

REPÚBLICA DE CUBA  
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE CAMAGÜEY  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Estudio molecular del virus del papiloma humano en pacientes con lesiones  
intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino en Camagüey

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias  
Médicas

Dr. Juan Carlos Piña Napal

Camagüey

2024

REPÚBLICA DE CUBA  
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE CAMAGÜEY  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Estudio molecular del virus del papiloma humano en pacientes con lesiones  
intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino en Camagüey

Autor: Dr. Juan Carlos Piña Napal\*

Tutor: Dr. C. Clara García Barrios\*\*

Co-Tutor: Dr. C. Yudira Soto Brito \*\*\*

\*Especialista II grado en Bioquímica Clínica. Master en Genética Médica.  
Profesor Asistente.

\*\*Doctora en Ciencias Médicas. Especialista II grado en Anatomía Humana.  
Profesor Titular.

\*\*\*Doctora en Ciencias de la Salud. Licenciada en Microbiología. Master en  
Virología. Investigador y Profesor Titular.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias  
Médicas

Camagüey

2024

## **AGRADECIMIENTOS**

Al pensar en el tiempo transcurrido desde que inició esta investigación y en todos los que me apoyaron de alguna forma, vienen a mi mente los nombres de tantos compañeros:

A los ginecólogos de la consulta de patología de cuello, el Dr. C. Gustavo Crespo Campos y el Dr. Reguald Tamayo Castro; a los expertos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey, Dr. C. Arturo Junco Barranco, Dr. C. Rolando Morán Valdivia; a los investigadores del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Dr C. Rafael Fando Calzada, Dra C. Elsa Pimienta Rodríguez, Lic. Yunier Serrano Rivero.

A mis colegas de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey (UCM-C), Lic. Elizabeth Nicolau Pestana, Lic. Lídyce Quesada Leyva del Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI), a los especialistas en bioestadística Dra. Mayelín Hernández Rodríguez, Dr. Iván Antonio Quiñones Borrel del departamento de informática médica, a las profesoras Lic. Rebeca González Escobar y a la Dra. C. Mercedes Caridad García González.

Especial agradecimiento a mis tutores de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey, Dra. C. Clara García Barrios y Dr. C. Arturo Menéndez Cabezas por el apoyo y sus certeras sugerencias. Particular agradecimiento a mi tutora, Dra C. Yudira Soto Brito, excelente profesional e investigadora del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), por su inestimable contribución en la realización de este trabajo, sin ella habría sido imposible terminarlo, por su tiempo y disposición a pesar de tantos obstáculos. A todos muchas gracias.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, mi hija, mi madre, hermano, mi sobrina, Gaby, mi sobrino Yusmel, a mi tía Isabel, a mi cuñada Jeannette, en especial a los que ya no están, mis queridos abuelos, mi querido tío José y a mi querido padre, fuente inspiradora y eterna de mi inquietud por el saber.

A mi esposa y amigos.

A mi inolvidable tutor, Dr. C. Arturo Menéndez Cabezas, donde quiera que puedas estar, profesor y amigo.

## COLABORADORES PRINCIPALES

1. Ministerio de Salud Pública de Cuba.
2. Hospital Provincial Docente Ginecobstétrico de Camagüey "Ana Betancourt de Mora"
3. Hospital Oncológico Provincial Docente de Camagüey "Maria Curie"
4. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba
5. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), La Habana, Cuba

## SÍNTESIS

El cáncer cervicouterino es considerado el cuarto cáncer más frecuente en mujeres de todo el mundo, con 604 127 nuevos casos cada año. En Cuba y en la provincia Camagüey se aprecia un incremento del número de pacientes diagnosticados. Se realizó un estudio transversal analítico con el objetivo de explicar las características moleculares de los virus del papiloma humano que infectan pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino en Camagüey. La presente investigación aporta resultados a partir de 78 muestras de pacientes atendidas en la consulta de patología de cuello, se utilizaron las técnicas de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, secuenciación y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Fueron identificados por primera vez en pacientes de Camagüey, los genotipos del virus del papiloma humano 6 (5,7%), 11 (3,8%), 16 (67,9%), 18 (11,3%), 31 (18,9%), 33 (7,5%), 52 (7,5%) y 58 (15,1%), de los cuales el 16 y el 18 tuvieron mayor carga viral. Se identificaron linajes y sublinajes del genotipo 16, de acuerdo con su origen geográfico, predominando los sublinaje europeos A1, A2, A3, seguidos del asiático A4, africano B1 y norteamericano D1, estos pueden ser utilizados como biomarcadores de severidad asociados a lesiones de alto grado y mal pronóstico.

<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Justificación del estudio.....	3
1.3 Problema de investigación .....	5
1.4 Objeto de estudio .....	5
1.5 Hipótesis de investigación .....	5
1.6 Diseño metodológico general de la investigación.....	5
1.7 Objetivos .....	7
1.7.1 Objetivo general.....	7
1.7.2 Objetivos específicos .....	7
1.8 Beneficios esperados de esta investigación.....	8
1.9 Límites del alcance de la investigación .....	8
1.10 Novedad científica .....	9
2. DESARROLLO .....	10

2.1 Panorámica de los problemas actuales en la identificación molecular del VPH..	10
2.1.1 Valoración del contexto local, nacional y mundial .....	10
2.1.2 Carencia que se quiere llenar con la investigación.....	14
2.2 CAPÍTULO I. Biología molecular del virus del papiloma humano.....	17
2.2.1 Objetivo del capítulo .....	17
2.2.2 Virus del papiloma .....	17
2.2.2.1 Familia, género y clasificación de los virus del papiloma.....	17
2.2.2.2 Estructura y organización genómica de los VPHs .....	18
2.2.2.3 Funciones de las proteínas genómicas en el VPH .....	22
2.2.3 Mecanismos de transformación cancerosa utilizados por el VPH .....	27
2.2.4 Conclusiones del capítulo I.....	43
2.3 CAPÍTULO II. Diseño metodológico .....	45
2.3.1 Objetivo del capítulo .....	45
2.3.2 Diseño metodológico de la investigación.....	45
2.3.2.1 Universo .....	46
2.3.2.1.1 Criterios diagnósticos .....	46
2.3.2.1.2 Criterios de inclusión .....	48



2.3.2.1.3 Criterios de exclusión .....	48
2.3.2.1.4 Criterios de salida .....	48
2.3.2.2 Técnica de recogida de la información .....	49
2.3.2.3 Operacionalización de las variables .....	49
2.3.2.4 Procesamiento de las muestras clínicas.....	49
2.3.2.4.1 Técnicas y procedimientos para la toma de muestras.....	49
2.3.2.4.2 Extracción del ADN de las muestras .....	49
2.3.2.4.2.1 Protocolo Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega Corporation .....	50
2.3.2.4.2.2 Protocolo Allprep DNA/RNA Mini kit QIAGEN .....	51
2.3.2.5 Tipificación del virus del papiloma humano .....	52
2.3.2.5.1 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	52
2.3.2.5.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR convencional) ....	52
2.3.2.5.1.2 Análisis de restricción del fragmento amplificado por PCR .....	54
2.3.2.5.1.3 Algoritmo diagnóstico para la tipificación de los virus del papiloma humano .....	55
2.3.2.5.1.4 Procedimientos para el análisis con enzimas de restricción .....	56

