

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Variabilidad genética del Virus del Papiloma Humano tipos
16, 58 y 52 en mujeres Chachi y afroecuatorianas en el
norte del Ecuador
Proyecto de Investigación**

Carolina Elizabeth Armijos Fierro

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 31 de agosto de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Variabilidad genética tipos 16, 58 y 52 del Virus del Papiloma Humano en
mujeres Chachi y afroecuatorianas en el norte del Ecuador**

Carolina Elizabeth Armijos Fierro

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María Lorena Mejía, Ph.D.(c)

Firma del profesor:

Quito, 31 de agosto de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Carolina Elizabeth Armijos Fierro

Código: 00109008

Cédula de Identidad: 0603560822

Lugar y fecha: Quito, 31 de agosto de 2017

DEDICATORIA

A Marcela, Leonor, Ximena, Manuel y a todos mis amigos por el apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología por el apoyo que recibí a lo largo de esta investigación.

A Estefanía Espinosa por el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto.

A mi profesora, María Lorena Mejía, por permitirme ser parte de este trabajo y por su constante apoyo.

A mi familia y amigos por haberme acompañado a lo largo de mi carrera.

RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el virus de transmisión sexual más común en todo el mundo y su presencia está directamente asociada con un alto riesgo de desarrollar cáncer de cérvix, ano, vagina, vulva, pene y orofaringe. El presente trabajo es el primer estudio del Ecuador en el que se realizó un análisis molecular de la región MY09/MY11 para encontrar los linajes, posibles sublinajes y polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de los genotipos VPH16, 58 y 52 en mujeres de etnia Chachi y afroecuatoriana de la costa norte del país, empleando 47 muestras de raspados cervicales. Un 30% de las 47 muestras mostraron amplificación positiva para el gen L1 de VPH y un 21% para los genotipos de interés. Las secuencias positivas para VPH16 pertenecieron al linaje menos cancerígeno o Europeo (E). Una de las secuencias positivas para VPH58, se agrupó en el sublinaje A2, mientras que la otra muestra correspondiente a este genotipo, manifestó un SNP característico. La única secuencia positiva para VPH52 mostró relación con el linaje A. No se encontró ningún SNP asociado a algún cambio en la proteína L1 que genere una posible persistencia y mayor patogenicidad por parte del virus. Los resultados sugieren una posible relación entre la zona geográfica (territorio ecuatoriano) con las variantes que infectan tanto a mujeres Chachi, afroecuatorianas y mestizas. Aquello se debe a que las variantes encontradas en las mujeres indígenas Chachi y afroecuatorianas podrían ser las mismas de aquellas presentes en la población femenina mestiza (resultados de otro estudio). No obstante, debido a la baja eficiencia de recuperación de secuencias para todos los genotipos estudiados, más investigación es necesaria para determinar que en realidad existen las mismas variantes de los distintos tipos de VPH16, 58 y 52 infectando a mujeres de distintas etnias.

Palabras clave: Virus del Papiloma Humano (VPH), linaje, sublinaje, variante, polimorfismo de nucleótido simple (SNP), filogeografía, gen viral *L1*.

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted virus worldwide and its presence is directly associated with a high risk of developing cervix, anus, vagina, vulva, penis and oropharyngeal cancer. The present work is the first Ecuadorian study in which a molecular analysis of the MY09/MY11 region was carried out to find the lineages, possible sublineages and simple nucleotide polymorphisms (SNPs) of HPV genotypes 16, 58 and 52 in Chachi and Afro-Ecuadorian women from the north coast of the country, using 47 samples of cervical scrapes. Only a 30% of the 47 samples showed positive amplification for gene L1 from HPV and 21% were positives for the genotypes of interest. Positive sequences for HPV16 belonged to the European lineage (E), while, the HPV58-positive sequences were pooled into the A2 sublineage. In contrast, the single positive sequence for VPH52 fitted into the A lineage. No SNP was found associated with a change in L1 protein that generated a possible persistence and increased pathogenicity of the virus. These results suggest a possible relationship between the geographical zone (Ecuadorian territory) with the variants that infect Chachi, Afro-Ecuadorian and the admixed women population of the country. This could be because the variants found in Chachi and Afro-Ecuadorian women could be the same as those found in the admixed female population (results from another study). However, due to the low efficiency of sequence recovery for all genotypes studied, more research is needed to determine if, in fact, the same variants of the different types of HPV16, 58 and 52 are infecting women with different ethnicity.

Key words: Human papillomavirus (HPV), lineage, sublineage, variant, single nucleotide polymorphism (SNP), phylogeography, *L1* viral gene.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Generalidades del Virus del Papiloma Humano	13
1.1.1 Biología del virus.....	13
1.2.1 Tipos del VPH y sus variantes	16
1.3. Epidemiología	18
1.3.1 Epidemiología de los tipos y variantes del VPH	18
1.3.2 Epidemiología de tipos y variantes del VPH en el Ecuador	20
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo General.....	21
2.2 Objetivos Específicos	22
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. ÁREA DE ESTUDIO	23
5. MATERIALES	23
5.1 Muestras.....	23
5.2 Amplificación de la región MY09/MY11 del gen <i>L1</i> para análisis de variantes de los tipos VPH16, 58 y 52	23
5.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar y extraer el producto amplificado de la región <i>L1</i> del virus del VPH16, 58 y 52.....	24
5.3.1 Extracción de banda de gel de agarosa al 1.5% del fragmento del gen <i>L1</i> viral amplificado	25
5.4 Secuenciamiento de ADN, edición de los fragmentos de región MY09/MY11 del gen <i>L1</i> de la cápside viral y creación de árboles filogenéticos y búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple	26
6. MÉTODOS	26
6.1 Obtención de las muestras.....	26
6.2 Amplificación de la región MY09/MY11 del gen <i>L1</i> para análisis de variantes de los tipos VPH16, 58 y 52	26
6.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	27
6.4.1 Edición de las secuencias y creación de árboles filogenéticos de los genotipod VPH16, 58 y 52 para la identificación de variantes y búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs).....	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Amplificación de región MY09/MY11 del gen <i>L1</i> para análisis de variantes de los genotipos VPH16, 58 y 52.....	30
7.2 Secuenciamiento del amplicón de región MY09/MY11 del gen <i>L1</i> , edición de las secuencias y creación de árboles filogenéticos de los VPH16, 58 y 52 para la identificación de variantes	30
7.2.1 Secuenciamiento del amplicón región MY09/MY11 del gen viral <i>L1</i>	30
7.2.2 Análisis filogenético de los genotipos VPH16, 58 y 52.....	31
8. DISCUSIÓN	33
8.1 Amplificación de la región MY09/MY11 del gen <i>L1</i> de los VPH16, 58 y 52.....	33
8.2 Análisis filogenético de VPH16, 58 y 52	34
8.2.1 Análisis de genotipos de VPH	34

8.2.2 Linajes y sublinajes de VPH.....	36
8.2.2.1 Linajes y sublinajes de VPH16	37
8.2.2.2 Linajes y sublinajes de VPH58	39
8.2.2.3 Linajes y sublinajes de VPH52	41
8.2.3 Búsqueda de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs)	43
8.3 Limitaciones del estudio	45
9. CONCLUSIONES	46
10. RECOMENDACIONES	48
11. BIBLIOGRAFÍA	50
12. ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1:** Listado de las 10 muestras correspondientes a monoinfecciones de los tipos de virus de VPH más prevalentes en Ecuador (VHP16, 58 y 52), en donde se especifica el código en la base de datos, la etnia, la localidad y la conformación del genotipo de VPH luego de una secuenciación de cada muestra. 61
- Tabla 2:** Análisis de polimorfismo de nucleótido simple para las secuencias correspondientes a al genotipo de VPH 58. 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución genética del VPH (Bernard, 2013).....	54
Figura 2: Árbol filogenético de 118 secuencias de VPHs a partir de secuencias de la región del gen L1 (Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zurHausen, 2004).	55
Figura 3: Relaciones filogenéticas de las variantes del virus del VPH16 realizado por Chiesa et al., (2015).	55
Figura 4: Relaciones filogenéticas de las variantes del virus del VPH58 realizado por Chiesa et al., (2015).	56
Figura 5: Relaciones filogenéticas de las variantes del virus del VPH52 realizado por Chen et al. (2011).	56
Figura 6: Resultado de la visualización de amplicones del gen L1 de 450 pares de bases en gel de agarosa al 1.5% de 4 muestras (9BD, 78BD, 251BD y 185BD) así como el control positivo (C+) y negativo (C-).	57
Figura 7: Resultado de la visualización de amplicones purificados a partir de extracción de banda de gel de agarosa del gen L1 de 450 pares de bases en gel de agarosa al 1.5%	57
Figura 8: Tabla resumen sobre las 7 secuencias positivas para VPH16, donde se indican las secuencias, el número de pares de bases, porcentaje de cobertura e identidad de cada una de las muestras.	58
Figura 9: Tabla resumen sobre las 2 secuencias positivas para VPH58, en donde se indican las secuencias, el número de pares de bases, porcentaje de cobertura e identidad de cada una de las muestras.	59
Figura 10: Tabla resumen sobre la secuencia positiva para VPH52, en donde se indican la secuencia, el número de pares de bases, porcentaje de cobertura e identidad de la misma.....	60
Figura 11: Resultado del análisis filogenético de <i>Maximum Likelihood</i> de las variantes de VPH16 con un promedio de 360 pares de bases, empleando un modelo de Tamura 92 por 100 replicaciones. Las secuencias de referencia para la creación del árbol extraídas del GenBank se encuentran mencionadas junto con su respectivo código en las etiquetas de las ramas correspondiente a cada variante. Las muestras pertenecientes a este estudio, por otro lado, se encuentran denotadas con la etnia y el origen de cada muestra. La secuencia de referencia NC001526 corresponde a la variante A1, mientras que las secuencias con denominación (KP794·) pertenecen a las variantes encontradas por Mejía et al. (2015) para este genotipo.	61
Figura 12: Resultado del análisis filogenético de <i>Maximum Likelihood</i> de las variantes de VPH1658 con un promedio de 360 pares de bases, empleando un modelo de Tamura 92 por 100 replicaciones. Las secuencias de referencia para la creación del árbol extraídas del GenBank se encuentran mencionadas junto con su respectivo código en las etiquetas de las ramas correspondiente a cada variante. Las muestras pertenecientes a este estudio, por otro lado, se encuentran denotadas con la etnia y el origen de cada muestra. Las secuencias (KP7949·) pertenecen a las variantes encontradas por Mejía et al. (2015) para este genotipo.	62

Figura 13: Resultado del análisis filogenético de *Maximum Likelihood* de las variantes de VPH52 con 439 pares de bases, empleando un modelo de Tamura 92 por 100 replicaciones. Las secuencias de referencia para la creación del árbol extraídas del GenBank se encuentran mencionadas junto con su respectivo código en las etiquetas de las ramas correspondiente a cada variante. Las muestras pertenecientes a este estudio, por otro lado, se encuentran denotadas con la etnia y el origen de cada muestra. 63

Figura 14: Estructura molecular de una proteína mayor L1 de la cápside icosaédrica del virus del VPH (Sun, et al., 2012). 63

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Virus del Papiloma Humano

1.1.1 *Biología del virus*

El virus del papiloma humano o VPH pertenece a un grupo de virus ubicuos de 55 nm de diámetro, que son capaces de infectar la piel y la mucosa de hombres y mujeres. Se transmiten principalmente por contacto físico directo, causando una infección que puede resultar en un espectro de manifestaciones que van desde infecciones transitorias, presencia de verrugas genitales o papilomas y desarrollo de distintos tipos de cáncer, como de cérvix (casi 100% de los casos), vulva (50%), vagina (65%), pene (35%), ano (95%) y orofarínge (70%) (NIH, 2015). No obstante, el cáncer de cuello uterino, es quizás, el más relevante porque ha sido uno de los cánceres asociados al VPH más estudiados (Stratton & Culking, 2016).

