

COMUNICACIÓN

Efectividad de la autovacuna en un caso de papilomavirus canino en un perro Gran Danés en Costa Rica

Effectiveness of an autovaccine in a case of canine papillomavirus in a Great Dane dog in Costa Rica

Ramsés Alfaro-Mora^{1,2,4}, Gaby Dolz^{1,3}

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la efectividad de una autovacuna para papilomas ocasionados por papilomavirus canino (CPV) en la región facial de un perro Gran Danés de tres meses. Se colectó un grupo de papilomas de la cara del paciente y se analizaron mediante técnicas moleculares (amplificación de un segmento del gen que codifica para la proteína L1 mediante PCR y secuenciación). Para el análisis de la secuencia se utilizó el algoritmo BLAST. El estudio histológico se realizó mediante tinción de hematoxilina-eosina del tejido y análisis en microscopio de luz a 20X. Se elaboró una autovacuna a partir de los papilomas escindidos, la cual fue administrada intradérmica en cuatro ocasiones a intervalos de siete días. Se estableció la presencia de CPV genotipo 1 en el papiloma analizado. La histopatología estableció formación de papilas epidérmicas exofíticas soportadas por un corion fibrovascular con hiperqueratosis (ortoqueratótica) e hiperplasia del estrato espinoso y con queratinocitos (coilocitos). Los papilomas desaparecieron después de la tercera aplicación de la autovacuna. Este es el primer reporte de CPV-1 en Costa Rica. La autovacuna mostró ser un tratamiento eficaz en el manejo de papilomatosis facial en el paciente.

Palabras clave: genotipo, secuenciación, papilomavirus, patología, autovacuna. PCR, hiperqueratosis

¹ Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Latina de Costa Rica, San José, Costa Rica

³ Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

⁴ E-mail: ramses.alfaro@ulatina.net

Recibido: 22 de abril de 2021

Aceptado para publicación: 14 de diciembre de 2021

Publicado: 25 de febrero de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effectiveness of an autovaccine for papilloma caused by canine papillomavirus (CPV) in the facial region in a three-month-old Great Dane dog. A group of papillomas were collected from the patient's face and analyzed using molecular techniques (amplification of a segment of the gene that codes for the L1 protein by PCR and sequencing). For sequence analysis, the BLAST algorithm was used. The histological study was performed by hematoxylin-eosin staining of the tissue and analysis under a 20X light microscope. An autovaccine was developed from the excised papillomas, which was administered intradermally on four occasions at seven-day intervals. The presence of genotype 1 CPV was established in the papilloma analyzed. Histopathology established the formation of exophytic epidermal papillae supported by a fibrovascular chorion with hyperkeratosis (orthokeratotic) and hyperplasia of the *stratum spinosum* and with keratinocytes (koilocytes). The papillomas disappeared after the third application of the autovaccine. This is the first CPV-1 report in Costa Rica. The autovaccine proved to be an effective treatment in the management of facial papillomatosis in the patient.

Key words: genotype, sequencing, papillomavirus, pathology, autovaccine, PCR, hyperkeratosis

INTRODUCCIÓN

La papilomatosis canina es una neoplasia benigna en la piel o membranas mucosas que se presentan sobre todo en perros menores de dos años y es ocasionada por el papilomavirus canino (CPV, por sus siglas en inglés) (Ji-Young *et al.*, 2010). Se reconocen cinco clases de lesiones: papilomatosis oral múltiple en perros jóvenes (COPV, *canine oral papillomavirus*), papilomatosis oral solitaria o múltiple en perros de cualquier edad, papilomatosis venérea, papilomatosis ocular (escleropalpebral) y fibropapilomatosis (Carmona *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2012). La secuencia del gen de la proteína estructural L1 del papilomavirus oral canino fue la primera en ser publicada en 1994 (Yuan *et al.*, 2007) y desde entonces se han encontrado 23 genotipos de CPV (de Alcántara *et al.*, 2014).

El tratamiento en caninos es inespecífico, recurriéndose muchas veces a inoculación de sangre del animal para estimular la

respuesta inmunológica, así como a la cirugía o criocirugía para eliminarlos. Además, existen tratamientos farmacológicos con agentes antineoplásicos (ciclofosfamida, vincristina, bleomicina), inmunoestimulantes (acemanano e interferón α) e incluso cimetidina (Carmona, 2002; Ramírez *et al.*, 2012; Fantini *et al.*, 2015). Asimismo, se reporta el uso de la autovacuna, pero con resultados controversiales (Kuntsi-Vaattovaara *et al.*, 2003; Ñumbay *et al.*, 2016).