2.3.2.5.2	Secuenciación nucleotídica del producto de la reacción en cadena de la polimerasa.....	57
2.3.2.5.3	PCR en Tiempo Real (qPCR) .....	58
2.3.2.6	Cuantificación de carga viral de los genotipos VPH en las muestras de las pacientes .....	60
2.3.2.7	Análisis filogenético para el VPH 16 .....	60
2.3.2.8	Procesamiento de los datos .....	61
2.3.2.9	Consideraciones éticas.....	61
2.3.3	Conclusiones del capítulo II .....	63
2.4	CAPÍTULO III. Caracterización molecular de los virus del papiloma humano presentes en muestras de mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey.....	64
2.4.1	Objetivo del capítulo .....	64
2.4.2	Resultados y discusión.....	64
2.4.2.1	Características generales de la población estudiada.....	64
2.4.2.2	Características generales de las pacientes positivas al virus del papiloma humano.....	65
2.4.2.3	Identificación molecular del virus del papiloma humano en las pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino .....	73

2.4.2.3.1 Purificación de ADN genómico a partir de las muestras de pacientes con CCU.....	73
2.4.2.3.2 Tipificación de los virus del papiloma humano (VPH).....	74
2.4.2.3.2.1 Estudio de los VPH mediante Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).....	74
2.4.2.3.2.2 Confirmación del RFLP por secuenciación nucleotídica.....	76
2.4.2.3.2.2.1 Procesamiento, ensamblado y alineamiento de secuencias.....	77
2.4.2.3.2.3 Estudio de los VPH mediante PCR en Tiempo Real (qPCR).....	78
2.4.2.3.2.4 Frecuencias de infección y genotipos VPH identificados en los pacientes en el periodo de estudio.....	78
2.4.2.4 Asociación entre la infección por el virus papiloma humano y algunas variables clínicas epidemiológicas .....	86
2.4.2.5 Infecciones múltiples por virus del papiloma humano.....	88
2.4.2.6 Cuantificación de la carga viral del VPH en las muestras clínicas.....	90
2.4.2.7 Análisis filogenético de la región secuenciada del gen L1 del VPH-AR 16, a partir de muestras de las pacientes de la provincia Camagüey .....	93

2.4.2.7.1 Análisis filogenético para los pacientes jcp003, jcp004, jcp005, jcp007, jcp008 .....	94
2.4.2.7.2 Análisis filogenético para los pacientes H11, H12, H13, H14, H16, H19, H20 y H21.....	95
2.4.3 Conclusiones del capítulo III.....	101
3. CONCLUSIONES GENERALES.....	102
4. RECOMENDACIONES .....	103
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	
6. ANEXOS.	

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

El cáncer cervicouterino (CCU) es considerado el cuarto cáncer más frecuente en mujeres de todo el mundo, con 604 127 casos nuevos cada año, de este número elevado, mueren unas 341 831 mujeres que representa el 56,6 %; cerca del 90 % ocurren en países de bajos y medianos ingresos.<sup>1, 2, 3</sup>

Se distingue la región asiática que en el año 2020 fue la de mayor número de mujeres diagnosticadas de CCU con 351 720 de casos nuevos, y 199 902 fallecidos, lo que representa el 56,9 %.<sup>4</sup> En esta área geográfica se destacan en orden descendente la India, la República Popular China, Japón y la República Popular de Corea.<sup>5, 6, 7, 8</sup>

El África es la siguiente región más afectada por el CCU con 117 316 casos nuevos y 76 745 fallecidos para un 65,4 %.<sup>9</sup> Resaltan en este continente Nigeria, Sudáfrica, la República Unida de Tanzania y otros países de este continente que, muestran también un número elevado de pacientes, como la República Democrática del Congo y Etiopía.<sup>10, 11, 12, 13,14</sup>

En el año 2020 se diagnosticaron en Europa 58 169 nuevos casos y 25 989 defunciones, lo que constituyó el 44,7 % del total,<sup>15</sup> sobresalen en esta localización geográfica Alemania, Reino Unido, Francia y España.<sup>16,17,18,19</sup>

Para la región de las Américas y el Caribe, como consecuencia del crecimiento poblacional y su envejecimiento, se estima que para el año 2025 llegarán hasta 126 000 los nuevos casos.<sup>20</sup> Desafortunadamente en este continente se presentaron unas 59 439 pacientes en el año 2020, y murieron

por esta causa una cantidad de mujeres bastante elevada y nada despreciable, con una cifra que alcanzó el 53,1 % de las mismas.<sup>21</sup>

El CCU es considerado un problema de salud en Brasil y los Estados Unidos, porque son los dos países que resaltan en América por el número de diagnosticados,<sup>22, 23</sup> seguidos en orden decreciente por México, Argentina y la República Bolivariana de Venezuela.<sup>24, 25, 26</sup>

En el Caribe la incidencia para el año 2020, fue de unos 3 857 diagnosticados y fallecieron por esta causa el 64,7 %.<sup>27</sup> De las islas del Caribe, Cuba es el país de mayor extensión territorial y población, constatándose que el número de pacientes confirmadas con CCU, en el transcurso de los años, tiende al aumento. Basta decir que en el año 1994 se reportaron 810 casos nuevos, para 2016 ascendieron hasta 1 098,<sup>28</sup> y entre los años 2020 al 2022 hubo 2 147 nuevas pacientes.<sup>29</sup>

Los reportes en la provincia Camagüey muestran, de la misma forma, un incremento en el número de pacientes con CCU. Esta provincia se mantuvo por muchos años como una de las de mayor incidencia, los registros del número de pacientes, y los datos actuales reportan 327 casos entre los años 2010 y 2014 y del mismo modo, unos 288 pacientes entre el 2016 y el 2018; finalmente para el año 2022 fueron registrados 81 mujeres (dato preliminar)<sup>30</sup>

El CCU se clasifica, de acuerdo con sus características histológicas, en adenocarcinoma, en carcinoma adenoescamoso y en carcinoma de células escamosas. Este último es el más común.<sup>31</sup>

Al examinar los factores predisponentes asociados al CCU,<sup>32, 33</sup> pueden

enunciarse los siguientes:

- Relaciones sexuales tempranas.
- Multiparidad.
- Niveles socioeconómicos y educacionales bajos.
- Uso prolongado de dispositivos intrauterinos (DIU).
- Tabaquismo.
- Comportamiento sexual inadecuado (promiscuidad).
- Manipulaciones ginecológicas y obstétricas excesivas.
- Infección por el virus de papiloma humano.