A pesar de que el VPH es el virus de transmisión sexual más común, en la mayoría de los casos, su infección es transitoria y asintomática. Pues, se conoce que al menos un 70% de las infecciones se resuelven en 1 año y alrededor del 90% se disipan en 2-5 años (World Health Organization, 2016). Como consecuencia, en la mayoría de los casos, la infección del virus es eliminada sin tratamiento e incluso, sin ser detectada (Steben & Duarte-Franco, 2007). Al contrario, puede tomar entre 10 a 30 años para que aquellas infecciones persistentes por VPH puedan llegar a desarrollarse en cáncer (NIH, 2015).

No se entiende completamente la razón por la que las infecciones por VPH se resuelven en ciertos individuos y dan lugar a lesiones más graves en otros, pero se sabe que la susceptibilidad genética individual (que causa un fallo del sistema inmune para controlar y eliminar la infección), inicio de vida sexual a una edad temprana, un mayor número de parejas y la presencia de algunos cofactores como: el tabaquismo, la infección persistente (infecciones que persisten por más de dos años) de VPH, el tipo de VPH y su variante, la carga viral y el consumo de alcohol; son los que, eventualmente, podrían llevar a desarrollar cáncer (Steben & Duarte-Franco, 2007).

Estos virus tienen un genoma de ADN circular de doble hélice de aproximadamente 8000 pares de bases (pb), que comprende ocho proteínas virales y una región de control o LCR, que es un segmento de aproximadamente 850 pb que no tiene función de codificación de proteínas pero posee el origen de replicación del virus, múltiples sitios de unión de factores de transcripción que son importantes en la regulación de la ARN polimerasa II y regiones promotoras (Figura 1) (Zheng & Baker, 2006). Por otro lado, el genoma del VPH contiene una zona de codificación temprana (Figura 1) conformada por los genes: E1, E2, E4, E5, E6 y E7, los cuales codifican para las funciones virales básicas. Específicamente, los genes E5, E6 y E7 son oncogenes de gran relevancia porque están vinculados a la transformación celular descontrolada (Cullen, et al., 2015).

Además, dentro del genoma del virus también se encuentran los genes tardíos L1 y L2 (Figura 1), que codifican para las proteínas de la cápside icosaédrica viral al final de la replicación (Cullen, et al., 2015). Concretamente, la proteína L1 es empleada

como antígeno en la fabricación de las vacunas en contra del VPH a nivel mundial. Actualmente, existen 3 tipos de vacunas distintas: 1) la vacuna bivalente o también conocida como Cervarix, protege contra los serotipos de virus VPH 16 y 18, 2) la vacuna tetravalente o Gardasil-4, protege contra los serotipos de VPH 6, 11, 16 y 18 y 3) la vacuna nonavalente o Gardasil-9, la cual protege contra 9 serotipos: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (Markowitz, et al., 2014).

1.2 Taxonomía y Filogenia

Aquella combinación única de propiedades genómicas, han hecho que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) clasifique al Virus del Papiloma Humano dentro de la familia Papillomaviridae y, por tanto, es considerado un papilomavirus (PV) (Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zurHausen, 2004).

Interesantemente, una parte importante de la diversificación evolutiva de los PVs se produjo a través de la baja tasa de mutación y a los mecanismos moleculares que los restringió a sus especies huésped. En otras palabras, se cree que la replicación especie-específica de estos pequeños virus de ADN, está vinculada con los procesos moleculares de la especiación del huésped debido a la unión de las proteínas virales tempranas (E6/7) con la proteína reguladora p53, al complejo de DNA polimerasa-primasa y a la proteína Rb (Shadan & Villarreal, 1993).

Dentro de esta gran familia, se han descrito aproximadamente 30 géneros de PVs con aproximadamente 189 tipos de virus (Figura 2), que no solo infectan a

humanos, sino también a aves, reptiles y otros mamíferos, puesto que, estos presentan una evolución vinculada al hospedador (Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zurHausen, 2004). Y, de todos estos, aquel que resulta de relevancia para el ser humano, es el de los Alfa-papilomavirus porque está constituido tanto por las especies carcinogénicas o de “alto riesgo” (HR de *high risk* en inglés) y de “bajo riesgo” (LR de *low risk* en inglés) de desarrollar los distintos tipos de cáncer (Burk, Harari, & Chen, 2013).

Así, este género está conformado por 13 especies de VPH: Alfa-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -13 y -15, de las cuales, las especies -5, -6, -7 y -9 son las que contienen a los tipos de VPH que se transmiten por contacto sexual y que están relacionados con un riesgo elevado de desarrollar pre-cáncer o neoplasia intraepitelial (Figura 2) (Schiffman, et al., 2016). Al contrario, la especie 10 dentro del mismo género, incluye a los tipos de VPH de bajo riesgo 6 y 11 cuya infección se asocia con el desarrollo de verrugas (Burk, Harari, & Chen, 2013).

1.2.1 Tipos del VPH y sus variantes

Un virus puede considerarse como una especie si es biológicamente y clínicamente distinto de cualquier otro virus. Sin embargo, muchos tipos de PVs no cumplen ese criterio, por lo que la ICTV decidió considerar a una especie de VPH como un grupo filogenético compuesto por tipos de PVs que son biológicamente similares pero genéticamente distintos. De esa forma, en base al gen más conservado dentro del

genoma de un VPH (gen *L1*), un tipo se reconoce como tal si la secuencia de ADN de este gen difiere en más del 10% del tipo PV conocido más cercano (Bernard, 2013).

Por otro lado, luego de la aparición de los distintos tipos de PVs, la expansión de la población, la dispersión geográfica y el tiempo contribuyeron a su evolución. Aquella evolución no solo causó la aparición de subtipos o linajes, sino también de varios sublinajes, conocidos como variantes. De modo que, las diferencias entre 2% y 10% de homología entre secuencias de PVs definen un subtipo y menos del 2% en las mismas, una variante (Bernard, 2013). A pesar de esta estrecha relación evolutiva, las variantes de los distintos tipos de VPH pueden diferir en la carcinogenicidad y persistencia de las infecciones que causan (Bernard, 2013).

Entre las variantes más estudiadas, no solo en cuanto a su relación con cáncer pero también con su distribución geográfica, se encuentran aquellas presentes dentro del genotipo VPH16. Pues, se han determinado 4 linajes filogenéticos para este tipo (A, B, C y D) (Figura 3) que incluyen 10 variantes (Burk, Harari, & Chen, 2013).

El linaje A es conocido como el linaje Europeo (E) y comprende a los sublinajes: A1, A2, A3, A4, esta última conocida como variante Euro-Asiática, E(As). Por otro lado, el linaje B y C corresponden a las variantes de origen Africano (Afr) e incluyen a los sublinajes: B1 (variante Africana-1, Afr1a), B2 (variante Africana-1b) y a la variante Africana-2a (Afr2a). Finalmente, el linaje D contiene a las variantes de origen Asiático así como Norteamericano y comprenden a los sublinajes: D1 (variante

Norteamericana-1, NA1), D2 (variante Asio-Americana-2, AA2) y D3 (variante Asio-Americana-1, AA1) (Burk, Harari, & Chen, 2013).

En cuanto a su relación con la persistencia y desarrollo a cáncer, las variantes más carcinogénicas son las Asio-Americanas (AA) y Africanas (Afr) (Burk, Harari, & Chen, 2013), puesto que pueden llegar a presentar un riesgo 3 veces más elevado para el desarrollo de cáncer que las variantes Europeas (E). Datos sugieren que los oncogenes de esas variantes (E6/E7) pueden permanecer muy activos desde el inicio de la infección. Esto puede explicar por qué las personas positivas para estas variantes presentan infecciones persistentes (mayor a 2 años) e, incluso, pueden desarrollar cáncer invasivo 8 a 12 años antes que las mujeres con variantes Europeas (E) (Burk, Harari, & Chen, 2013).

1.3. Epidemiología

1.3.1 Epidemiología de los tipos y variantes del VPH

Los tipos de VPH y su prevalencia varían ampliamente a través del mundo (IARC, 1995). En Estados Unidos y Europa, el VPH16 es el más frecuentemente detectado a nivel poblacional y es el tipo predominante que causa cáncer cervical invasivo en aproximadamente 60-70% de mujeres, seguido por el VPH18 (causante, principalmente, de adenocarcinomas) con alrededor de 15%. Sorprendentemente, en algunos países de Sudamérica, Centro América y ciertas regiones de Asia, el VPH18

parece solo tener una tasa de 5% de infección en la población femenina y, más bien, el VPH52 y 58 adquieren una mayor frecuencia de infección (Bruni, et al., 2016).

En cuanto a las variantes de VPH, se ha observado que existe una diferencia sustancial en su distribución entre las diferentes regiones geográficas del mundo. Se ha determinado que las variantes del tipo VPH16 Europeas (E) se distribuyen uniformemente en todas las regiones del planeta, mientras que, las variantes Euro-Asiáticas E (As), Asio-Americanas (AA) y Africanas (Afr) se limitan principalmente a Asia oriental, América y las regiones africanas, respectivamente (Lopera, et al., 2014).

A más de la variación genómica intratípica del VPH16, que ha sido particularmente bien estudiada, la correspondiente distribución de variantes del VPH18 ha tenido también un importante esclarecimiento. Pues, las variantes de este último forman árboles filogenéticos con ramas conformadas por variantes con alta prevalencia en África, Europa o Asia Oriental (con una de las ramas filogenéticas de Asia oriental de las variantes extendiéndose a poblaciones de nativos americanos). Por lo general, las variantes Asio-Americanas (AA) y Africanas (Afr) de este virus están asociadas a lesiones malignas (Calleja-Macías, et al., 2005).

De la misma manera, se ha observado que la distribución de las variantes del VPH52 y VPH58 alrededor del mundo también varía dependiendo de la región geográfica. Se han llegado a distinguir las relaciones filogenéticas para las variantes de esos dos tipos de VPH que demuestran que, para el VPH58 existen 4 linajes (A, B, C y D) y 7 sublinajes (A1-A3/B1-B2/D1-D2), mientras que para el VPH52 hay existen 4

linajes (A, B, C y D) (Chen, y otros, 2011) y 7 sublinajes (A1-A2/B1-B2/C1-C2/D) (Figura 4 y Figura 5). Por un lado, la variante A1 perteneciente al VPH52 tiene una mayor prevalencia tanto en el continente Americano, Africano así como Europeo. Al contrario, la variante B2 de aquel genotipo, presenta un mayor predominio en Asia (Zhang, et al., 2014). Por otro lado, en cuanto al VPH58, se conoce que el linaje A2 es el más común en África, América y Europa. En cambio, el linaje A1, A2 y A3 presenta igual preponderancia en el continente Asiático [(Chan, et al., 2011); (Chen, et al., 2017)].

1.3.2 Epidemiología de tipos y variantes del VPH en el Ecuador

En el Ecuador no existen datos oficiales sobre el porcentaje de mujeres con cáncer de cérvix causada por la infección de VPH, pero los genotipos VPH16 y 18 podrían ser los responsables de un 37.9% de los casos de cáncer de cervical en el país (ICO, 2017). No obstante, en el estudio realizado por Mejía et al. (2015) a 164 biopsias cervicales de mujeres que acudían a un hospital de la ciudad de Quito, se reportó que aquellas muestras específicas para cáncer de cuello uterino, habría un 92.7% de presencia de VPH y los genotipos 16 y 18 son responsables de 40.6% y 1.01%, respectivamente, de casos de lesiones precancerosas y cancerosas.

