; 59:396-403.
20. Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., & Sakai, H. 2012. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Frontiers in Microbiology*,3. doi:10.3389/fmicb.2012.00152
21. Kohlhapp, F. J., Mitra, A. K., Lengyel, E., & Peter, M. E. 2015. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 34(48), 5857–5868. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.89>
22. León, G. & Bosques, O. 2005. Infección por el virus de papilloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del del cáncer de cuello uterino. *Rev. Cubana de Obstetricia y Ginecología*.
23. Li, Z., Song, S., He, M., Wang, D., Shi, J., Liu, X., . . . Xia, N. 2018. Rational design of a triple-type human papillomavirus vaccine by compromising viral-type specificity. *Nature Communications*,9(1). doi:10.1038/s41467-018-07199-6
24. Lim, P. S., Jenson, A. B., Cowser, L., Nakai, Y., Lim, L. Y., Jin, X. W., & Sundberg, J. P. 1990. Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides. *Journal of Infectious Diseases*, 162(6), 1263–1269. <https://doi.org/10.1093/infdis/162.6.1263>
25. Ljubojevic, S., & Skerlev, M. 2014. HPV-associated diseases. *Clinics in Dermatology*,32(2), 227-234. doi:10.1016/j.clindermatol.2013.08.007
26. Loraine S, Mendoza EJ., 2010. Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 41, núm. 4, 18-27.
27. Malmberg, K. J. 2004. Effective immunotherapy against cancer: A question of overcoming immune suppression and immune escape? *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(10), 879–892. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0577-x>
28. Mansour, K. A., Naser, H. H., & Hussain, M. H. 2019. Phylogenetic tree analysis study of bovine papillomaviruses type 1 based on L1 gene in Al-

- Qadisiyah governorate, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 33(1), 151–155. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.125535.1057>
29. Mattil-Fritz, S., Scharner, D., Piuko, K., Thönes, N., Gissmann, L., Müller, H., & Müller, M. 2008. Immunotherapy of equine sarcoid: Dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. *Journal of General Virology*, 89(1), 138–147. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83266-0>
30. Mayilkumar K., Kokila S., Prabhu M., & Gopal K. 2014. Formalin Inactivated Autogenous Vaccine for Treatment of Papillomatosis in Adult Dairy Cow. *Indian Veterinary Journal*. 91 (10): 13-15.
31. Melo, T. C., Araldi, R. P., Pessoa, N. S. D., de-Sá-júnior, P. L., Carvalho, R. F., Beçak, W., & Stocco, R. C. 2015. *Bos taurus* papillomavirus activity in peripheral blood mononuclear cells: Demonstrating a productive infection. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16712–16727. <https://doi.org/10.4238/2015.December.11.19>
32. Meza JJ, Montano LA, Aguayo GA., 2006. Molecular basis of cáncer. *rev. invest. Clín*, vol.58, n.1, pp. 56-70.
33. Modis, Y., Trus, B. L., & Harrison, S. C. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO Journal*, 21(18), 4754–4762. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf494>
34. Orozco, Narelle. Padilla, H. 2016. Facultad De Ciencia Animal. In Universidad Nacional Agraria Facultad De Ciencia Animal Departamento De Medicina Veterinaria.
35. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Muñoz Bernardo Rivera. (2014). *Kuby: inmunología*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
36. Pangty K., Singh S., Pandey A. & Somvanshi R. 2010. Preliminary binary ethylenimine (BEI) inactivated bovine papillomavirus (BPV) vaccine trial against cutaneous warts in bull calves: a pathological assessment. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 3(2), 105-110.
37. PaVE: Papilloma virus genome database. n.d.. Consultdo: March 10, 2019, Disponible en: https://pave.niaid.nih.gov/#search/search_database

38. Pinheiro, R. et al. 2017. Bovine papillomavirus productive infection in cell cultures: First evidences. *Virology: Research & Reviews*.12, 2514-4138. doi: 10.15761/VRR.1000110
39. Quail, D., & Joyce, J. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394.Microenvironmental>
40. Rodríguez, R., Cordero, L., Gutierrez, E., Castro, M., Chi, M., Navarro, R., & Castro, J. 2015. Papilomatosis bovina en el trópico mexicano: presentación clínica y control. *Bioagrocências*, 8(1), 45–52.
41. Rojas, E. Cantú, A., Morales, J., Loza, E. 2016. Detection and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus in cutaneous warts in cattle in Tamaulipas, Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 80, 262-268.
42. Saveria, Jarret, Grindlay, McGarvie. 2002. T-cell response to BPV-4 E7 during infection and mapping of T cell epitopes. *Virology*.
43. Schneider, M. A., Spoden, G. A., Florin, L., & Lambert, C. 2011. Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cellular Microbiology*, 13(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01515.x>
44. SIAP. 2019. Exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América 2019 (Cabezas) Consultado el 23/03/2019 URL: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/526514/Exportacion_de_ganado_bovino_octubre-diciembre_2019_1.pdf
45. Silva, M. A. R., Pontes, N. E., Da Silva, K. M. G., Guerra, M. M. P., & Freitas, A. C. 2011. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Animal Reproduction Science*, 129(3–4), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.11.005>
46. Silva, M. A. R., Silva, E. C. B., Gurgel, A. P. A. D., Nascimento, K. C. G., & Freitas, A. C. 2014. Bovine papillomavirus E2 and E5 gene expression in sperm cells of healthy bulls. *VirusDisease*, 25(1), 125–128. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0185-5>
47. Sousa R., Dostatni N., & Yaniv, M. 1990. Control of papillomavirus gene

- expresión. *Biochim Biophys Acta* 1032:19-37.
48. Torres, M., Sosa, O., Ortega, O., Lara, M., & Báez, M. 2016. Comparison of the Effects of Autovaccine, Autohemovacuna, and Combined Therapy in the Treatment of Bovine Papillomatosis. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 6(2), 36–41. <https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2016.06.02.36-41>
49. Touzé, A., Mahé, D., El Mehdaoui, S., Dupuy, C., Combita-Rojas, A. L., Bousarghin, L., ... Coursaget, P. 2000. The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00248-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00248-2)
50. Turk, N., Milas, Z. and Staresinal, V. 2005. Severe bovine papillomatosis: detection of bovine papilloma virus in tumor tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and parammunity inducer. *Vet. Arhiv*, 75: 391-397.
51. Urrutia, V., Gómez, R., De la Garza, M., Támez, P., Lucio, D., & Rodríguez, M. 2019. Immunoinformatics Approach to Design a Novel Epitope-Based Oral Vaccine Against *Helicobacter pylori*. *Journal of Computational Biology* Volume 26, Number 0. DOI: 10.1089/cmb.2019.0062.
52. Van Dyk E, Oosthuizen MC, Bosman AM, Nel, PJ, Zimmerman, D Venter EH. 2009. Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid- affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. *J. Virol. Meth.*, 158,141-151.
53. Venuti A., Paolini F., Nasir L., Corteggio A., Roperto S., Campo M. & Borzacchiello G. 2011. *Molecular CANCER* 10:140. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-140>
54. Wosiacki, S., Barreiro, M., Alfieri A., & Alfieri, A. 2005. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of Virology Methods*. DOI: 10.1016/j.viromet.2005.01.021.