En Costa Rica no se han realizado estudios para determinar y caracterizar los genotipos presentes en los papilomas de los caninos. Al no reportarse tratamientos específicos para tratar la aparición de papilomas en perros, la aplicación de una autovacuna se ve como una posible opción sanitaria viable y económica para el manejo de esta condición. El objetivo del presente estudio fue determinar la efectividad de una autovacuna para tratar papilomas asociados a CPV en un perro de raza Gran Danés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se obtuvo un grupo de siete papilomas faciales pequeños de un perro Gran Danés macho, de tres meses de edad, que vivía en Hojancha, Guanacaste, pero que había ingresado a Costa Rica procedente de México D.F. al mes de edad. El animal fue atendido a través de visita domiciliar. Las lesiones se presentaron en la cara del animal, sugiriendo una papilomatosis oral múltiple (Figura 1). Los papilomas se recuperaron de ambas partes del rostro del animal realizando cortes superficiales de 0.5-1 cm de longitud, que coinciden con el tamaño de las lesiones extraídas. Una parte de los papilomas se conservó en alcohol 70%, otra parte se mantuvo en formaldehído al 10% y la mayor parte se mantuvo en congelación para fabricar la autovacuna.

Extracción, Amplificación y Secuenciación del ADN

La muestra conservada en etanol se usó para la extracción de ADN siguiendo las especificaciones del DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Alemania). Mediante la técnica de PCR se amplificó una región conservada de 478 pb del gen que codifica para la proteína estructural L1, usando los cebadores FAP59/FAP64 (5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'/5'-CWATATCWVHCATITCICCATC-3'). La reacción de PCR se realizó con DreamTaq Master Mix 1X (Thermo Scientific, USA), 0.25 µM de cada cebador, 1.25 µl de ADN (100 ng/µl) y agua libre de nucleasas (Thermo Scientific, USA) en un volumen de 25 µl. Las condiciones para la amplificación fueron una desnaturalización inicial a 94 °C de 10 min, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 90 s, hibridación a 50 °C por 90 s, extensión a 72 °C por 90 s; y una extensión final a 72 °C de 5 min (Alfaro-Mora *et al.*, 2021).

Los productos del PCR se visualizaron mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Thermo Scientific, USA). El producto de PCR se envió a secuenciar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur). La edición de la secuencia se realizó con el software Bioedit 7.2.5. Posteriormente se comparó con las secuencias de la base de datos del GenBank (BLASTn). También se construyó un árbol filogenético con la secuencia obtenida y con las secuencias reportadas de los 20 genotipos existentes utilizando el software MEGA7.

El árbol filogenético fue elaborado por el método de máxima verosimilitud, utilizando el método del modelo Tamura-3-parameter, con soporte de Bootstrap para 1000 réplicas a partir del producto de PCR para el gen L1 de 449pb obtenido del CPV-1 encontrado en Costa Rica. Los números de acceso del GenBank usados como referencia para la creación del árbol filogenético fueron CPV-1 (KX587461.1), CPV-2 (LC363559.1), CPV-3 (DQ295066.1), CPV-4 (EF584537.1), CPV-5 (FJ492743.1), CPV-6 (FJ492744.1), CPV-7 (FJ492742.1), CPV-8 (HQ262536.1), CPV-9 (JF800656.1), CPV-10 (JF800657.1), CPV-11 (JF800658.1), CPV-12 (JQ754321.1), CPV-13 (JX141478.1), CPV-14 (JQ7018-02.1), CPV-15 (JX899359.1), CPV-16 (KP099966.1), CPV-17 (KT272399.1), CPV-18 (KT3269-19.1), CPV-19 (KX599-536.1), CPV-20 (KT901797.1), CPV-21 (NC_040578.1), CPV-22 (NC_040579.1), CPV-23 (MH285954.1) y BPV-1 (X02346.1).

Análisis Morfológico e Histológico

Se fotografiaron las lesiones y se describieron desde un punto de vista macroscópico. La muestra conservada en formaldehído se sometió a tinción con hematoxilina-eosina y se analizó en microscopio de luz 20X (Martens *et al.*, 2000).