Sin embargo, en los últimos años se pudo corroborar, la fuerte relación causal que existe entre el virus del papiloma humano (VPH) y el desarrollo del CCU.<sup>34,35</sup> En más de 99 % de los casos, incluso hasta en 99,7 % de los carcinomas de cuello uterino,<sup>36, 37</sup> se comprobó la presencia del genoma de un VPH de alto riesgo (VPH-AR), lo que indica que su intervención es casi obligatoria.<sup>38</sup>

Esta cuantiosa incidencia y demostrada asociación, hoy en día es bien conocida entre los investigadores. No es posible omitir el aporte de Harald Zur, quien había planteado desde el año 1984 que el VPH era un factor causal para el CCU y logró demostrarlo, razón por lo cual le fue concedido el Premio Nobel de Medicina en el año 2008.<sup>39</sup>

## **1.2 Justificación del estudio**

Como fue descrito en los antecedentes, existe una elevada incidencia del cáncer de cuello uterino en Cuba y en la provincia Camagüey. A pesar de la importante contribución que ha tenido la prueba citológica, también conocida

como prueba de Papanicolaou, en la prevención y en la disminución de la casuística y la mortalidad de esta enfermedad en muchos países, <sup>40, 41</sup> esta prueba tiene limitaciones fundamentales. Dentro de las limitaciones más notables están la pobre reproducibilidad y la baja sensibilidad; <sup>42,43</sup> como consecuencia de esta última, esta prueba puede llegar a tener desde un 30 % y hasta un 60 % de falsos negativos.<sup>44, 45, 46, 47</sup> Por otro lado, los estudios moleculares son métodos más sensibles y con ellos los falsos negativos pueden ser reducidos a un nivel tan bajo, en un rango de 1 a un 3 %. Además, estos estudios, a diferencia de la PP, pueden detectar y confirmar la presencia del ADN viral, tipificar su genotipo, así como determinar el número de copias y estado físico del virus dentro de las células infectadas.

<sup>36, 48</sup>

Es importante destacar que la tipificación del VPH tiene valor para el pronóstico y la terapéutica porque permite distinguir entre los VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, lo que a su vez facilita la selección de los pacientes con riesgo incrementado y efectuar acciones preventivas en ellos.<sup>37</sup>

En el mundo se han realizado numerosas investigaciones moleculares en la temática VPH y CCU, sin embargo en Cuba, no existe en la actualidad mucha información acerca de los aspectos moleculares que caracterizan los genotipos circulantes en las distintas provincias. Es importante destacar que los genotipos VPH circulantes en Camagüey eran desconocidos en el momento en que la presente investigación abordó por primera vez este tipo de estudio molecular, siendo el segundo en el país, después de la provincia La Habana, en evaluar este tipo de pacientes.<sup>49, 50, 51</sup>



Finalmente, es posible afirmar que estos resultados son útiles y necesarios para el diseño de vacunas preventivas cada vez más eficaces contra la infección por VPH-AR en Cuba, y al mismo tiempo representan un aporte a la epidemiología molecular de la enfermedad en el país, en relación con sus determinantes y las predicciones.<sup>49</sup>

### **1.3 Problema de investigación**

¿Cuáles son los genotipos circulantes, sus variantes intratípicas, la carga viral por célula y el origen geográfico de los virus del papiloma humano, que causan lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, en las pacientes femeninas de la provincia Camagüey?

### **1.4 Objeto de estudio**

Las características moleculares de los virus del papiloma humano que infectan pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino.

### **1.5 Hipótesis de investigación**

El estudio de muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey, conducirá a la caracterización molecular de los virus del papiloma humano que causan estas afecciones.

### **1.6 Diseño metodológico general de la investigación**

El estudio se realizó en dos momentos, una primera etapa en el año 2013 donde se estudiaron 22 muestras de pacientes que acudieron a la consulta de patologías de cuello del Hospital Provincial Ginecobstétrico "Ana Betancourt de Mora" de Camagüey. En esta etapa la caracterización

molecular de los VPH, se realizó utilizando el procedimiento RFLP (RFLP, por sus siglas en inglés Restriction fragment long polymorphy) y secuenciación del gen L1 de los VPH-AR 16, identificados en esos pacientes.

La segunda etapa se realizó en el periodo comprendido entre los años 2019 al 2022, a partir de muestras de 56 pacientes que acudieron a la consulta de patologías de cuello del Hospital Provincial Ginecobstétrico "Ana Betancourt de Mora" de Camagüey y también de la consulta regional de ginecología oncológica del Hospital Oncológico Docente de Camagüey, "María Curie". En esta última etapa la caracterización molecular de los VPH se desarrolló a través de la PCR en Tiempo Real (qPCR, de sus siglas en inglés, Quantitative polymerase chain reaction), carga viral y estudio filogenético.

Los detalles de la investigación serán descritos de modo riguroso en los capítulos correspondientes al presente estudio, desde la concepción inicial hasta la consecución de los resultados más relevantes, basados en métodos teóricos y empíricos.

Métodos teóricos empleados:

- Histórico y lógico: Se inició con la descripción detallada del problema de investigación, seguido de un análisis crítico a nivel internacional, nacional y local. Al mismo tiempo, se llevó a cabo una exhaustiva revisión sobre la biología molecular del VPH. Este enfoque permitió obtener una comprensión integral de la situación actual en relación con el virus, tanto a nivel global como en contextos más específicos. Los hallazgos de esta revisión proporcionaron una base sólida para el desarrollo de la actual investigación.

- **Análisis y síntesis:** Se realizó un análisis minucioso de las referencias bibliográficas pertinentes, así como de los hallazgos obtenidos en investigaciones precedentes, con el propósito de identificar las corrientes teóricas que guiarían hacia la solución del problema científico descrito.

Métodos empíricos utilizados:

- **Observación:** Se realizaron encuestas a pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer de cervicouterino que acudieron a las consultas correspondientes.
- **Medición:** Los datos recolectados fueron resumidos utilizando medidas de la estadística descriptiva e inferencial. Se realizaron además, ensayos y técnicas de biología molecular en los laboratorios de las ciencias básicas biomédicas de la universidad de ciencias médicas de Camagüey, así como en los laboratorios de biología molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) y del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí “ (IPK) en La Habana.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo general**

Explicar las características moleculares de los virus del papiloma humano que infectan y causan lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino en mujeres de la provincia Camagüey.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- Exponer las teorías actuales acerca de la biología molecular de los virus del papiloma humano.

- Describir el diseño metodológico empleado en el estudio molecular de los virus del papiloma presentes en mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey.
- Caracterizar los virus del papiloma humano que infectan las pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey.

### **1.8 Beneficios esperados de esta investigación**

- En el presente estudio se identificaron por primera vez, los genotipos y las variantes intratípicas de los VPHs circulante en la provincia Camagüey, que causan lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, lo que genera datos importantes para la epidemiología molecular de la enfermedad, tanto en la provincia Camagüey como en el país.
- La determinación de las cargas virales de los VPHs más frecuentes, así como, las variantes intratípicas del genotipo 16, pueden ser utilizados en la práctica clínica como biomarcadores de severidad asociados a lesiones de alto grado y mal pronóstico.
- Se proporciona evidencia científica útil para el diseño y evaluación futura de candidatos vacunales preventivos contra VPHs destinados a la población cubana.

### **1.9 Límites del alcance de la investigación**

La presente investigación aporta información primaria y valiosa, pero los datos obtenidos solo se circunscriben a la provincia Camagüey. Al mismo

tiempo, la investigación fue realizada con recursos limitados, lo que restringió el número de pacientes estudiados. A pesar de esto, se logró identificar los genotipos y características moleculares más comunes del VPH. Sin embargo, es importante no descartar la existencia de otros genotipos circulantes y factores clínico-epidemiológicos relacionados con el desarrollo de estas afecciones cervicales, en pacientes femeninas de la provincia Camagüey.