Tampoco hay información clara sobre qué subtipos y variantes se encuentran circulando en el país. Por una parte, se conoce que el VPH16 es genotipo más prevalente, no obstante, no se sabe con certeza qué tipo después de ese es el más frecuente en la población femenina ecuatoriana. Se ha sugerido que, a partir de neoplasias cervicales intraepiteliales de grado 1, 2 y 3, podrían ser los genotipos

VPH31, 53, 56 y 58 (Tornesello, et al., 2008). En cambio, en base a muestras de raspados vaginales, se ha visto que los genotipos VPH52, 58 y 59 podrían obtener el segundo, tercer y cuarto lugar en prevalencia (Brown, et al., 2009). Aquellos datos concuerdan con lo encontrado en lesiones pre-cancerosas y cancerosas en donde se ha observado que los genotipos VPH58 y 52 son los predominantes luego del VPH16 (Mejía, Muñoz, Trueba, Tinoco, & Zapata, 2015). Sin embargo, recientemente, se ha contemplado que a partir de muestras de displasias cervicales, el VPH33 podría ser el segundo más común en mujeres mestizas ecuatorianas (García, García, Burgos, Almeida, & Ruiz, 2016).

Por otra parte, en cuanto a la prevalencia de las variantes circulantes en la población mestiza femenina del Ecuador, en base a los estudios ejecutados por Tornesello et al. (2008) y Mejía et al. (2015), se piensa que las variantes del linaje (E) pertenecientes al genotipo VPH16 podrían ser la más prevalentes. Mientras que, para el tipo VPH58, las variantes del sublinaje A2 serían las más comunes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Analizar la variabilidad intratípica de 47 muestras provenientes de raspados cervicales de un grupo de mujeres indígenas Chachi y afroecuatorianas originarias de la costa norte del Ecuador a través de un análisis molecular de la región MY09/MY11 del gen viral *L1*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar los linajes y posibles sublinajes de los genotipos VPH16, 58 y 52 de 47 muestras de raspados cervicales provenientes de un grupo étnico de mujeres Chachi y afroecuatoriano de la costa norte del Ecuador.
- Realizar un análisis de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) para las variantes encontradas de los genotipos de VPH16, 58 y 52.

3. JUSTIFICACIÓN

A partir de los resultados de un estudio epidemiológico no publicado realizado por Bayas et al. (2008) en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), que tenía como objetivo conocer la prevalencia de tipos de VPH en un grupo Chachi y afroecuatoriano en la provincia de Esmeraldas en Ecuador, se recuperó la base de datos con sus respectivas muestras de ADN en donde se conoció el tipo de VPH causante de poli y mono infecciones en aquellas dos poblaciones y se logró determinar que los tipos de VPH más comunes en mujeres afroecuatorianas son 16, 58 y 39, mientras que en mujeres Chachi son 58, 52 y 16. Por otro lado, se conoce que VPH16, 58 y 52 son los genotipos más predominantes en lesiones precancerosas y cancerosas en un hospital oncológico en Quito (Mejía, Muñoz, Trueba, Tinoco, & Zapata, 2015). El presente trabajo pretende proveer datos preliminares con respecto a la variabilidad genética de los genotipos de VPH16, 58 y 52 circulantes en las mujeres de los dos grupos étnicos mencionados.

4. ÁREA DE ESTUDIO

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) en el campus Cumbayá. Se utilizaron 47 muestras de las 247 empleadas en el estudio epidemiológico no publicado realizado por Bayas et al. (2008), que corresponden a muestras de ADN provenientes de raspados cervicales de mujeres afroecuatorianas y de etnia Chachi originarias del cantón Eloy Alfaro en la costa norte del Ecuador con monoinfecciones de los genotipos de VPH16, 58 y 52.

5. MATERIALES

5.1 Muestras

- 47 muestras de ADN a partir de cepillados cervicales
- 1 muestra de ADN como control positivo con presencia de ADN de VPH35, 42, 51, 66, 68.
- 1 muestra de ADN como control negativo sin infección por VPH obtenido a partir de un cepillado cervical

5.2 Amplificación de la región MY09/MY11 del gen *L1* para análisis de variantes de los tipos VPH16, 58 y 52

- MgCl₂ (Promega)

- Agua libre de ARNasas y ADNasas
- Buffer de reacción de PCR 10X (Promega)
- dNTPs (Promega)
- Primer F MY09 (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3')
- Primer R MY11 (5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3')
- DMSO (Di-Metil-Sulfo-óxido) (Promega)
- GoTaq Flexi Polimerasa de ADN (Promega)
- ADN de raspado cervical
- Termociclador T100 (BioRad)
- Tubos Eppendorf 0.2 ml

5.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar y extraer el producto amplificado de la región L1 del virus del VPH16, 58 y 52

- Agarosa LE Analytical Grade (Promega)
- TBE 10X (Tris-Ácido-Bórico-EDTA)
- Microondas Panasonic USP 4, 942, 516
- Fotodocumentador BioRad Gel Doc XR
- Balanza Analítica (ae ADAM AQT-600)
- Fuente de poder ThermoScientific Fb300
- Cámara de electroforesis horizontal (C. B. S. Scientific CO)
- Marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen)
- Parafilm

- Blue Juice 10X Buffer de carga (Promega)
- Bromuro de Etidio (Molecular Sigma Biology)

5.3.1 Extracción de banda de gel de agarosa al 1.5% del fragmento del gen L1 viral amplificado

- PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen)
 - Buffer de Lavado (W1)
 - Buffer de Elución (E1)
 - Columnas de Purificación de 1.5 ml
 - Tubos de Lavado 1.5 ml
 - Tubos de Dilución de 1.5 ml
- Fotodocumentador BioRad Gel Doc XR
- Protector ocular de luz UV BioRad Gel Doc XR
- Balanza Analítica (ae ADAM AQT-600)
- Microcentrífuga de tubos de 1.7 – 5 ml.
- Hoja de Bisturí
- Bisturí
- Isopropanol al 100%
- Etanol al 100%

5.4 Secuenciamiento de ADN, edición de los fragmentos de región MY09/MY11 del gen *L1* de la cápside viral y creación de árboles filogenéticos y búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple

- 20 μ l de producto de PCR
- Software MEGA v. 7 (Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007)

6. MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

Las 47 muestras correspondientes a monoinfecciones de VHP16, 58 y 52 utilizadas para este estudio, fueron recuperadas de un congelador a -80°C en el Instituto de Microbiología de la USFQ. El ADN presente en aquellos 47 tubos fue extraído con una técnica modificada de CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) descrita por Saghai-Marroof et al., (1984) y genotipificadas con el método propuesto por Sotlar et al., (2004) para el proyecto del 2008.

6.2 Amplificación de la región MY09/MY11 del gen *L1* para análisis de variantes de los tipos VPH16, 58 y 52

Se amplificó la región M09/MY11 del gen *L1* de los genotipos VPH16, 58 y 52 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen final de la reacción fue de 20 μ l y consistió en: 1.5 mM MgCl_2 , Buffer de PCR 1X, 1.5 mM dNTPs,

0.25 μ M de Primer Forward (MY09), 0.25 μ M de Primer Reverse (MY11), 1 unidad de GoTaq Flexi Polimerasa de ADN y 10 ng de ADN. El programa de PCR TouchDown se corrió en un termociclador T100 (BioRad) con una desnaturalización inicial de 94°C por tres minutos, seguido por cinco ciclos de desnaturalización a 94°C por dos minutos, un paso de anclaje de cebadores a 48°C por cuarenta y cinco segundos y un paso de elongación a 72°C por un minuto durante 5 ciclos. Posteriormente, se continuó con 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por dos minutos, otro paso de amplificación a 45°C por un minuto y un nuevo paso de elongación a 72°C por otro minuto. Finalmente, se terminó con un paso de elongación a 72°C por diez minutos. Se utilizó como control positivo una muestra de VPH de poliinfecciones pertenecientes a los controles positivos empleados en el estudio de Bayas et al. (2008) y un control negativo perteneciente al mismo estudio.

6.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

A los productos de la amplificación se agregó 0.5 μ l de buffer de carga y fueron analizados mediante la técnica de resolución electroforética en geles de agarosa al 1.5%, con buffer TBE 1X y teñidos con 1 μ l de bromuro de etidio. En cada corrida, se usó un marcador de peso molecular de 100 pb. A cada grupo de muestras se le agregó un control positivo (el cual contenía poliinfecciones de VPH) y un control negativo (el cual incluía ADN sin la presencia del virus) a 80 voltios, por cuarenta y cinco minutos. Los resultados fueron evaluados mediante exposición directa a luz UV mediante un Fotodocumentador BioRad Gel Doc XR.

6.3.1 Extracción de banda de gel de agarosa al 1.5% del fragmento del gen L1 viral amplificado

Debido a que las muestras de ADN fueron preservadas durante 8 años, su calidad e integridad estaban comprometidas, es decir, el ADN estaba en gran parte degradado. Después de realizar la amplificación por PCR TouchDown, algunas de ellas mostraron amplificaciones inespecíficas, por lo que un paso de extracción de banda fue requerido para obtener únicamente el producto deseado. Así, fue necesaria la realización de un nuevo gel de 1.5% de agarosa en el cual se colocaban 18 μ l de amplicón y 2 μ l de Blue Juice (Promega). En este caso, se aplicó un voltaje de 80V por ciento y veinte minutos a 200mA para una buena separación de las bandas y se transfirió el gel a un fotodocumentador BioRad Gel Doc XR para su corte con bisturí bajo luz UV.

Posteriormente, se empleó el kit *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo* (Invitrogen) con el objetivo de recuperar el producto de PCR del tamaño deseado. Para ello, se siguieron las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, 2017).

6.4 Secuenciamiento de ADN, edición de los fragmentos del gen L1 de la cápside viral, creación de árboles filogenéticos y búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple

Los amplicones del gen *L1* de las muestras monoinfectadas con VPH16, VPH58 y VPH52 fueron enviadas y secuenciadas en *Functional Biosciences* (<https://functionalbio.com/web/>).

6.4.1 Edición de las secuencias y creación de árboles filogenéticos de los genotipos VPH16, 58 y 52 para la identificación de variantes y búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)

Cada secuencia nucleotídica obtenida en este estudio para la región MY09/MY11 del gen *L1* fue editada y alineada con la variante de referencia de los tipos VPH16, 58 y 52 obtenidas de NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando MEGA software versión 7.0 (Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007).

Empleando ese mismo software, se realizaron los respectivos árboles filogenéticos para identificar las variantes presentes en los tipos más frecuentes en las dos poblaciones, comparando las secuencias de referencia de las distintas variantes de los genotipos VPH16, 58 y 52 (también obtenidas de GenBank) y las halladas por Mejía et al. (2015), con las 10 secuencias previamente editadas encontradas en este trabajo.

Estos árboles filogenéticos fueron resultado de un análisis estadístico de Máxima Verosimilitud (*Maximum likelihood* o ML, en inglés) en donde se emplearon 100 replicaciones de *Bootstrap* y un modelo de evolución de Tamura 92.

7. RESULTADOS

7.1 Amplificación de región MY09/MY11 del gen *L1* para análisis de variantes de los genotipos VPH16, 58 y 52

De las 47 muestras con monoinfección de VPH16, 58 y 52, según los resultados de Bayas et al. (2008), que fueron sometidas a amplificación con los *primers* MY09/MY11, se obtuvo el tamaño de banda esperado (450 pb) en únicamente 14 muestras, las muestras restantes (33), después de varias pruebas, evidenciaron una amplificación negativa para el gen *L1* por lo que no fueron incluidas en el estudio.

Debido a que algunas muestras presentaron amplificación inespecífica a partir de los 900 pares de bases (Figura 6), se utilizó un kit de extracción de gel de agarosa, de donde se obtuvieron los productos del gen *L1* de 450 pares de bases aislados y purificados (Figura 7).

7.2 Secuenciamiento del amplicón de región MY09/MY11 del gen *L1*, edición de las secuencias y creación de árboles filogenéticos de los VPH16, 58 y 52 para la identificación de variantes

7.2.1 Secuenciamiento del amplicón región MY09/MY11 del gen viral *L1*

Un total de 14 muestras con amplificación positiva para el gen viral *L1* fueron secuenciadas. No obstante, solo 10 de las 14 muestras fueron incluidas en el presente

estudio puesto que presentaban una mono infección positiva para los genotipos de VPH16, 58 y 52 (Tabla 1). Así, de la etnia Chachi, se obtuvieron 5 secuencias pertenecientes al VPH16 y 1 secuencia correspondiente al VPH58. En cambio, de la etnia afroecuatoriana, se lograron obtener 2 secuencias pertenecientes al VPH16, 1 secuencia del VPH58 y una de VPH52 (Figura 8-10).