Figura 1. Papilomas nodulares exofíticos de tipo coliflor en la cara de un perro Gran Danés de tres meses. A. Vista lateral. B. Vista frontal. Costa Rica (2018)

Elaboración de la Autovacuna

Se preparó con un grupo de papilomas pequeños que fueron triturados y macerados en solución salina 0.9%, llegando a constituir el 10% p/v de la solución final preparada. El producto fue centrifugado a 2000 rpm durante 1 min. El sobrenadante fue filtrado y se mantuvo en contacto por 24h entre 2-8 °C con un volumen de formaldehído cuya concentración final fue de 0.3%. Se realizaron pruebas de esterilidad en medios de Tioglicolato y Saboraud. La vacuna estéril se aplicó cuatro veces vía subcutánea con intervalos de 7 días, iniciando con 0.5 ml y continuando con tres aplicaciones de 1 ml, partiendo de una modificación del protocolo propuesto por Aydin *et al.*, (2020).

RESULTADOS

La secuencia de la proteína estructural L1 amplificada de la muestra del papiloma-

(número de acceso GenBank MT177270) resultó ser 100% (449/449pb) similar con una secuencia de CPV-1 aislada de un papiloma de un Husky Siberiano en Sur África (número de acceso GenBank KX587461.1). El árbol filogenético reveló un 100% de identidad con el CPV-1 (Figura 2).

El papiloma se clasificó como papilomatosis oral múltiple en perros jóvenes de acuerdo con sus características morfológicas e histológicas. El estudio histopatológico determinó proliferación papilar, hiperplasia epidermal exofítica e hiperplasia (con hiperqueratosis ortoqueratótica del estrato queratinizado) e hiperplasia del estrato espinoso en algunas áreas de la lesión, mostrando queratinocitos con citoplasmas claros, hinchados, vacuolados con núcleos picnóticos (coilocitos). Se visualiza gránulos de queratohialina a nivel del estrato granuloso. No se reconocieron cuerpos de inclusión intranucleares. Estas papilas son soportadas por un corion fibrovascular central (Figura 3).