#### **1.10 Novedad científica**

- Primer estudio molecular que identifica los genotipos más frecuentes de VPHs, en pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey.
- Se trata del primer ensayo que a partir de muestras de pacientes de Camagüey, revela las variantes intratípicas y el origen geográfico del VPH genotipo 16, mediante el empleo en el análisis filogenético de las secuencias del gen L1. Referente para Cuba y la región de las Américas.
- Se determina por primera vez la carga viral en los VPHs más frecuentes que infectan pacientes con esta enfermedad en la provincia Camagüey. Referente para Cuba.
- Es la primera investigación que caracteriza a los VPHs y aporta datos útiles como biomarcadores de severidad asociados a lesiones de alto grado o mal pronóstico, útiles para el manejo clínico de las pacientes con esta dolencia en la provincia Camagüey.

## 2. DESARROLLO

### 2.1 Panorámica de los problemas actuales en la identificación molecular del VPH

#### 2.1.1 Valoración del contexto local, nacional y mundial

El VPH no crece en medios de cultivos convencionales, por lo que no es posible estudiarlo de este modo. El diagnóstico del VPH es realizado mediante estudios histológicos a partir de muestras obtenidas de las lesiones de los pacientes o mediante la detección del ADN viral a partir de las células infectadas.<sup>48</sup>

Varias compañías han desarrollado diferentes técnicas moleculares usadas como pruebas diagnósticas del VPH. Estas técnicas están fundamentadas en el reconocimiento molecular de secuencias de ADN del virus a través de la unión o hibridación de esa macromolécula. Dentro de estas se encuentran: la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de sus siglas en inglés, polymerase chain reaction), la hibridación de ácidos nucleicos (southern blot, dot blot) y la captura de híbridos.<sup>36</sup>

El primer test de VPH admitido para usarlo en estudios de cribado de cáncer cervical fue el Qiagen Hybrid Capture 2 (QHC2), desarrollado en Gaithersburg, Maryland, EUA y comercializado por Digene.<sup>52, 53, 54</sup> Esta es una técnica de captura de híbridos que genera una reacción quimioluminiscente, cuando la sonda de ARN empleada se une al ADN de algunos de los VPH-AR. Aunque el QHC2 fue útil en la práctica clínica para la detección de lesiones pre malignas de alto grado, tenía impedimentos

debido a su baja especificidad, a la detección errónea de ADN de los VPH de bajo riesgo (VPH-BR), así como por tener reacciones cruzadas con otros ADN que no pertenecían a los VPH (falsos positivos).

En el 2011 la Administración para los alimentos y drogas de los Estados Unidos de América (FDA de sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) aprobó el uso del test Cobas HPV, desarrollado por la Roche Molecular Systems en Branchburg, Nueva Jersey, EUA, basado en la técnica de la PCR para su uso en los cribados de cáncer cervical.

Más tarde en 2014, este último fue aprobado por la FDA para usarlo como primera línea en los cribados de CCU en mujeres de 25 y más años en este país, además de que actualmente es considerado como referencia estándar para los programas de detección VPH a nivel global, por su elevada sensibilidad y especificidad <sup>53, 55</sup>

La técnica de PCR es dentro de las técnicas moleculares la que más se ha utilizado y la de mayor sensibilidad para la detección del VPH, <sup>37, 48</sup> pues es capaz de detectar hasta una sola copia de ADN del virus por célula, y por tanto la sitúa como una técnica mediante la cual se pueden obtener resultados confiables. <sup>52, 56</sup>

Muchos países han incorporado el test de VPH basado en la PCR, para llevar a cabo estudios poblacionales que permitan la identificación y tipificación del ADN del virus en pacientes con cáncer de cuello uterino, por ejemplo, los Estados Unidos de América, Canadá, la República Popular China, varios países europeo como Reino Unido, Finlandia, Alemania, Italia, Holanda, Noruega, entre otros. También se realizan test de VPH en

Australia<sup>57</sup> y en otros países de las Américas como Argentina, Chile<sup>58</sup> y Ecuador<sup>59</sup> sin embargo, este tipo de estudios es muy limitado en países menos desarrollados del Asia<sup>60</sup>, las Américas<sup>61</sup> y África,<sup>55, 62, 63, 64, 65</sup>

En Cuba hasta el año 2016 existía poca información sobre los genotipos del VPH circulantes en las distintas provincias,<sup>49</sup> pero recientemente el número de esos estudios ha crecido; como antecedentes se puede citar el trabajo de Río Hernández MA y cols en 2010, quienes realizaron una investigación con 45 pacientes de la provincia La Habana. Este estudio molecular se realizó en coordinación con la Agencia Internacional para Investigaciones del Cáncer en Francia (IARC de sus siglas en inglés, International Agency for Research on Cancer). En esta fueron detectados los genotipos VPH-AR 16, 18, 31, 39, 45 y 51; y el más frecuente fue el 16.<sup>66</sup>

Por otro lado, se reportan también los trabajos de Soto Brito Y y cols, del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" y del Hospital Ginecobstétrico "Eusebio Hernández ", quienes realizaron estudios moleculares del VPH muy importantes en 1998, cuyo propósito fundamental fue determinar la sensibilidad, factibilidad y normalización de la técnica de la PCR cualitativa (PCR convencional). Se estudiaron 10 pacientes con identificación y tipificación de los genotipos VPH-AR 16, 18, 31 y 33, este trabajo tiene el mérito de ser posiblemente el primer intento en Cuba de estudios moleculares del VPH en pacientes con CCU.<sup>67</sup>

En el año 2012, Soto Brito Y y cols, publicaron un trabajo cuyo objetivo fundamental fue normalizar e implementar un sistema de qPCR, para determinar la carga viral en siete genotipos de VPH-AR oncogénico. Se



estudiaron 20 muestras de mucosa esofágica y 20 de células cervicouterinas de pacientes que acudieron al Hospital Ginecobstétrico "Eusebio Hernández" de La Habana.<sup>68</sup>

Todos los productos de la PCR fueron sometidos posteriormente a secuenciación nucleotídica. En las muestras de células cervicouterinas se identificaron y tipificaron los genotipos VPH-AR 16, 18, 31, 33 y 58, lo que coincide con el estudio realizado en 1998, excepto en el genotipo VPH-AR 58. El VPH-AR 16 fue el más frecuente, seguido de los genotipos 33 y 18.<sup>68</sup>

En el año 2014 este grupo de investigadores publicaron otro artículo cuyo objetivo en esta ocasión fue normalizar un método inmunoquímico para la detección el antígeno de la proteína L1 de VPH 16 en muestras cervicouterinas, usando como referencia el método normalizado y la qPCR. Se compararon tres procedimientos de inmunotinción y el protocolo normalizado se empleó en muestras cervicouterinas de mujeres con edades comprendidas entre 30 y 59 años, 82 con lesiones intraepiteliales cervicales y 10 sin antecedentes de alteraciones citológicas, a las que además se les determinó VPH 16 mediante qPCR, el procedimiento de Estreptavidina-Biotina resultó el más sensible y específico.<sup>68</sup>