Las 4 muestras restantes presentaron secuencias que pertenecen a genotipos distintos a los esperados, VPH61 (1 muestra), VPH83 (2 muestras) y VPH102 (1 muestra) con valores de cobertura e identidad de 100% después de la secuenciación y análisis del cromatograma y secuencia.

7.2.2 Análisis filogenético de los genotipos VPH16, 58 y 52

Con las 10 secuencias consenso de los genotipos de interés, se realizaron 3 árboles independientes correspondientes a las secuencias de cada genotipo de VPH. Para el análisis filogenético, mediante Máxima Verosimilitud (ML), se contó con secuencias de 360 pb de VPH16, 360 pb de VPH58 y 439 pb de VPH52.

Con respecto al VPH16, se encontró que todas las secuencias pertenecen al linaje A o Europeo (E) con un soporte de *Bootstrap* de 100%. Específicamente, se puede observar que estas secuencias no pertenecen a las variantes A2 o A3, pero no se puede diferenciar si es que corresponden a las variantes A1 o A4 (Figura 11).

Por otro lado, las 2 secuencias correspondientes al VPH58 se centralizaron en el linaje A con un soporte de *Bootstrap* de 100% y en el sublinaje A2 con un soporte de 94% (Figura 12).

La secuencia perteneciente al VPH52 fue asociado con el linaje A con un soporte de *Bootstrap* de 100%, sin poder distinguir entre el sublinaje A1 o A2 (Figura 13).

Luego de una búsqueda de SNPs, no se encontró ningún polimorfismo asociado a las secuencias obtenidas por este estudio correspondientes a los tipos VHP16 y 52, lo que quiere decir que las secuencias encontradas pertenecientes a esos genotipos eran similares a las secuencias de referencia (NC001526 y X74481 respectivamente). No obstante, en cuanto al genotipo VPH58, se encontró un polimorfismo en el sitio G6641A de la región L1 (Tabla 2).

Adicionalmente, a partir de lo observado en la Figura 11, 13 de las 15 secuencias correspondientes al genotipo VPH16 encontradas por Mejía et al. (2015) parecerían ser similares a las 10 secuencias halladas por el presente estudio. Es decir, todas ellas se agrupan dentro del linaje A, sin embargo, no se puede distinguir si estas pertenecen al sublinaje A1 o A4.

Finalmente, de la Figura 12 se conoce que 10 de las 11 secuencias del genotipo VPH58 provenientes del estudio de Mejía et al. (2015) también parecen ser similares a

las 2 secuencias encontradas en este trabajo. En otras palabras, todas aquellas secuencias se agrupan como pertenecientes al sublinaje A2.

8. DISCUSIÓN

8.1 Amplificación de la región MY09/MY11 del gen *L1* de los VPH16, 58 y 52

La reacción en cadena de la polimerasa es el método más ampliamente utilizado para la amplificación de ácidos nucleicos. La detección de VPH basada en el método de PCR es sensible y específica. Generalmente, se emplean marcadores genéticos o combinaciones de estos (como los de virulencia E6/E7, LCR o L1) para su caracterización (Zaravinos, Mammas, Sourvinos, & Spandidos, 2009). Sin embargo, en el caso de este estudio, para la determinación de las variantes correspondientes a los genotipos VHP16, 58 y 52 se utilizó únicamente el gen de la cápside viral *L1* porque esta es la secuencia de lectura abierta más conservada dentro del genoma del VPH y de la cual se realiza la clasificación oficial de tipos, linajes y sublinajes. Esa característica ha hecho que este gen sea de inmensa importancia para diagnóstico, generación de vacunas y discriminación del potencial infeccioso de las diferentes variantes (Chiesa, Perez, Nuñez, & Pirola, 2016)

Los *primers* MY09-MY11, que amplifican la secuencia del gen *L1*, se han usado ampliamente para estudiar la historia natural de los VPHs y su papel en el desarrollo del cáncer genital, particularmente del cuello uterino. Debido a que presentan una secuencia degenerada única de 24 nucleótidos, su sensibilidad, capacidad para

amplificar y detectar genotipos de VPH es elevada. Aquello ha llevado a considerarlos una herramienta extremadamente valiosa ("estándar de oro") para la detección del VPH durante los últimos años (Chiesa, Perez, Nuñez, & Pirola, 2016).

Se realizaron pruebas iniciales con las condiciones con las que los genotipos en estas muestras habían sido previamente identificados, sin obtener amplificación. De esa manera, con el objetivo de incrementar la sensibilidad del ensayo, se realizaron varios protocolos *TouchDown* y el presentado en este estudio es el que generó el mejor resultado, logrando amplificar 14 muestras de las 47 analizadas (29,8%). Aquel rendimiento de amplificación bajo puede deberse, principalmente, al alto nivel de degradación del ADN presente en las muestras ya que fueron tomadas en el 2008 y sometidas a varios procesos de congelación y descongelación para las distintas pruebas moleculares tanto para el estudio inicial como para este.

8.2 Análisis filogenético de VPH16, 58 y 52

8.2.1 Análisis de genotipos de VPH

Las 47 muestras empleadas en el presente estudio fueron preliminarmente detectadas como VPH positivas para los genotipos VPH16, 58 y 52 a partir de un análisis molecular empleando una PCR múltiple anidada descrita por Sotlar et al. (2004). Es decir que, se llevó a cabo una PCR con una mezcla de tres cebadores consenso degenerados (5'- GGGWGK KACTGAAATCGGT-3, 5'-

CTGAGCTGTCARNTAATTGCTCA-3', 5'-TCCTCTGAGTYGYCTAATTGCTC-3') que generaba un fragmento de 630 pb correspondientes a los oncogenes virales E6-E7. Luego, se realizó una PCR múltiple y anidada con cuatro cócteles de cebadores con el producto de PCR obtenido previamente. Cada coctel contenía cuatro o cinco pares de cebadores diferentes para la identificación específica de genotipos de VPH alto riesgo como el VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 y los genotipos de bajo riesgo como los VPH6, 11, 42, 43 y 44.

No obstante, a partir de los resultados obtenidos en este estudio a través de la PCR del gen viral *L1* y de la secuenciación posterior, se detectaron otros genotipos para 4 de las 14 muestras con amplificación positiva. Estos genotipos corresponden a los VPH61, 83 y 102. El VPH61, por un lado, es considerado como un genotipo de bajo riesgo (LR) mientras que el VPH83 es un genotipo de riesgo intermedio. En cambio, no se tiene mucha información sobre el VPH102 puesto que es un genotipo sin clasificar, pero se piensa que podría pertenecer al grupo de bajo riesgo (LR) (Al-Awadhi, Chehadeh, & Kapila, 2011).

Así, aquella diferencia de resultados entre las dos metodologías probablemente fue causada por errores en la especificidad de la técnica de la PCR múltiple. Los resultados obtenidos en este estudio son los definitivos puesto que la secuenciación es una de las técnicas de biología molecular ideales para identificar con certeza un fragmento de ácido nucleico.

8.2.2 Linajes y sublinajes de VPH

No existen estudios de variantes circulantes en mujeres de grupos étnicos del Ecuador. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis solo pueden ser comparados con otras investigaciones de la misma índole en el país realizadas en mujeres de la población mestiza ecuatoriana.

Así, en 2008 se efectuó el primer estudio sobre tipos y variantes de VPH en el Ecuador. En este estudio, se emplearon muestras de neoplasias cervicales intraepiteliales de grado 1, 2 y 3 y se encontró que los genotipos más comunes del virus se trataban de los VPH16 y 81, seguidos de los tipos VPH31, 53, 56 y 58, en ese orden. En donde, las variantes más frecuentes para el VPH16 se clasificaron, principalmente, como Europeas (E) y en mucha menor proporción variantes Africanas (Afr) (Tornesello, et al., 2008). Aquellos datos no concuerdan con el segundo estudio sobre tipos y variantes realizado en mujeres mestizas ejecutado por Mejía et al. (2015) a partir de lesiones pre-cancerosas y cancerosas, puesto que ellos describieron que los genotipos de VPH habituales dentro de esa población son los genotipos VPH16, 58 y 52. Además, en base a ese mismo estudio, se sabe que las variantes con mayor prevalencia en cuanto al VPH16 podrían pertenecer al linaje Europeo (E). Mientras que, en relación al VPH58, predominaría el sublinaje A2.

El presente estudio, por tanto, sería el tercer estudio de tipos y variantes del Virus del Papiloma Humano en el Ecuador y el primero realizado en mujeres no mestizas.

8.2.2.1 Linajes y sublinajes de VPH16

En este trabajo se detectó una alta prevalencia de variantes pertenecientes al linaje Europeo (E) para el tipo de VPH16, representando el 100% del total de muestras analizadas para las etnias Chachi y afroecuatorianas con aquel genotipo del virus del VPH.

Este linaje específico, se caracteriza por su nivel bajo de patogenicidad. Pues, dentro de cada genotipo de VPH, existen diferencias significativas de cada variante en cuanto a su potencial o asociación con: 1) cáncer, 2) la persistencia viral y 3) la frecuencia de recurrencia de aquella enfermedad. Así, se sabe que hay un riesgo tres veces mayor de desarrollar cáncer para las variantes Asio-Americanas (AA) o Africanas (Afr) del HPV16 en comparación con las variantes Europeas (E) (zurHausen, 2002). Este riesgo disminuido de la infección con variantes Europeas (E) puede estar asociado a una replicación viral menos efectiva al producir un menor número de copias por célula y a una menor degradación de las proteínas supresoras de tumores (p53 y pRb) por parte de las proteínas virales E6 y E7, al compararlas con las variantes no Europeas (Mejía, Muñoz, Trueba, Tinoco, & Zapata, 2015).

De modo que, existen ciertas similitudes entre la presente investigación y el estudio realizado por Mejía et al. (2015). En primer lugar, a partir de los datos obtenidos en esta tesis se conoce que el total de secuencias obtenidas para el tipo VPH16 (100%) se clasifican dentro del linaje Europeo (E), el cual es un valor cercano al

valor de 93.75% de secuencias halladas por Mejía et al. (2015) agrupadas en el mismo linaje. Y en segundo lugar, las secuencias halladas en este trabajo así como la mayor parte de las secuencias del VPH16 encontradas por Mejía et al. (2015) parecerían pertenecer al A1 o A4, excepto por las secuencias KP794904 y KP794891 quienes presentan SNPs en C6854T, para la primera y en T6616G y C6619A, para la segunda.

El hecho de no poder realizar aquella distinción entre sublinajes podría estar directamente relacionado con el número de pares de bases empleadas para la creación del árbol filogenético del VPH16 en este proyecto de investigación. Al emplear solo la región MY09/MY11 del gen *L1* para su construcción, se tiene un número limitado de 450 pares de bases (y en el caso de este estudio, con un promedio de 360 pares de bases) se pierde resolución para la construcción pertinente del árbol, por lo que, algunas de esas relaciones en el clado Europeo (E) quedan inconclusas.

No obstante, debido a que los mismos linajes y posibles sublinajes se encuentren infectando tanto a mujeres de etnia Chachi y afroecuatoriana, así como a mujeres mestizas; podría sugerir que la mayoría de las variantes que se muestrean dentro de cualquier grupo de pacientes de una misma región son similares entre sí (Holmes, 2008). Con lo cual, la filogeografía del VPH en el Ecuador podría estar marcada para todo el territorio, puesto que, a pesar de que en este trabajo no se pudo distinguir el sublinaje de las 10 secuencias recuperadas, se sabe que pueden pertenecer tanto al linaje A1 como A4, tal y como lo hacen la mayoría de las muestras en el estudio de Mejía et al. (2015).