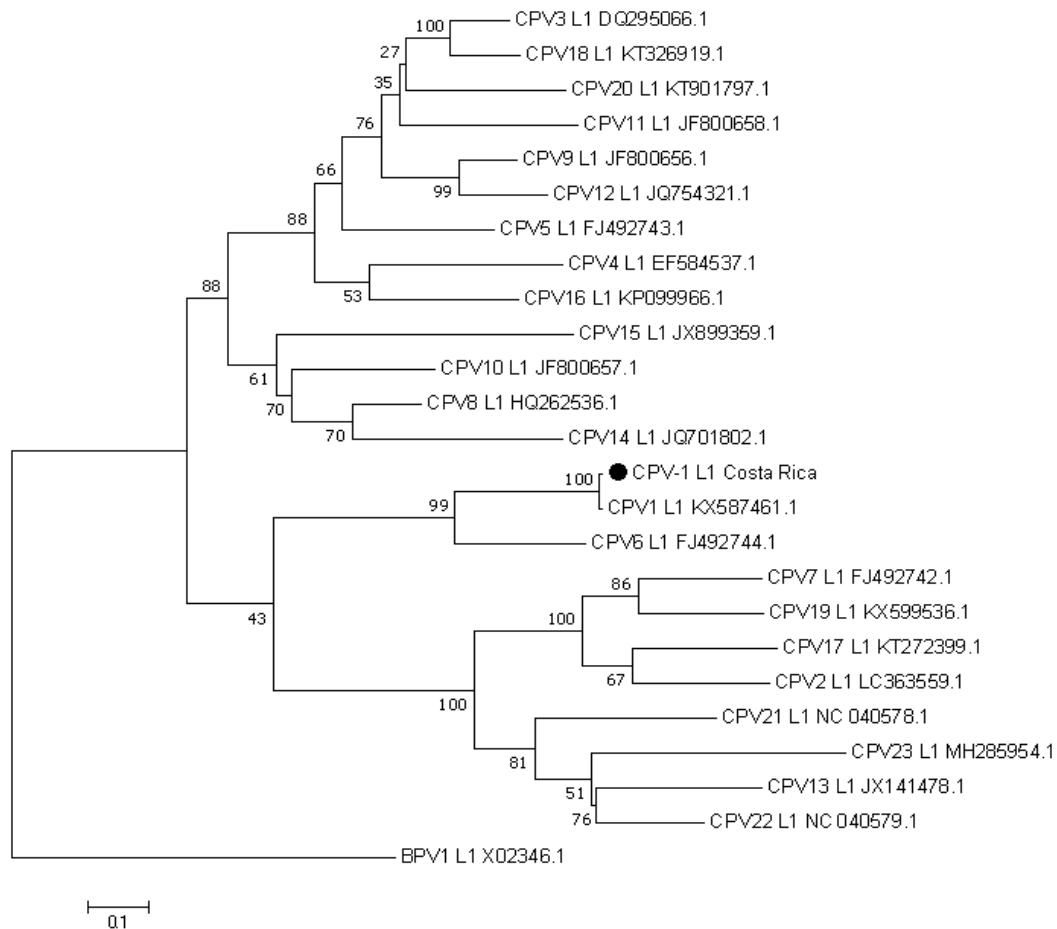


Figura 2. Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud, utilizando el método del modelo Tamura-3-parameter, con soporte de Bootstrap para 1000 réplicas a partir de productos de PCR para el gen L1 de CPV-1 encontrados en Costa Rica

El perro en el día de la aplicación de la tercera dosis vacunal (tres semanas después de la visita al centro hospitalario [Figura 1]) no presentó evidencias de papilomatosis (Figura 4).

DISCUSIÓN

Se reporta por primera vez en Costa Rica la presencia del CPV genotipo 1, el cual se denominó originalmente como papilomavirus oral canino (COPV) por su predisposición a ocasionar papilomas en las mem-

branas de la mucosa oral y zonas peludas en los perros, que en este caso clínico mostró una distribución preferente por la cara del animal en su forma múltiple, concordando con la clasificación existente de papilomatosis oral múltiple en perros jóvenes reportada en la literatura (Bianchi *et al.*, 2012; De Alcântara *et al.*, 2014). La presencia de CPV-1 ha sido reportada en Brasil, Italia, Japón, China y Corea (Isegawa *et al.*, 1994; Jun *et al.*, 2010; Ji-Young *et al.*, 2010; De Alcântara *et al.*, 2014; Porcellato *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2020).

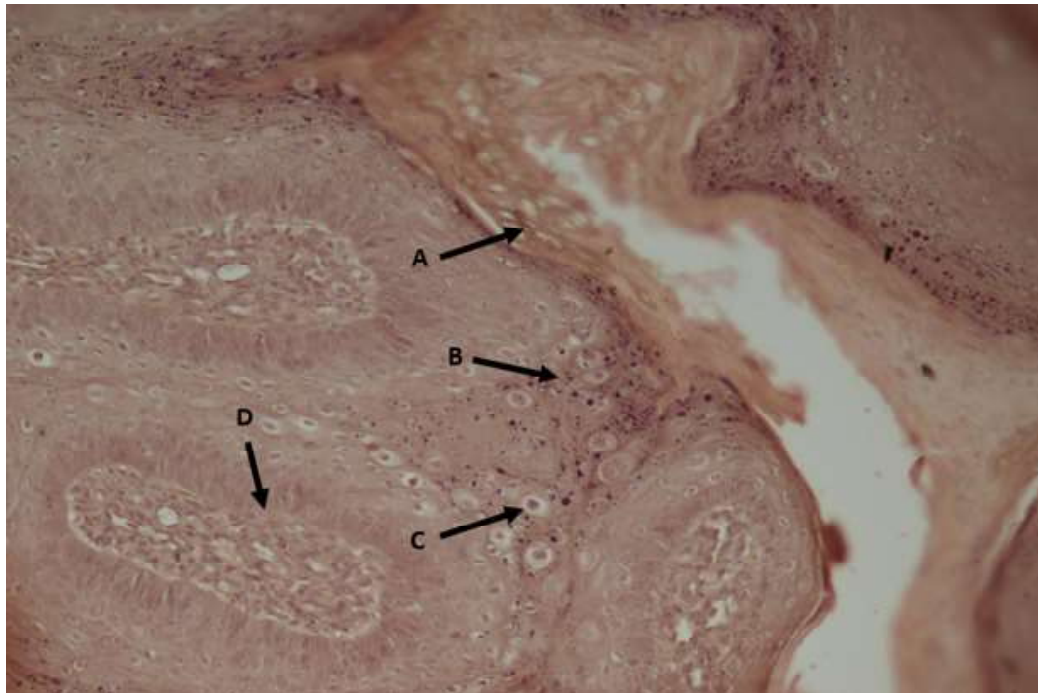


Figura 3. Histopatología del papiloma canino con papilas exofíticas (en forma de coliflor) colectado de la cara de un perro Gran Danés de tres meses. Se observa (A) Hiperqueratosis (ortoqueratótica) (B) Proliferación exofítica del epitelio escamoso con hiperplasia de la capa espinosa (C) Queratinocitos (coilocitos) (D) Corion fibrovascular. HE, 20X