Recientemente Soto Brito Y y cols, han realizado otras publicaciones importantes en esta temática. Entre estas una publicada en 2016, con el objetivo de determinar la dispersión de genotipos de VPH y factores sociodemográficos, epidemiológicos y clínicos, relacionados a la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales, en un grupo de mujeres de la capital cubana.<sup>67</sup> Los resultados revelaron que el 66 % de las mujeres estudiadas

estaban infectadas con alguno de los 30 genotipos VPH identificados, con predominio de los genotipos oncogénicos VPH 16, 31 y 18.<sup>69</sup>

La publicación más reciente del grupo de investigadores liderado por Soto Brito Y, es un trabajo dirigido a validar el desempeño analítico de dos estuches de qPCR para detectar VPH-AR oncogénico, para ser comercializado por el Centro de Inmunoensayo de Cuba.<sup>70</sup>

Los resultados del ensayo mostraron que el estuche HPV 13+2 tuvo una sensibilidad clínica del 100 % y especificidad analítica del 84 %, debido a reactividad cruzada con otros VPH-AR, lo que evidencia de este modo elevados estándares de calidad, respaldando su uso para una cobertura nacional.<sup>70</sup>

En el contexto local, en la provincia Camagüey, no existen investigaciones previas sobre estudios moleculares del VPH, por lo que este trabajo representa el primer ensayo en explorar y analizar las características de los VPHs circulante en mujeres con esta enfermedad.

### **2.1.2 Carencia que se quiere llenar con la investigación**

En las circunstancias actuales en las que se presenta el CCU en la provincia Camagüey, los esfuerzos realizados para prevenir esta enfermedad, al igual que en el resto de las provincias del país, están centrados en el programa para el diagnóstico precoz del cáncer de cuello uterino, basado a su vez en la prueba de Papanicolaou. Esta prueba exhibe un por ciento elevado de falsos negativos y su propósito es determinar la presencia de cambios histológicos de bajo y alto grado de malignidad, en las muestras obtenidas

de cuello uterino.

Sin embargo, hoy en día se usa la prueba de Papanicolaou y la colposcopia para diagnosticar las lesiones virales por VPH,<sup>36</sup> lo cual es insuficiente porque, el coilocito es un signo indirecto de los cambios histológicos que pueden sugerir la existencia del virus, pero la certeza solo es posible demostrando que esas células contienen ADN del VPH.

La propuesta del autor señala la importancia de la introducción y el uso del test de VPH mediante la técnica de PCR, pues surge de la necesidad de contar con evidencias suficientes que indiquen no solamente la presencia de ADN del VPH en las células en estudio, sino que además permitan caracterizar los genotipos, distinguiendo entre los VPH-AR y VPH-BR oncogénicos,<sup>22</sup> cuantificando su carga viral y aportando otros marcadores de severidad.

La propuesta representa una ventaja porque, a diferencia de la prueba de Papanicolaou, que solo permite la selección de los pacientes con riesgo incrementado cuando se observan cambios histológicos, y nunca antes de dicho momento; el test de VPH, sí ofrece la posibilidad de seleccionar los pacientes con riesgo incrementado antes que tengan lugar los cambios histológicos y con esto realizar acciones preventivas que, sin dudas ayudarán en la interpretación del pronóstico, en el perfeccionamiento del enfoque interdisciplinario y en la atención integral de las pacientes con esta enfermedad.

Por otro lado, para la elaboración de un preparado vacunal preventivo contra los VPH en Cuba, es necesario conocer cuáles son los genotipos circulantes

y su distribución por territorios en el país. Los resultados de la presente investigación pueden contribuir a este propósito, si se considera que constituyó uno de los primeros estudios en el país en la temática, además fue desarrollado en Camagüey provincia que se encuentra geográficamente alejada de la capital.

Por último, es importante señalar que la investigación fue la primera, en el sistema de salud de la provincia Camagüey y en su Universidad de Ciencias Médicas, que se realizó un estudio molecular antes de la pandemia COVID-19, por lo que contribuyó en el montaje de las bases tecnológicas y materiales necesarias para futuras investigaciones en esta y otras temáticas, así como de ser empleada con fines docentes.

## **2.2 CAPITULO I.**

### **Biología molecular del virus del papiloma humano**

## **2.2 CAPÍTULO I. Biología molecular del virus del papiloma humano**

### **2.2.1 Objetivo del capítulo**

Exponer las teorías actuales acerca de la biología molecular del virus del papiloma humano.

### **2.2.2 Virus del papiloma**

Los virus del papiloma comprenden varios grupos que infectan tanto a animales como a humanos. Surgieron hace aproximadamente unos 350 millones de años y al parecer asociados a los primeros reptiles. Estos evolucionaron junto con sus huéspedes hasta extenderse a otras especies, de modo que hoy se pueden encontrar en las aves, marsupiales, mamíferos (gatos, conejos, primates, hombre, etc.), y no se han encontrado en anfibios.

Los virus del papiloma son muy específicos para cada especie y se reporta que no originan infecciones productivas cruzadas en otras especies. Estos virus evolucionaron por diferentes vías como consecuencia del análisis de las evidencias, acerca de la considerable heterogeneidad que existe en su ADN; específicamente en la región que está localizada entre las posiciones de los promotores y los sitios aceptores y donadores de splicing (de sus siglas en inglés corte y empalme).<sup>48, 71,72</sup>

#### **2.2.2.1 Familia, género y clasificación de los virus del papiloma**

Estos virus pertenecen a la familia Papillomaviridae y al género Papillomavirus. Hasta la fecha se han identificado y secuenciado unos 200

papilomavirus, incluyendo unos 150 que infectan a los seres humanos (VPH). De acuerdo con su género, estos pueden dividirse en cinco grupos: los Alfa-papilomavirus, Beta-papilomavirus, gamma-papilomavirus, Mu-papilomavirus y Nu-papilomavirus. De estos uno de los más estudiados son los Alfa-papilomavirus que infectan a los humanos y son los causantes del CCU, pues a su vez se clasifican en nueve grupos donde, los VPH oncogénicos están incluidos en el Alfa-5, Alfa-6, Alfa-7 y el Alfa-9.<sup>36, 59, 71, 73, 74, 75</sup>

Se sabe que por vía sexual pueden transmitirse unos 40 VPH aproximadamente, y los más comunes encontrados en lesiones cervicales pueden clasificar, de acuerdo con la secuencia nucleotídica de su ADN y con el riesgo de provocar transformación maligna, en: VPH de alto riesgo (VPH-AR), genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68; VPH de riesgo intermedio (VPH-RI), genotipos 50, 51, 52, 53 y 83; y VPH de bajo riesgo (VPH-BR), genotipos 6, 11, 32, 42, 43, 44, 54 y 81.<sup>36, 73</sup>

En este particular puede señalarse que, los VPH 51 y 82 son Alfa-5, que los VPH 53, 56, y 66 son Alfa-6, que los VPH 18, 39, 45, 59, 68, 70, son Alfa-7 y que dentro de los Alfa-9 se encuentran los VPH 16, 31, 33, 35, 52, 58; que son la mayoría de los genotipos oncogénicos.<sup>36, 73</sup> También pueden agruparse, teniendo en cuenta su tropismo por los tejidos y su localización en, cutáneos, mucosos y asociados a epidermodisplasias verruciformes.<sup>48</sup>