De esa forma, para poder verificar y corroborar que la filogeografía del VPH16 en el Ecuador coincide con las variantes encontradas tanto en mujeres de la provincia de Esmeraldas de etnia Chachi y afroecuatorianas, así como de mujeres mestizas de la provincial de Pichincha; más estudios son necesarios en distintas regiones del Ecuador que incluyan mujeres de otras etnias características del país.

8.2.2.2 Linajes y sublinajes de VPH58

En cuanto al genotipo VPH58, este estudio encontró que una de las dos muestras pertenecientes a este genotipo pertenecía al linaje A, sublinaje A2. Mientras que, la otra secuencia, presentaba un SNP en la posición G6641A, haciéndola ligeramente distinta a la de aquel sublinaje. Interesantemente, aquellos resultados son parecidos a los obtenidos en el estudio realizado por Mejía et al. (2015), en donde el 83.33% de las secuencias clasificadas bajo el genotipo VPH58 pertenecían al sublinaje A2.

De esa forma, el árbol filogenético de la Figura 12, parecería sugerir que las mismas variantes del genotipo VPH58 infectan tanto a mujeres indígenas Chachi, afroecuatorianas y mestizas debido a que las 10 secuencias provenientes del estudio de Mejía et al. (2015) forman un solo clado con las dos secuencias obtenidas en esta investigación, todas ellas correspondientes al sublinaje A2.

Pero, debido a la baja eficiencia de recuperación de secuencias para este genotipo en el presente trabajo, no se puede conocer con certeza si el sublinaje A2 es,

también, la variante más frecuente en mujeres Chachi y afroecuatorianas de la costa norte del país. Un mayor número de secuencias son necesarias para confirmar si las variantes coinciden con las obtenidas por Mejía et al. (2015) en los tres grupos étnicos.

Adicionalmente, aquel grupo de investigadores determinaron que una de sus secuencias clasificadas como pertenecientes al linaje A contenía un SNP en la posición nucleotídica T6678G. Esta variante con número de acceso KP794916, al ser incluida dentro del análisis filogenético de la presente investigación junto con las otras 10 secuencias halladas por Mejía et al. (2015), demostró no tener similitud con ninguna de ellas ni tampoco con ninguna de las dos secuencias pertenecientes a este estudio. Probablemente, aquello se debe porque la secuencia Ch. Borbón, así como las 10 secuencias restantes del estudio del 2015, son completamente similares a la secuencia de referencia del sublinaje A2.

Al contrario, la secuencia Afroec. San Miguel correspondiente a este estudio, a pesar de ser clasificada dentro del sublinaje A2, presenta un SNP en la posición G6641T. Este SNP causa que esa secuencia sea ligeramente diferente a la de referencia de aquel sublinaje y, a su vez, distinta de la variante KP794916 puesto que no coincide con el SNP en la posición T6678G.

De esa manera, un aumento en el número de secuencias pertenecientes a este genotipo podría ayudar a definir si es que la variante A2 infecta tanto a mujeres de etnia Chachi y afroecuatoriana así como mujeres mestizas de la población, ya que a partir de los resultados de esta tesis, parecerían ser las mismas. Con ello, lo

encontrado en este trabajo podría estar acorde con lo mencionado en los estudios realizados por Chen et al. (2017) y Chan et al. (2011), en donde se menciona que la variante A2 podría predominar en la población del continente Americano, Africano y Europeo.

De ese modo, un aumento en el número de muestras ayudaría, no solo a apoyar aquellos resultados pero, así mismo, a obtener información sobre la existencia de variantes con SNPs característicos tanto para las mujeres mestizas ecuatorianas, como el descrito por Mejía et al. (2015), o como el hallado en la presente investigación para mujeres afroecuatorianas.

8.2.2.3 Linajes y sublinajes de VPH52

Ningún otro estudio, a parte de este, ha investigado las variantes pertenecientes a ese genotipo en poblaciones indígenas y afroecuatorianas en el Ecuador. Existen numerosos estudios realizados en países tales como China, Taiwán, Corea y Japón en donde el VPH52 es uno de los principales causantes de cáncer de cérvix luego del VPH31, 33, 16, 18 y 58. De modo que, a partir de todas aquellas investigaciones se estima que en los países asiáticos, las variantes que prevalecen corresponden a aquellas pertenecientes al linaje B y, que por tanto, aquel linaje podría considerarse como un *cluster* asiático (Chen, et al., 2011). Así, a partir del estudio realizado por Zhang et al. (2014) para buscar la distribución del VPH52 en el mundo, se confirmó la existencia de un *cluster* asiático conformado por la variante del linaje B2 y, adicionalmente, se propuso que existe una elevada prevalencia de la variante A1 tanto

en el continente Europeo, Africano así como Americano. Este estudio demuestra, además, que la infección con el linaje B tiene un riesgo de 5.46 veces más de desarrollo de precáncer y cáncer que el linaje A.

Aquellos hallazgos concuerdan con las investigaciones realizadas en Brasil y Canadá en donde se ha determinado que la variante más común en esas poblaciones es la perteneciente al linaje A1. De todos esos trabajos, sobresale aquel elaborado en Canadá por Aho et al. (2003) quienes estudiaron 114 secuencias de VPH52 provenientes de lesiones cervicales de alto grado de una población canadiense multiétnica de mujeres HIV-seropositivas y negativas. En aquel estudio, se determinó que las mujeres afroamericanas (las cuales fueron representadas por 43 de aquellas secuencias) tenían más probabilidades de estar infectadas con variantes parecidas a la del prototipo, es decir, a la variante perteneciente al linaje A.

En este trabajo se determinó que la única variante encontrada referente al tipo VPH52 correspondiente a una mujer afroecuatoriana se agrupó en el linaje A. No obstante, no se pudo distinguir si esta pertenece al sublinaje A1 o A2 porque no existe ningún SNP característico a partir del cual se pueda diferenciar entre esos dos sublinajes. De esa forma, probablemente, aumentando la cantidad de pares de bases empleadas para la realización del árbol filogenético correspondiente a este tipo específico de VPH (una cantidad mayor a 439 pares de bases, empleadas en este estudio) se podría tener una relación filogenética más acertada.

Sin embargo, a pesar de que la secuencia encontrada parecería coincidir con el resultado encontrado por Zhang et al. (2014) y Aho et al. (2003), al solo haber obtenido una secuencia clasificada dentro de este genotipo esta no resulta representativa de todas las posibles variantes que realmente podrían estar circulando en las mujeres indígenas Chachi y afroecuatorianas de la costa norte del país.

Adicionalmente, debido a la falta de información sobre variantes de este genotipo en las mujeres mestizas ecuatorianas, a pesar de ser, tal vez, el tercer genotipo más prevalentes en aquellas mujeres; tampoco se puede conocer si es que las mismas variantes de este genotipo infectan tanto a las mujeres de las dos etnias estudiadas, así como, a mujeres mestizas ecuatorianas. Con lo cual, no se puede establecer una relación filogeográfica del virus con el grupo humano que infecta, para este genotipo.

8.2.3 Búsqueda de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs)

Conocer los polimorfismos en la región L1 del genoma del VPH puede ser importante para familiarizarse con el potencial infeccioso de las diferentes variantes. No obstante, también es de gran utilidad para la identificación de epítomos relevantes para el diseño de la vacuna del VPH (King, et al., 2016).

Hoy en día, la proteína L1, presente en las formulaciones de la vacuna contra el VPH, produce grandes cantidades de anticuerpos neutralizantes que confiere una protección específica y duradera contra una infección por parte del virus, evitando así,

el desarrollo de cáncer de cuello uterino, ano, vulva, vagina y orofaringe. Pero los cambios en la secuencia de nucleótidos del gen L1 pueden inducir cambios estructurales, que no solo modifican sus epítopes, sino que también pueden alterar el conjunto de partículas virales (Chen, et al., 2011).

De esa manera, en la superficie de los pentámeros de la proteína L1 del virus, existen estructuras de bucle específicas (*loops*) que contienen regiones hipervariables que están expuestas. Mutaciones dentro de estos bucles son de gran interés puesto que podrían influir en la estructura secundaria de la proteína. Y no solo dentro de aquellas estructuras, también se intenta encontrar mutaciones que alteren la estructura de la proteína en hojas plegadas beta y hélices alfa (Sun, et al., 2012).

En el estudio de King et al. (2015) se describen cambios no sinónimos en bucles FG (Figura 14) para el genotipo de VPH16 en: G6432A, 6443C, A6445C, A6445G, A6489C, A6490C, A6505G. Por su parte, Sun et al. (2012), describieron la mutación C5640T la cual resulta en un cambio de aminoácido (Q26L) que se encuentra una hoja plegada beta en el VPH52.

En el presente trabajo, las secuencias correspondientes al tipo de VPH16 y 52 eran iguales a la secuencia de referencia. Generalmente, alrededor del 60-93% de las secuencias encontradas en otros estudios resultan ser idénticas a las secuencia de referencia como en los estudios de Chiesa et al. (2016), King et al. (2015) y Chen et al. (2016).

Por otro lado, Chen et al. (2016), describieron mutaciones no sinónimas causadas por un cambio en secuencias: A64014G y C6688A del genotipo de VPH58, concretamente, en estructuras de hélice alfa y hoja plegada beta pero no en estructuras de bucles. Adicionalmente, Chen et al. (2015) así como Chiesa et al. (2016), describieron la mutación encontrada por este estudio en G6641A, la cual es una mutación sinónima en una hoja plegada beta de la estructura de la proteína L1, por lo que no está asociada a ningún cambio estructural de la proteína ni a un incremento en la persistencia de la variante.

De tal manera que, a través del presente análisis de polimorfismos de nucleótidos simple a las 10 secuencias parciales de VPH16, 58 y 52 encontradas no se logró identificar ninguna mutación, delección o inserción que conlleve algún cambio de aminoácido de la proteína L1 de la cápside del virus. Muy probablemente esto se dio a causa de la limitada cantidad de secuencias estudiadas, las cuales no son representativas de los grupos étnicos analizados.

8.3 Limitaciones del estudio

La limitación principal de esta tesis resulta en la baja eficiencia de recuperación de secuencias del virus de VPH de las 37 muestras restantes, tomando en cuenta que 4 muestras no pertenecían al genotipo de interés, como se había identificado en el 2008. De tal manera que, a pesar de ser el primer estudio en el Ecuador en donde se realiza un análisis filogenético de variantes y un estudio de polimorfismos de nucleótido simple de los genotipos de VPH en etnias características del país, tan solo se logró

recuperar 10 secuencias, de las cuales, 7 pertenecían a VPH16, 2 a VPH58 y 1 a VPH52. Esto restringió la posibilidad de relacionar las variantes encontradas con la posible filogeografía del virus en el país y, adicionalmente, impidió hallar SNPs de relevancia e inclusive nuevas variantes.

De ese modo, el número de muestras conseguidas en el estudio como positivas no resultan significativas o representativas de lo que se podría verdaderamente encontrar en las variantes del VPH dentro de las etnias Chachi y afroecuatoriana de la costa norte del Ecuador.

Adicionalmente, para la identificación de las variantes circulantes en aquel grupo de mujeres, otra de las limitaciones del estudio yace en el hecho de no se pudo identificar con certeza el sublinaje de las variantes pertenecientes a los genotipos VPH52 y VPH16 puesto que para ello, es necesario un número mayor de pares de bases para la creación de las relaciones filogenéticas de mayor resolución.

Finalmente, no se tienen datos completos acerca del tipo de lesión sobre la cual se extrajeron las muestras empleadas en este estudio. De tal forma, no se pueden realizar las correlaciones pertinentes entre el tipo de lesión y las variantes encontradas.

9. CONCLUSIONES

Se logró estudiar la variabilidad intratípica de 10 de las 47 muestras empleadas en este trabajo a través de un análisis filogenético, así como, a partir de un análisis de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) de las secuencias positivas para los genotipos de VPH16, 58 y 52.