Figura 4. Paciente canino Gran Danés de tres meses con regeneración epitelial y recuperación de papilomatosis facial a la tercera dosis de una autovacuna. Costa Rica (2018)

La caracterización macroscópica, así como el análisis histopatológico permitieron clasificar la lesión como papiloma oral múltiple, describiéndose a partir de alteraciones citoplasmáticas que llevan a efectos citopáticos (Gross *et al.*, 2005). Fue visible una alta proliferación epitelial con un evidente engrosamiento del estrato córneo. La aparición de células agrandadas con núcleos picnóticos rodeados de citoplasma claro (coilocitos), y a pesar de que no se encontraron las inclusiones intranucleares eosinofílicas, podría inferirse la presencia de papilomavirus en el tejido (Lange y Favrot, 2011).

La autovacuna parece una terapia prometedor, al lograr la regresión de los papilomas en 21 días. Esta terapia ha sido descrita principalmente para papilomas bovinos, donde se reporta una efectividad superior al 70% de los animales tratados (Sadasiya *et al.*, 2000) y una regresión en 40 días (Peña *et al.*, 2005; Numbay *et al.*, 2016). En perros existen pocos reportes sobre el uso de autovacuna en el manejo de CPV, y con un número bajo de sujetos de estudio, destacando los reportes de Suzich *et al.* (1995), donde se utiliza un extracto de papiloma inactivado con formalina para la prevención de COPV en Beagles a través de la infección experimental y natural, pero no su uso como tratamiento, y el de Agut *et al.* (1996) donde se reporta una efectividad de 100% para la autovacuna en nueve casos.

Kuntsi-Vaattovaara *et al.* (2003) reportan la aplicación de una vacuna recombinante con la proteína L1 en una hembra Husky Siberiano de 16 meses, aplicada luego de una intervención quirúrgica con láser, eliminando los papilomas a lo largo de 15 semanas, sin presentarse reaparición de hasta 60 semanas posterior a la intervención.

Las autovacunas a partir de macerados de papilomas buscan inducir la producción de anticuerpos contra las proteínas virales (específicamente L1); sin embargo, solo funcionarán en papilomas ocasionados por el

genotipo de papilomavirus presente en la autovacuna, y dependiendo de la función inmune del paciente, de la forma en que se recolectaron los papilomas, la forma en que se preparó la vacuna, el calendario de administración y la etapa de desarrollo que en que se encuentren los papilomas (Ranjan *et al.*, 2013). En el presente caso, la autovacuna a partir del macerado e inactivación con formalina de lesiones de papiloma se presentó como una opción viable de tratamiento. Sin embargo, se recomienda realizar estudios más amplios para determinar si existen otros genotipos de CPV presentes en la papilomatosis oral canina (múltiple o solitaria) y confirmar la efectividad del tratamiento con un mayor número de casos caninos.

LITERATURA CITADA

1. **Agut M, Bayo M, Larrondo J, Calvo MA. 1996.** Autovaccination as a treatment in canine papillomavirus dermatological disease: a study of nine cases. *Biomed Lett* 54: 23-26.
2. **Alfaro-Mora R, Castro-Vásquez R, Rodríguez J, Dolz G. 2021.** Papiloma bovino tipo 2 en un sarcoide equino en Costa Rica. *Rev MVZ Córdoba* 26: e2040. doi: 10.21897/rmvz.2040
3. **Aydin H, Gelen V, Engül E, Yildirim S. 2020.** Immunological effects of autogenous vaccine administration in cattle with cutaneous papillomatosis. *Acta Vet Eurasia* 46: 98-103. doi: 10.5152/actavet.2020.20002
4. **Bianchi M, Casagrande R, Watanabe T, Wouters A, Wouters F, Boos G, Menegat M, Driemeier D. 2012.** Canine papillomatosis: a retrospective study of 24 cases (2001-2011) and immunohistochemical characterization. *Pesq Vet Bras* 32: 653-657. doi: 10.1590/S0100-736X2012000700012
5. **Carmona J, Giraldo C, Laiza M. 2002.** Tratamiento de papilomatosis oral canina con cimetidina: ¿una nueva alternativa? *Med Vet* 20: 5-10.