#### **2.2.2.2 Estructura y organización genómica de los VPHs**

El virus de papiloma humano presenta forma eicosahédrica, con un diámetro de aproximadamente 52-55 nm y no posee envoltura. Su superficie está compuesta por 72 capsómeras.<sup>48, 59, 71, 76</sup>

El genoma de estos virus está compuesto por una doble cadena circular de ADN asociado a proteínas parecidas a las histonas, de unos 7 900 pares de bases (pb), es decir, 8 kb aproximadamente. Su genoma contiene unos ocho o nueve genes y puede ser dividido, tomando como criterios su localización y sus funciones, en tres regiones: la región temprana o región E (del inglés early), la región tardía o región L (del inglés late), y la región de control larga o LCR (del inglés Long Control Region).<sup>36, 48, 71, 73, 77</sup>

Las dos primeras regiones designan genes de expresión temprana y tardía, respectivamente. Esta región, que se expresa en forma de ARNm policistrónico, también se ha denominado ORF (del inglés Open Reading Frame or translation unit que significa marco abierto de lectura o unidad de traducción).<sup>36, 48, 68, 71</sup>

La tercera región, LCR, también se ha llamado NCR (del inglés Noncoding Region que significa región no codificante) o URR (del inglés Upstream Regulatory Region que significa región de regulación arriba).<sup>36, 48, 71, 73</sup> Esta región contiene un centro promotor llamado p97 o p105, según sea el VPH 16 o el VPH 18. Este centro promotor puede potenciar o silenciar la transcripción de los genes de la región ORF, regulando la expresión de sus genes, así como la replicación del ADN viral.<sup>36</sup>



La región ORF contiene a su vez las regiones E y L. En la región E, que tiene una extensión de aproximadamente 4 000 pares de bases (pb), se encuentran siete genes: E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7. Estos genes tienen diversas funciones, como la replicación del virus (E1 y E2), la transcripción de ADN (E2), la maduración y liberación de la partícula viral (E4), así como, la transformación e inmortalización celular (E5, E6 y E7).<sup>36, 48, 59</sup>

Se conoce que los genes E6 y E7 son además los principales mediadores de la carcinogénesis en los VPH de alto riesgo, sin embargo, es interesante señalar que la proteína E6 está ausente en el genoma de los genotipos 101, 103 y 108 del VPH.<sup>36, 47, 61</sup> En la región L, de unas 3 000 pb aproximadamente, se encuentran los genes de L1 y L2, los cuales codifican para las proteínas estructurales de su misma denominación (L1 y L2 de la cápside del virus, respectivamente).

Es oportuno subrayar que la región L1 del ORF se considera evolutivamente la región más conservada dentro de los distintos tipos de VPH conocidos hasta la fecha.<sup>36, 48, 59</sup>

La región LCR tiene entre 500 y 1000 pb y se extiende desde el gen L1 hasta el sitio de inicio de la transcripción localizado en la región E que contiene los promotores, así como los sitios de unión para factores transcripcionales (incluye la secuencia palindrómica que es reconocida por la proteína E2). Además, se encuentra allí el origen de replicación al cual se une la proteína E1.

La región LCR, a diferencia de la región ORF, no está muy conservada en los VPH y participa en la regulación de la expresión genética y en la replicación viral que ocurre en el núcleo de las células epiteliales escamosas del hospedero. Hay evidencias que indican que las mutaciones en el genoma del VPH ocurren a una tasa baja, similar a como ocurre en el genoma de la célula del hospedero.<sup>36, 48, 59, 71</sup>

El genoma de estos virus contiene un número limitado de genes, unos ocho o nueve dependiendo del genotipo. Por esta razón y a pesar de que su genoma se considera de tamaño pequeño, esta característica no impide que a partir de este se pueda codificar un número mayor de proteínas porque en su expresión genética participan muchos promotores y porque, además, poseen un patrón complejo de empalmes alternativos durante la síntesis y maduración de su ARN mensajero.<sup>71</sup> (Figura 1)

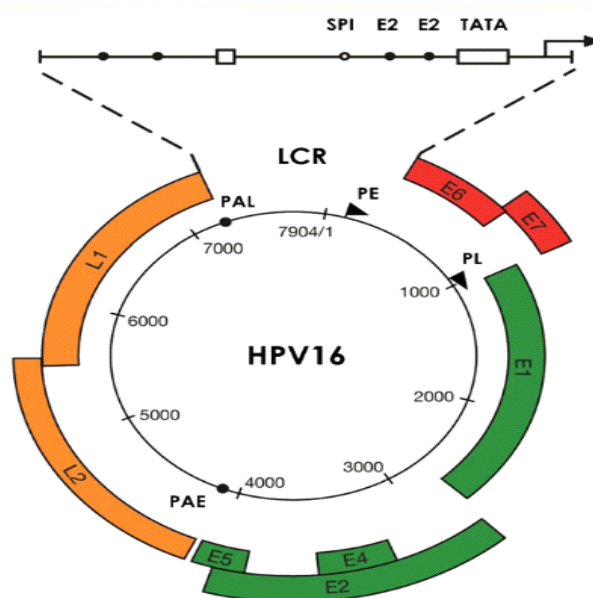


Figura 1. Se muestra la estructura del genoma del VPH-AR 16

**Fuente:** (71)

### **2.2.2.3 Funciones de las proteínas genómicas en el VPH**

El gen E1 codifica para una ADN helicasa ATP dependiente, específica del virus y necesaria para la replicación y amplificación cuantitativa del genoma viral, que además favorece la ruptura de la doble cadena de ADN durante la replicación y la recombinación homóloga.

La función de la proteína E2 está relacionada con su transcripción y su replicación, pues ella tiene la capacidad de unirse tanto al genoma viral como al celular, regulando a nivel transcripcional la expresión genética de sus propios genes E6 y E7. También se plantea que la proteína E2 es capaz de provocar la proximidad necesaria entre el genoma celular y el genoma viral en el proceso de integración de este último que es mediado por su bromodominio 4 (E2-BRD4). Por último, se ha descrito que esta proteína es capaz además de inhibir algunas respuestas relacionadas con la inmunidad innata.<sup>31, 59,71</sup>

También es importante señalar que la proteína E2, al igual que otras proteínas del virus, depende de su interacción con otros productos génicos celulares para modificarles sus funciones normales y de este modo favorecer al virus, pues se ha demostrado, al menos en los estudios basados en VPH 18, que la proteína E2 se une a varias proteínas de las crestas de la membrana interna mitocondrial, ATP sintasa, a la Citocromo C oxidasa, lo

que induce daño a las crestas y estrés oxidativo lo cual es la causa fundamental de la patogénesis del CCU, debido al daño que produce en el ADN (se refiere a cualquier alteración que afecte la estructura o la secuencia nucleotídica de los ácidos desoxirribonucleicos) y con ello incrementa las posibilidades de integración del genoma viral.<sup>65, 78</sup>

Debido a que dentro de la región codificante del gen E2 está incluida la región codificante para la proteína E4, esta se obtiene a partir de corte y empalme alternativo (de sus siglas en inglés alternative splicing) durante la transcripción del gen. La proteína E4, se expresa inicialmente como una proteína de fusión a la proteína E1, y se plantea que su función está asociada a la amplificación genómica, así como de manera importante a la transmisión y liberación del virus desde la superficie del epitelio, al interactuar con el citoesqueleto celular y provocar un colapso de la red de filamentos intermedios.<sup>59, 71, 78</sup>