A pesar de haber obtenido una baja eficiencia de amplificación del gen viral *L1*, se lograron caracterizar los linajes de las variantes de las 10 secuencias obtenidas en esta investigación. Se determinó que el linaje de las 7 secuencias provenientes tanto de mujeres de etnia Chachi y afro correspondientes al VPH16, pertenecen al linaje A. De igual manera, para el genotipo VPH52, la única muestra encontrada perteneciente a una mujer afroecuatoriana, fue clasificada dentro del linaje A. Interesantemente, para el genotipo VPH58 se logró determinar no solo el linaje de las 2 secuencias de origen Chachi y afroecuatoriano correspondientes a ese tipo específico de VPH, sino que también se pudo identificar el sublinaje de las mismas puesto que las relaciones filogenéticas indicaron que estas pertenecían a la variante A2, aunque una de ellas presentaba un SNP que la hacía ligeramente distinta a aquella variante.

A partir de aquello, esos resultados pudieron ser comparados con los observados por Mejía et al. (2015) en la población mestiza ecuatoriana y se pudo inferir que para las variantes encontradas del tipo VPH16, podría haber una relación entre región geográfica e infección de variantes que se extiende a todo el territorio nacional, puesto que, variantes con el mismo linaje A o Europeo (E) y con un posible sublinaje (A1 o A4), parecerían infectar tanto a mujeres de etnia Chachi, afroecuatoriana y mestiza.

Por otra parte, debido a las escasas secuencias recuperadas pertenecientes a los genotipos VPH58 y VPH52, no se puede llegar a ninguna conclusión certera. Más estudios son necesarios en los cuales se amplíe el número de secuencias para estos dos genotipos, de tal manera que se pueda conocer si las mismas variantes correspondientes a estos tipos de VPH se encuentran infectando tanto a mujeres Chachi, afroecuatorianas y mestizas en todo el Ecuador.

En cuanto al análisis de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) para las 10 secuencias, tan solo se encontró una mutación sinónima asociada a una hoja beta plegada de la estructura de la proteína L1 de la cápside del virus para el genotipo de VPH58 en G6641A en una muestra de una mujer Chachi, que no lleva a ningún cambio significativo de la misma. Las 9 muestras restantes correspondientes a los tipos de VPH16 y 52, presentaron secuencias idénticas a las de referencia, como ocurre en la mayoría de análisis de SNPs en estudios de variabilidad genética de VPH.

10. RECOMENDACIONES

La recomendación principal para mejorar el estudio es aumentar el número de muestras con monoinfecciones de los tipos más frecuentes en la población de mujeres Chachi y afroecuatorianas de la costa norte del país, con muestras frescas de raspados cervicales. Eso aumentaría la eficiencia de amplificación y se podría obtener un número de muestras representativas de aquellas etnias para poder tener conclusiones concretas y más amplias sobre los linajes y sublinajes de los genotipos de VPH más comunes. Consecuentemente, se podrían obtener resultados más prometedores

acerca de polimorfismos de nucleótidos simple (SNPs) que existen en las variantes que infectan a aquellas dos etnias. Adicionalmente, se podrían conseguir datos más detallados sobre la edad de las mujeres y tipo de lesión, las cuales permitirían realizar más correlaciones entre el tipo de variante que se encuentra infectando a esas mujeres, para obtener un entendimiento más amplio de su comportamiento en estas dos etnias así como en las mujeres mestizas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aho, J., Hankins, C., Tremblay, C., Lang, C., Franz, L., Forest, P., . . . Group, C. W. (2003). Molecular Analysis of Human Papillomavirus Type 52 Isolates Detected in the Genital Tract of Human Immunodeficiency Virus–Seropositive and –Seronegative Women. *The Journal of Infectious Diseases*(188), 1517–27.
- Al-Awadhi, R., Chehadeh, W., & Kapila, K. (2011). Prevalence of Human Papillomavirus Among Women With Normal Cervical Cytology in Kuwait . *Journal of Medical Virology* (83), 453–460 .
- Bayas, R., Ponce, K., Zapata, S., Mosquera, J., Navarrete, D., Mejía, L., & Munoz, D. (2008). Human Papiloma Prevalence in Chachi and Afroecuadorian women. (*Documento inédito*). Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito.
- Bernard, H. (2013). Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent developments. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 357-361.
- Brown, C. R., Leon, M., Muñoz, K., Faigioni, A., Amador, L., Frain, B., . . . Brown, D. (2009). Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic. *Braz J Med Biol Res*, 42(7), 629-636.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., . . . Sanjosé, S. (2016). *ICO INformation Centre on HPV and Cancer*. Recuperado el 26 de Febrero de 2017, de ICO INformation Centre : <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
- Burk, R., Harari, A., & Chen, Z. (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445, 232-243.
- Calleja-Macías, I., Villa, L., Prado, J., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, L., . . . Bernard, H. (2005). Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31, 35, 52, and 58, Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16. *Journal of Virology*, 79(21), 13630–13640.
- Chan, P. K., Luk, A. C., Park, J., Smith-McCune, K. K., Palafsky, J. M., Konno, R., . . . Cheung, J. (2011). Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. *J Infect Dis*, 11(203), 1565-73.

- Chen, Z., Ho, W., Boon, S., Law, P., Chan, M., DeSalle, R., . . . Chan, P. (2017). . Ancient Evolution and Dispersion of Human Papillomavirus Type 58 Variants . *J. Virol.*, doi:10.1128/JVI.01285-17 .
- Chen, Z., Jing, Y., Wen, Q., Xianping, D., Zhang, S., Tao, W., . . . Zhang, J. (2016). L1 and L2 gene polymorphisms in HPV-58 and HPV-33: implications for vaccine design and diagnosis . *Virology Journal* (13), 167.
- Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Anastos, K., Segondy, M., . . . Burk, R. (2011). Evolution and Taxonomic Clasification of Human Papilomavirus 16 (HVP16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS ONE*, 6(5).
- Chiesa, I., Perez, M., Nuñez, G., & Pirola, D. (2016). Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina. *VirusDis.*, 27(1), 41-47.
- Cullen, M., Boland, J., Schiffman, M., Zhang, X., Wentzensen, N., Yang, Q., . . . Mirabello, L. (2015). Deep sequencing of HP16 genomes: A new high-throughput tool for exploring the carcinogenicity and natural history of HPV16 infection. *Papillomavirus Research*, 1, 3-11.
- García, G., García, L., Burgos, R., Almeida, F., & Ruiz, J. (2016). Genotypes distribution of human papillomavirus in cervical samples of Ecuadorian women. *Rev. bras. epidemiol*, 19(1).
- Holmes, E. (s.f.). Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Rev Microbiol*, doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162912.
- IARC. (1995). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon: Human Papillomaviruses.
- ICO. (19 de 04 de 2017). *Ecuador: Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2017*. Recuperado el 27 de 05 de 2017, de HPV Centre: http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/EQU_FS.pdf
- Invitrogen. (2017). *PureLink Quick Gel Extraction Kit*. Recuperado el 04 de Marzo de 2017, de ThermoFisherScientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K210012>

- King, A., Sonsma, J., Vriend, H., van der Sande, M., Ferltkamp, M., Boot, H., & Koopmans, M. (2016). Genetic Diversity in the Major Capsid L1 Protein of HPV-16 and HPV-18 in the Netherlands. *PLOS ONE*, *11*(4), e0154977.
- Lopera, E., Baena, A., Florez, V., Montiel, J., Duque, C., Ramirez, T., . . . Sánchez, G. (2014). Unexpected inverse correlation between Native American ancestry and Asian American variants of HPV16 in admixed Colombian cervical cancer cases. *Infection, Genetics and Evolution*, *28*, 339-348.
- Markowitz, L., Dunne, E., Saraiya, M., Chesson, H., Curtis, C., Gee, J., & Unger, E. (2014). Human Papillomavirus Vaccination: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*(63), 1-30.
- Mejía, L., Muñoz, D., Trueba, G., Tinoco, L., & Zapata, S. (2015). Prevalence of Human Papillomavirus Types in Cervical Cancerous and Precancerous Lesions of Ecuadorian Women. *Journal of Medical Virology*.
- NIH. (19 de Febrero de 2015). *HPV and Cancer*. Recuperado el 11 de Mayo de 2017, de National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-fact-sheet>
- Saghai-Marooof, M., Soliman, K., Jorgensen, R., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics. *PNAS*, *8*, 8014-8018.
- Schiffman, M., Doobar, J., Wentzensen, N., Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B., . . . Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews*, *2*, 1-26.
- Shadan, F., & Villarreal, L. (1993). Coevolution of persistently infecting small DNA viruses and their hosts linked to host-interactive regulatory domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *90*, 4117-4121.
- Sotlar, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., . . . Bultmann, B. (2004). Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 3176-3184.
- Steben, M., & Duarte-Franco, E. (2007). Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*, *107*, S2-S5.

- Stratton, K., & Culking, D. (2016). A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. *Oncology Journal*, 1-2.
- Sun, Z., Lu, Z., Liu, J., Wang, G., Zhou, W., Yang, L., . . . Ruan, Q. (2012). Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 in women from Northeast China. *Int J Mol Sci*, 15(13), 14962-72.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). EGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. . *Molecular Biology and Evolution* , 24, 1596-1599.
- Tornesello, L., Buonaguro, L., Izzo, S., Lopez, G., Vega, X., Maldonado, C., & Buonaguro, M. (2008). A Pilot Study on the Distribution of Human Papillomavirus Genotypes and HPV-16 Variants in Cervical Neoplastic Lesions From Ecuadorian Women . *Journal of Medical Virology*(80), 1959–1965 .
- Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H., & zurHausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- World Health Organization. (2016). *Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
- Zaravinos, A., Mammas, I., Sourvinos, G., & Spandidos, D. (2009). Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *The International Journal of Biological Markers*, 24(4), 215-222.
- Zhang, C., Park, J., Grce, M., Hibbitts, S., Palefsky, J., Konno, R., . . . Magure, T. (2014). Geographical Distribution and Risk Association of Human Papillomavirus Genotype 52-Variant Lineages. *The Journal of Infectious Diseases*, 1600-1604.
- Zheng, Z., & Baker, C. (2006). PAPILOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. *Front Biosci*(11), 2286–2302.
- zurHausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical applications. *Nat Rev Cancer*, 2.

12. ANEXOS

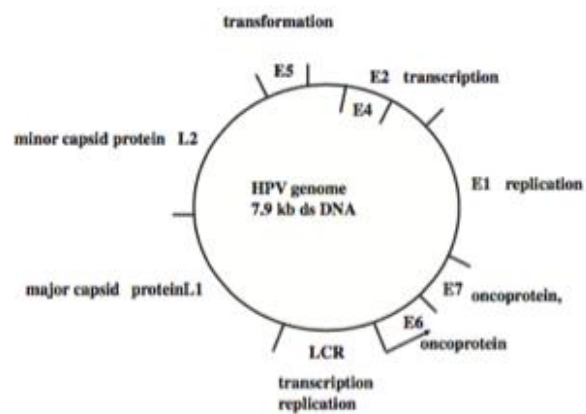


Figura 1: Distribución genética del VPH (Bernard, 2013).