6. **Chang C, Chen W, Haga T, Yamashita N, Lee C, Tzuzuki M, Chang H. 2020.** The detection and association of canine papillomavirus with benign and malignant skin lesions in dogs. *Viruses* 12: 170. doi: 10.3390/v12020170
7. **De Alcântara B, Alfieri A, Rodrigues W, Otonel R, Lunardi M, Headley S, Alfieri A. 2014.** Identification of canine papillomavirus type 1 (CPV1) DNA in dogs with cutaneous papillomatosis. *Pesq Vet Bras* 34: 1223-1226. doi: 10.1590/S0100-736X2014001200013
8. **Fantini O, Videmont E, Pin D. 2015.** Successful treatment of florid papillomatosis in dog using subcutaneous feline recombinant interferon- ω . *Revue Méd Vét* 166: 25-29.
9. **Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. 2005.** Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. 2nd ed. Oxford: Blackwell. 932 p.
10. **Isegawa N, Nakono K, Ohta M, Shirasawa H, Tokita H, Simizu B. 1994.** Cloning and sequencing of the L1 gene of canine oral papillomavirus. *Gene* 146: 261-265. doi: 10.1016/0378-1119(94)90303-4
11. **Ji-Young Y, Byung-Joon K, Jong-Hyuk K, Chi-Ho Y, Keum-Soon I, Sung-Seok L, Young-Soo L, et al. 2010.** Characterization of canine oral papillomavirus by histopathological and genetic analysis in Korea. *J Vet Sci* 11: 21-25. doi: 10.4142/jvs.2010.11.1.21
12. **Jun D, Yi G, Na T, Yipeng J, Rui Z, Degui L, Guozhong Z. 2010.** Canine oral papillomavirus infection: clinical course, pathology, L1 gene and NCR2 gene sequencing. *Israel J Vet Med* 65: 111-116.
13. **Kuntsi-Vaattovaara H, Verstraete F, Newsome J, Yuan H. 2003.** Resolution of persistent oral papillomatosis in a dog after treatment with a recombinant canine oral papillomavirus vaccine. *Vet Comp Oncol* 1: 57-63. doi: 10.1046/j.1476-5829.2003.00005.x
14. **Lange C, Favrot C. 2012.** Canine papillomaviruses. *Vet Clin Small Anim* 41: 1183-1195. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.08.003
15. **Martens A, De Moor A, Demeulemeester J, Ducatelle R. 2000.** Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoide. *Res Vet Sci* 69: 295-300. doi: 10.1053/rvsc.2000.0432
16. **Ñumbay T, Fernández S, Pérez O, Nuñez L, Escalante B, Castro G. 2016.** Comparación de los efectos de la autovacuna, la autohemovacuna, y la terapia combinada en el tratamiento de la papilomatosis bovina. *Compend Cienc Vet* 6: 36-41. doi: 10.18004/compend.cienc.-vet.2016.06.02.36-41
17. **Porcellato I, Brachelente C, Guelfi G, Reginato A, Sforza M, Bongiovanni L, Mechelli L. 2014.** A retrospective investigation on canine papillomavirus 1 (CPV1) in oral oncogenesis reveals dogs are not a suitable animal model for high risk HPV-induced oral cancer. *Plos One* 9: e112833. doi: 10.1371/journal.pone.0112833
18. **Ramírez Y, Rodríguez Y, Góngora Y, Reyes I. 2012.** Papiloma oral canino en perro mestizo y su respuesta a la quimioterapia citostática. *REDVET* 13(8).
19. **Ranjan R, Ghumman S, Bhatt G, Singh R. 2013.** Efficacy of autogenous vaccine and auto-hemotherapy in bovine cutaneous papillomatosis. *Intas Polivet* 14: 411-414.
20. **Sadasiva R, Babu K, Solmn K. 2000.** Efficacy of autogenous vaccine in cutaneous papillomatosis of Ongole heifers. *Indian J Animal Res* 34: 82-83.
21. **Suzich J, Ghim S, Palmer-Hill F, White W, Tamura J, Bell J, Newsome J, et al. 1995.** Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Nat Acad Sci* 92: 11553-11557. doi: 10.1073/pnas.92.25.11553
22. **Yuan H, Ghim S, Newsome J, Apolinario T, Olcese V, Martín M, Delius H, et al. 2007.** An epidermotropic canine papillomavirus with malignant potential contains an E5 gen and establishes a unique genus. *Virology* 359: 28-36. doi: 10.1016/j.virol.2006.08.029