La proteína E5 no es codificada por todos los tipos del virus porque algunos carecen del ORF necesario para codificar esta proteína o del codón de iniciación para su traducción, por lo que se considera que no es imprescindible para su ciclo de vida, sino que más bien puede agregar alguna ventaja para la patogenia. La E5 es una pequeña proteína transmembranal con carácter hidrofóbico de unos 83 aminoácidos de longitud que contiene tres alfa-hélices en su estructura; tiene interacciones con varias proteínas celulares relacionadas con la transformación celular y la

evasión de la respuesta inmune, al interactuar con las cadenas pesadas que componen el complejo mayor de histocompatibilidad clase I.<sup>79, 80, 81</sup>

Como detalla Venuti A y cols,<sup>79</sup> en su artículo Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions, la proteína E5 tiene varias funciones, se ha observado que E5 interactúa con la subunidad de 16 kDa de la ATPasa-V, alterando la acidificación endosomal, e inhibiendo y retardando la disociación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de su ligando y con ello favorece la proliferación celular a través de la proteína quinasa activadora de mitosis (MAPK, de sus siglas en inglés, Mitogen-Activated Protein Kinase).

También se sabe que la E5 disminuye la expresión de la proteína supresora tumoral p21 y reduce el tiempo de vida media de otra proteína supresora tumoral, la p27, ambos inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK, de sus siglas en inglés, Cyclin Depending Kinases) que están directamente implicadas en los mecanismos de la replicación del ADN y de la proliferación del ciclo celular. De igual forma, se plantea que interfiere con la proteína conexina 43, inhibe las uniones gap (del inglés, significa brecha) que median las comunicaciones célula-célula en el epitelio, haciéndolas más insensibles a las señales de control del crecimiento provenientes de las células adyacentes normales.<sup>59, 70</sup>

Como se mencionó, las proteínas E6 y E7 tienen un rol fundamental en el control del ciclo celular y en la amplificación genómica del virus, puesto que

ellas tienen propiedades transformativas y pueden infectar varios tipos celulares. La proteína E6 tiene un peso molecular de 18 kDa y ha sido encontrada fundamentalmente en el núcleo celular e interactúa con varias proteínas, afectando varios procesos celulares.<sup>78</sup>

Sus propiedades transformativas se deben a que promueve la degradación de la proteína P53 (función de protección del genoma) en las células infectadas, haciendo que la célula escape de la muerte celular programada (Apoptosis) que es un sello distintivo de las células neoplásicas.<sup>73, 78</sup>

Además, la proteína E6 puede desencadenar la degradación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (de sus siglas en inglés subfamily Bax) y también de la FADD (del inglés, Fas-associated death domain o dominio de muerte asociado a Fas), que pertenecen a la cascada de señalización de la Apoptosis, y constituye otra ruta mediante la cual E6 origina que la célula escape de la muerte celular programada.<sup>78, 82</sup>

Por otro lado, la E6 también puede desencadenar la proliferación celular descontrolada, a través su acción sobre el complejo P300/CBP (acetil transferasas) y sobre el gen c-Myc (protoncogen) que tiene como blanco a hTERT, (del inglés human telomerase reverse transcriptase o una telomerasa reverso transcriptasa humana); por lo tanto, no es difícil comprender el papel que juega la proteína E6 en la transformación neoplásica de la célula hospedera.<sup>73, 78, 82</sup>

La proteína E7, con unos 100 aminoácidos y un peso molecular de 11 kDa,

es capaz de unirse a la proteína supresora tumoral pRB, también a las proteínas p107, p130 (factores transcripcionales), a la proteína AP1 (complejo transcripcional); y por último a las proteínas p21 y p27, inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas que participan en los mecanismos de regulación del ciclo celular. Esta proteína tiene además una señal de localización nuclear y una señal de exportación nuclear, lo que sugiere que puede estar localizada en ambos compartimentos.<sup>73, 78, 82</sup>

Otra característica de las células neoplásicas es la invasión y la metástasis a distancia. Se ha observado que la proteína E7 promueve la sobreexpresión de las MMP (de sus siglas en inglés Matrix Metalloproteinase o Metaloproteinasas de la Matriz extracelular), específicamente a la MMP-9; estas proteínas se han detectado en el tumor y en el estroma peritumoral, lo cual está asociado a degradación de los componentes de la matriz extracelular, lo que facilita la invasión y la metástasis.<sup>78</sup>

Las proteínas L1 y L2 son componentes estructurales de la cápside del virus que en su ciclo de vida se expresan tardíamente. La cápside del virus está compuesta por 72 capsómeras, pero cada capsómera contiene cinco moléculas de la proteína L1 (proteína mayoritaria en la cápside, unas 360 moléculas en general), que en su estructura contiene una serie de lazos aminoacídicos hipervariables que divergen entre los distintos tipos de VPH. Esta proteína constituye el 95 % de la cápside, y es también la más inmunogénica. Además de la proteína L1, las capsómeras contienen a la

proteína L2, que representa el restante 5 % de la cápside.<sup>36</sup> Esta última, aunque no se encuentra totalmente expuesta hacia el exterior, se sabe que durante el momento de la infección está disponible para unirse con la matriz extracelular y contribuir, junto con la proteína L1, a la incorporación del ADN viral en el virión.<sup>36, 48, 71, 83, 84, 85</sup> La interacción entre las capsómeras requiere del extremo C-terminal de la proteína L1 para unirse con la capsómera vecina mediante puentes disulfuro.<sup>71</sup>

### **2.2.3 Mecanismos de transformación cancerosa utilizados por el VPH**

Sobre el mecanismo de transformación cancerosa desencadenado por el VPH en el CCU, aunque ya se ha avanzado mucho, es un proceso de múltiples etapas que aún no es conocido en su totalidad. Sin embargo, ya se han descrito muchos factores genéticos, epigenéticos, de inestabilidad genómica, activación de telomerasas, apoptosis, ambientales y otros procesos celulares, que se conocen por su rol importante en el desarrollo del CCU.<sup>86,</sup>

87

Se sabe que la progresión de la enfermedad hacia el desarrollo de la neoplasia de cuello uterino, está sustentada en la persistencia del virus dentro de la célula, que a su vez, depende del número de copias o carga viral y de la integración del genoma viral al genoma celular, este último conlleva a una sobreexpresión de los genes E6 y E7 que son los principales actores de este proceso.<sup>88,89</sup> Estos mecanismos básicos serán explicados



posteriormente partiendo de la etapa inicial en la cual el virus hace su entrada a las células hasta llegar a la etapa final de transformación.