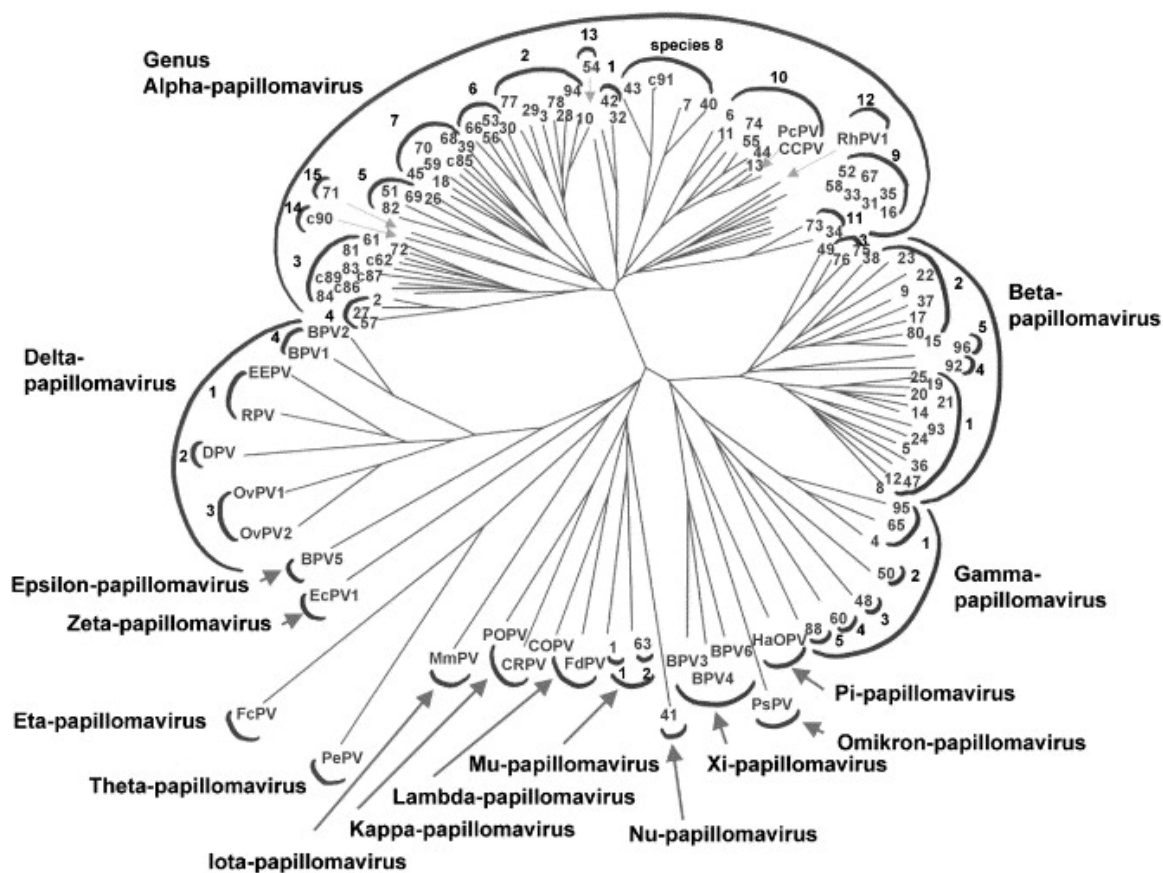


Figura 2: Árbol filogenético de 118 secuencias de VPHs a partir de secuencias de la región del gen L1 (Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zurHausen, 2004).

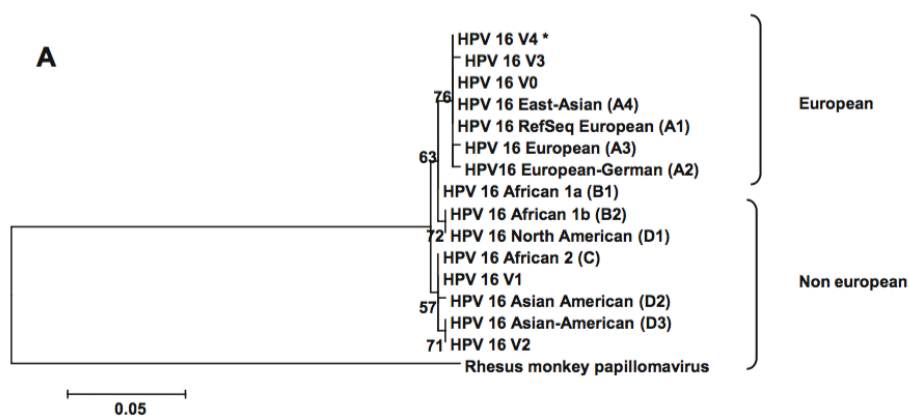


Figura 3: Relaciones filogenéticas de las variantes del virus del VPH16 realizado por Chiesa et al., (2015).

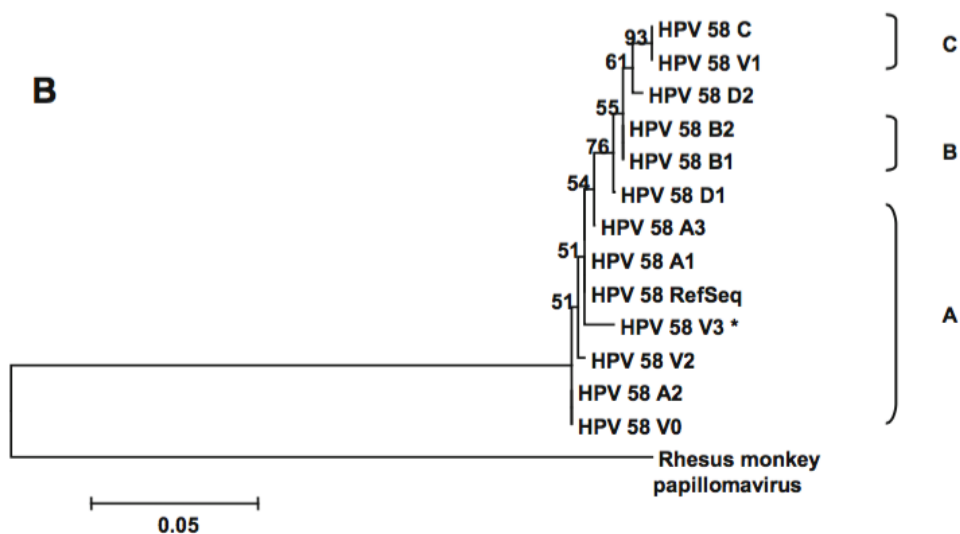


Figura 4: Relaciones filogenéticas de las variantes del virus del VPH58 realizado por Chiesa et al., (2015).

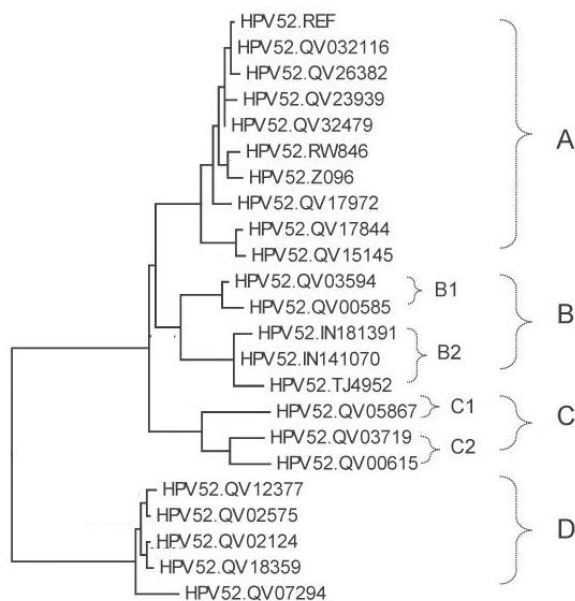


Figura 5: Relaciones filogenéticas de las variantes del virus del VPH52 realizado por Chen et al. (2011).

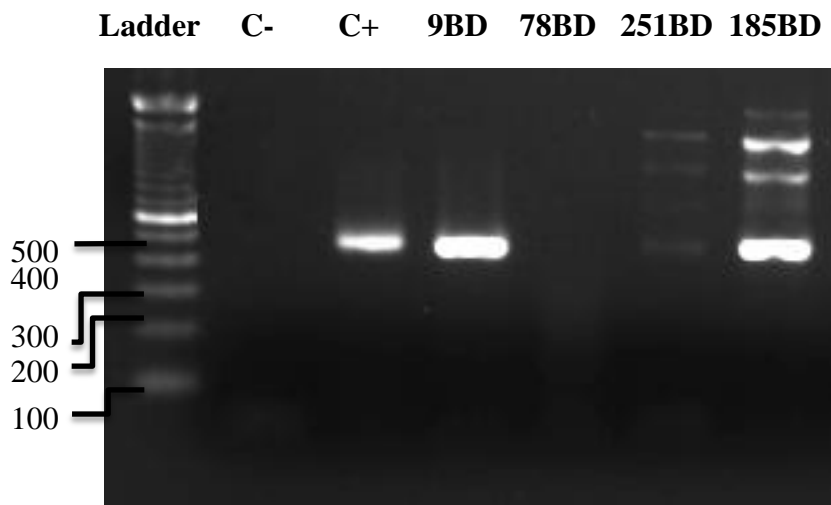


Figura 6: Resultado de la visualización de amplicones del gen L1 de 450 pares de bases en gel de agarosa al 1.5% de 4 muestras (9BD, 78BD, 251BD y 185BD) así como el control positivo (C+) y negativo (C-).

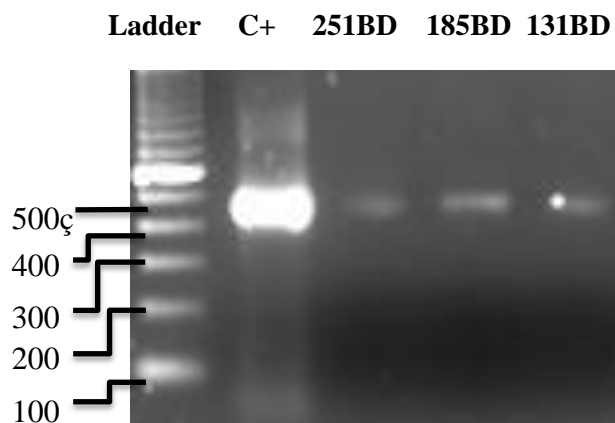


Figura 7: Resultado de la visualización de amplicones purificados a partir de extracción de banda de gel de agarosa del gen L1 de 450 pares de bases en gel de agarosa al 1.5%

Código en Base de Datos	Código en Árbol Filogenético	HPV	Secuencia	Pares de Bases	Query	Identidad
1	8BD	AfroecBorbónTiguinza	AAGTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGG TGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTA GACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTATTATGACCCTG TAGGTCTGCAGAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAA AAGTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGG TGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTA GACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTATTAT	388	100%	99%
2	22BD	ChBorbónMatadePlátano	GAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAAAAGTGT ATTTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTTGTA ATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTT GTAGACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTATTAT	422	99%	99%
3	181BD	ChMaldonadol	GAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAAAAGTGT ATTTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTTGTA ATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTT GTAGACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTATTAT	359	100%	100%
4	185BD	AfrecMaldonadol	16 GAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAAAAGTGT ATTTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTTGTA ATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTT GTAGACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTATTAT	342	100%	100%
5	222BD	ChZapallo	TTCTTTAGGTGCTGGAGGTTATGTTTTGACAAGCA ATTGCCTGGGATGTTACAAACCTATAAGTATCTTCTA GTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGACCAAAATCCA GTCCTCCAAAATAGTGAATTCATAGAATGTATGTAT GTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTT GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGTGCG TAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTT TCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTG TACTGC TGCAGAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAAA GTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAG GTGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTAC AAACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGA GGTTGTAGACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGG AATTCATAGAATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGT TAAGGTTATTTTGCACAGTTGAAAAATAAACTGTA TCATATTCCTCCCATGTGCGTAGGTACTCCTTAAAGT TAGTATTTTTATATGTAGTT	302	100%	100%
6	244BD	ChLomaLindall	TTCTTTAGGTGCTGGAGGTTATGTTTTGACAAGCA ATTGCCTGGGATGTTACAAACCTATAAGTATCTTCTA GTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGACCAAAATCCA GTCCTCCAAAATAGTGAATTCATAGAATGTATGTAT GTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTT GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGTGCG TAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTT TCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTG TACTGC TGCAGAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAAA GTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAG GTGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTAC AAACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGA GGTTGTAGACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGG AATTCATAGAATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGT TAAGGTTATTTTGCACAGTTGAAAAATAAACTGTA TCATATTCCTCCCATGTGCGTAGGTACTCCTT TAGGTCTGCAGAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAA AAGTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGG TGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTA GACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTAT	291	100%	99%
7	251BD	ChLomaLindal	TTCTTTAGGTGCTGGAGGTTATGTTTTGACAAGCA ATTGCCTGGGATGTTACAAACCTATAAGTATCTTCTA GTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGACCAAAATCCA GTCCTCCAAAATAGTGAATTCATAGAATGTATGTAT GTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTT GAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGTGCG TAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTT TCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTG TACTGC TGCAGAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAAA GTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAG GTGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTAC AAACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGA GGTTGTAGACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGG AATTCATAGAATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGT TAAGGTTATTTTGCACAGTTGAAAAATAAACTGTA TCATATTCCTCCCATGTGCGTAGGTACTCCTT TAGGTCTGCAGAAAACTTTTCTTTAAATTTACTTCCCAAA AAGTGTATTTTTAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGG TGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAAAC CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTA GACCAAAATCCAGTCTCCAAAATAGTGAATTCATAGA ATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGC ACAGTTGAAAAATAAACTGTAATCATATTCCTCCCATGT CGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTC TGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGACTG CGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCC AACAAATGCCATTAT	419	100%	100%

Figura 8: Tabla resumen sobre las 7 secuencias positivas para VPH16, donde se indican las secuencias, el número de pares de bases, porcentaje de cobertura e identidad de cada una de las muestras.

Código en Base de Datos	Código en Árbol Filogenético	HPV	Secuencia	Pares de Bases	Query	Identidad
8	9BD	ChBorbónLomaChachi	ACTGATCTAGATCTGCAGAAAACCTTTTCCTTTAAGTT AACCTCCAAAAAGTATATTTATTTAATGGATCTTCC TTTTCTTTAGGGGGTGTGTTTTTTGGCAAGTAATAG CCTGGGAGGTAACAAATCTATATGTGTCTGTAAACT GGCAGACGGAGGAGGTGTTAAACCAAATTGCCAGTCC TCCAAAATATTGGAATCCATAGTATGTATATATGTCA TTATCTCTGCAGTTAGTGTAATTTTGCAAAGCTGAAA AACAACTGTAAGTCATATTCCTCAACATGACGTACA TATTCCTTAAAATTATCATTATTTATATGTACCTCCT TAGTTACTTCAGTGCATAATGTCATATTAGTGCTACG AGTGGTATCAACTACGGTAACAAATAACTGATTGCC CAGCAAATGCCATTGT TGGATCTTCCTTTCTTTAGGGGGTGTGTTTTTTGGCAAG TAATAGCCTGGGAGGTAACAAATCTATATGTGTCTGTAA ACTGGCAGACGGAGGAGGTGTTAAACCAAATTGCCAGTC CTCCAAAATATTGGAATCCATAGTATGAATATATGTCATTA TCTCTGCAGTTAGTGTAATTTTGCAAAGCTGAAAAACAAA CTGTAAGTCATATTCCTCAACATGACGTACATATTCCTTAA AATTATCATTTTTATATGTACCTCCTTAGTTACTTCAGTGC ATAATGTCATATTA	423	100%	100%
9	131BD	AfroecSanMiguel	58	298	100%	100%

Figura 9: Tabla resumen sobre las 2 secuencias positivas para VPH58, en donde se indican las secuencias, el número de pares de bases, porcentaje de cobertura e identidad de cada una de las muestras.

Código en Base de Datos	Código en Árbol Filogenético	HPV	Secuencia	Pares de Bases	Query	Identidad	
10	144BD	AfroecSanAugustíndelMaría	52	GGGATACTGATCTAAATCTGCAGAAAACCTTTCTTTT AAATCCACCTCCAAAACATATAGTCCTTTAAAGGAT CTTCCTTTCCCTTAGGTGGTGTGTTTTTTTGACAAGT TATAGCAGTAGAAGTGACAAATCTGTATGTGTCCTCC AAAGATGCAGACGGTGGTGGGGTAAGGCCAAATTGCC AGTCCTCTAAAATAGTGGCATCCATCTTATGAATGTA TGTCATAACATCAGCTGTTAATGTAATTTGCACAAT TGAAAAATAAATTGTAATCAAATTCCTCGCCATGAC GAAGGTATTCCTTAAAATTTTCATTTTTATATGTGCT TTCTTTTTAACCTCAGCACATAAAGTCATGTTAGTG CTACGAGTGGTATCCACAACCTGTGACAAACAACCTGAT TGCCCCAACATATGCCATTATTATGACCCTGG	439	100%	100%

Figura 10: Tabla resumen sobre la secuencia positiva para VPH52, en donde se indican la secuencia, el número de pares de bases, porcentaje de cobertura e identidad de la misma.

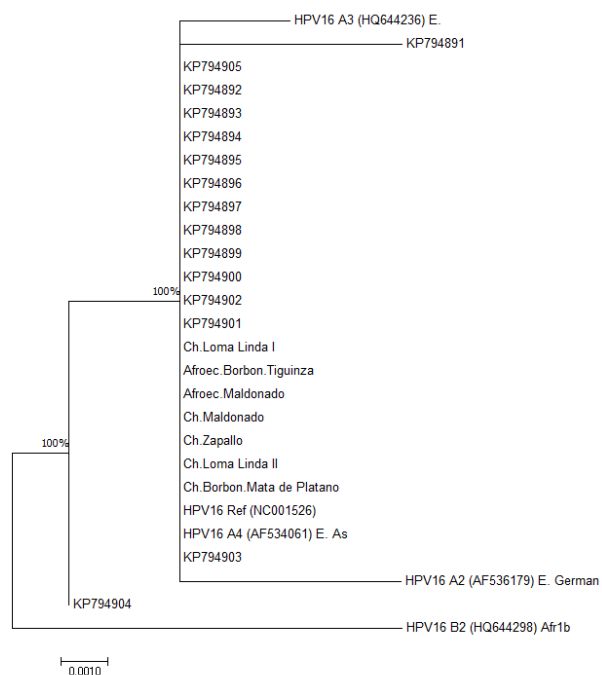


Figura 11: Resultado del análisis filogenético de *Maximum Likelihood* de las variantes de VPH16 con un promedio de 360 pares de bases, empleando un modelo de Tamura 92 por 100 replicaciones. Las secuencias de referencia para la creación del árbol extraídas del GenBank se encuentran mencionadas junto con su respectivo código en las etiquetas de las ramas correspondiente a cada variante. Las muestras pertenecientes a este estudio, por otro lado, se encuentran denotadas con la etnia y el origen de cada muestra. La secuencia de referencia NC001526 corresponde a la variante A1, mientras que las secuencias cuya denominación inicia con KP pertenecen a las variantes encontradas por Mejía et al. (2015) para este genotipo.

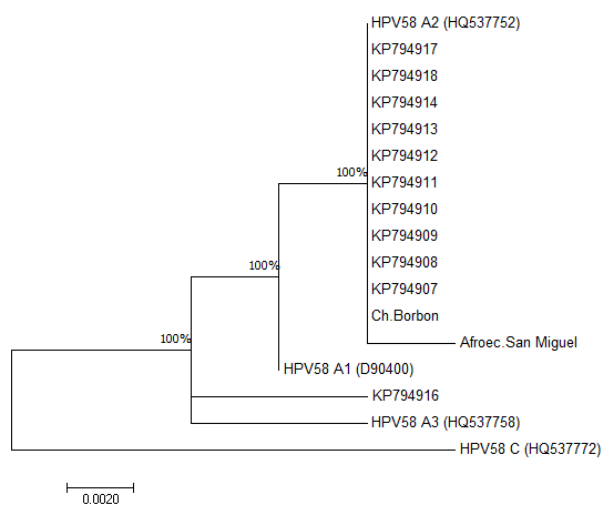


Figura 12: Resultado del análisis filogenético de *Maximum Likelihood* de las variantes de VPH1658 con un promedio de 360 pares de bases, empleando un modelo de Tamura 92 por 100 replicaciones. Las secuencias de referencia para la creación del árbol extraídas del GenBank se encuentran mencionadas junto con su respectivo código en las etiquetas de las ramas correspondiente a cada variante. Las muestras pertenecientes a este estudio, por otro lado, se encuentran denotadas con la etnia y el origen de cada muestra. Las secuencias (KP7949··) pertenecen a las variantes encontradas por Mejía et al. (2015) para este genotipo.

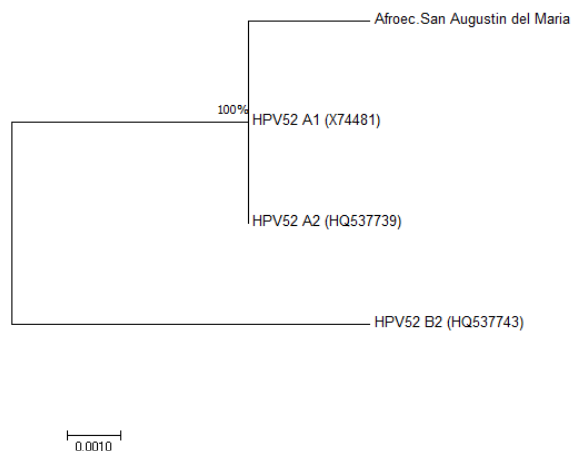


Figura 13: Resultado del análisis filogenético de *Maximum Likelihood* de las variantes de VPH52 con 439 pares de bases, empleando un modelo de Tamura 92 por 100 replicaciones. Las secuencias de referencia para la creación del árbol extraídas del GenBank se encuentran mencionadas junto con su respectivo código en las etiquetas de las ramas correspondiente a cada variante. Las muestras pertenecientes a este estudio, por otro lado, se encuentran denotadas con la etnia y el origen de cada muestra.

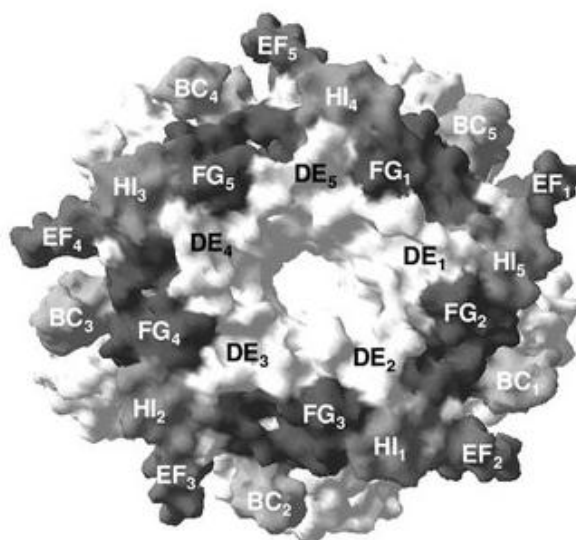


Figura 14: Estructura molecular de una proteína mayor L1 de la cápside icosaédrica del virus del VPH (Sun, et al., 2012).

Tabla 1: Listado de las 10 muestras correspondientes a monoinfecciones de los tipos de virus de VPH más prevalentes en Ecuador (VHP16, 58 y 52), en donde se especifica el código en la base de datos, la etnia, la localidad y la conformación del genotipo de VPH luego de una secuenciación de cada muestra.

	Código de la muestra	Etnia	Localidad	Genotipo de VPH según secuenciación
1	8BD	Afroecuatoriana	Borbón. Tiguinza	16
2	131BD	Afroecuatoriana	San Miguel	58
3	144BD	Afroecuatoriana	San Agustín del María	52
4	185BD	Afroecuatoriana	Maldonado	16
5	9BD	Chachi	Borbón	58
6	22BD	Chachi	Borbón. Mata de Plátano	16
7	181BD	Chachi	Maldonado	16
8	222BD	Chachi	Zapallo	16
9	244BD	Chachi	Loma Linda	16
10	251BD	Chachi	Loma Linda	16

Tabla 2: Análisis de polimorfismo de nucleótido simple para las secuencias correspondientes a al genotipo de VPH 58.

Posición nucleotídica de la región L1	6641	6697	6798	6828
HPV 58 Ref (D90400.1)	G	G	A	A
AfroecSanMiguel	A	-	-	-
ChBorbónLomaChachi	-	-	-	-