A través de micro heridas o micro excoriaciones el VPH puede entrar e infectar las células basales epiteliales de la unión escamosa columnar del cuello uterino.<sup>31, 66, 86, 90</sup> El mecanismo de entrada del virus a la célula aún no está bien esclarecido, no obstante, está planteado que el receptor inicial para la entrada del VPH en estas células huéspedes, es un proteoglicano de heparán sulfato localizado en la matriz extracelular.<sup>31, 78, 86, 90, 91, 92</sup>

La integrina  $\alpha 6$  y la laminina 5 sirven de co-receptores para la entrada del virus a la célula. La unión de la proteína L1 de la cápside del virus al proteoglicano de heparán sulfato produce un cambio conformacional en la proteína L2. La entrada del virus a la célula ocurre lentamente, más de 12 horas, y es probable que se deba a cambios conformacionales tanto en la cápside del virus como en el receptor. Una vez unido a su receptor en la superficie celular, el virus se internaliza mediante el mecanismo de endocitosis, en el cual participan la clatrina o las caveolinas de las balsas lipídicas.<sup>31, 78, 86, 90, 91, 92</sup>

El ADN del virus viaja a través del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi antes de llegar al núcleo, la entrada al núcleo depende del desensamblaje de la envoltura nuclear durante la mitosis. Una vez en el núcleo el genoma viral permanecerá inicialmente en forma de episoma

extracromosomal, allí es replicado en unas pocas copias, entre 50 y 100 por célula. <sup>31, 78, 86, 90, 91, 92, 93</sup>

El ciclo de vida del virus está íntimamente relacionado con el programa de diferenciación de la célula hospedera. Inicialmente él ha infectado la capa de células basales y debido a que las células basales están en división, unas células hijas permanecen en la capa basal y operan como reservorio episomal, mientras otras comienzan la migración hacia las capas superficiales.

En ese momento las oncoproteínas virales E5, E6 y E7, retrasan la diferenciación celular e impiden que la célula salga del ciclo celular con el objetivo de facilitar un ambiente más adecuado para la amplificación del genoma viral. Más tarde, durante el tránsito hacia la diferenciación y su migración hacia las capas epiteliales superiores el virus aumenta los niveles de expresión de las proteínas E6 y E7 y en la capa de células correspondiente al epitelio ya diferenciado se expresan las proteínas L1 y L2 y se ensambla la partícula viral. <sup>31, 78, 86, 90, 91, 92, 93</sup>

En la fase latente de la infección del VPH, la expresión de E6 y E7 es indetectable y también hay bajos niveles de replicación del ADN, en la fase productiva los niveles de expresión de E6 y E7 son bajos, aunque sí se detecta una mayor intensidad de la replicación del ADN viral. Sin embargo, durante la fase de transformación se ha podido demostrar una sobreexpresión de las proteínas E6 y E7, la cual se origina como resultado de la

integración del genoma del VPH en el genoma de la célula hospedera. <sup>34, 86, 87, 92, 93, 94</sup>

Las proteínas E6 y E7 son las más implicadas en la transformación cancerosa. Puesto que el VPH desencadena replicación del ADN y una proliferación aberrante, esto genera un stress para la célula infectada y como respuesta la célula debería responder e inducir la muerte celular programada (apoptosis) que es dependiente de la proteína p53. Pero la proteína E6 del VPH produce ubiquitinación y degradación proteosomal de la proteína supresora tumoral p53, a través de su conjunción con la proteína de unión asociada a E6 (E6AP), lo que forma un heterotrímero E6-E6AP-P53 y causa la degradación de P53; también se une directamente a p53 para inhibir su capacidad de unión al ADN. <sup>73, 78</sup>

La proteína E6 contribuye con otros mecanismos eficaces para suprimir la muerte celular programada. La E6 es capaz de degradar, a través de la ubiquitinación, a las proteínas Bax, Bak y a FADD, estas son requeridas para activar el mecanismo de la apoptosis a través de las vías intrínseca y extrínseca, con esto el virus consigue inhibir la muerte celular programada, que es un sello distintivo de las células neoplásicas para favorecer el desarrollo tumoral. <sup>78, 82, 90</sup> Al impedir la apoptosis, la célula entraría en división sin la reparar su ADN y como resultado las descendencias heredarían mutaciones deletéreas, lo que a su vez puede generar cromosomas carentes de telómeros y la célula podría entrar en el llamado

ciclo de rotura-fusión-puente, lo que facilita duplicar el número de copias de oncogenes (amplificación doble diminutos) y llegar a la proliferación aberrante ya mencionada. <sup>34, 82, 86, 95</sup>

Esta proteína E6 también puede desencadenar esta multiplicación celular descontrolada a través de la pérdida de control de los puntos de regulación del ciclo celular, mediante su acción sobre el complejo P300/CBP (P300 es una HATs de sus siglas en inglés, histone acetyltransferases, una acetiltransferas de histonas; además CBP, de sus siglas en inglés CREB-binding protein), proteína de unión a CREB este último es un modulador de la transcripción que se une al factor transcripcional CREB (de sus siglas en inglés CRE binding protein), una proteína de unión a CRE (de sus siglas en inglés element response AMPc), elemento respuesta al AMPc), que son esenciales en la regulación del ciclo celular; y además mediante la inducción y activación de hTERT. <sup>73, 78, 82, 96</sup>

Las Hats (de sus siglas en inglés Histone Acetyl transferases o acetiltransferas de histonas) puede provocar cambios en la interacción de las histonas con el ADN, con repercusión sobre la estructura de la cromatina, de manera que los distintos cambios de las histonas pueden caracterizar a una cromatina transcripcionalmente activa o silenciada. Así la acetilación de los residuos de lisina en las histonas 3 y 4, por una acetiltransferasa promueven la cromatina activa y la expresión genética, mientras la desacetilación, por las desacetilasas HDACs, (del inglés, Histone deacetylases) promueven la

cromatina silenciada y la represión genética, por tanto, el balance en la actividad de esas enzimas tiene un papel clave en la regulación de la expresión genética.

La proteína E6 tiene la capacidad de unirse a la proteína P300 que media la acetilación de el gen p53, inhibiendo su expresión genética <sup>86, 90</sup> y, además los datos confirman hasta la fecha, que E6 también la interacciona con la proteína CBP, específicamente con el dominio II, que funciona como un coactivador del gen p53, bloqueando la transcripción del gen p53 y sus funciones importantes para la célula. <sup>86, 90, 93, 96, 97</sup>

Por su parte, como ya se mencionó la Proteína E6 induce la sobreexpresión de hTERT, que es la subunidad catalítica de la Telomerasa humana. La Telomerasa es un complejo de múltiples subunidades que es la responsable de sintetizar los hexámeros repetitivos que se encuentran en los extremos de los cromosomas, las Telomerasas no están activas en las células adultas y como resultado se pierden gradualmente los extremos de los cromosomas a través de las divisiones celulares. Ese proceso está relacionado con el envejecimiento celular. Varios estudios han demostrado que la proteína E6 induce la activación del promotor de hTERT y la sobreexpresión del mismo, a través de c-Myc y Sp1 (c-Myc es un miembro de la familia de los protooncogenes Myc; y Sp1 es un factor transcripcional humano), y esa acción es suficiente para inmortalizar la célula. <sup>82, 98</sup>

La proteína E7 promueve la disociación del complejo pRB-E2F (pRB es una proteína supresora tumoral y E2F es factor transcripcional), se une selectivamente al complejo de enzimas ligasa E2 de ubiquitina, y dirige la ubiquitinación y degradación de la proteína pRB. La pRB inhibe la actividad de E2F, que a su vez se encuentra unido al promotor de la ADN polimerasa, de las ciclinas y de las quinasas dependientes de ciclinas, cuyas funciones están relacionadas con la replicación del ADN celular y la regulación del ciclo celular.<sup>82, 94</sup> Por lo tanto, una vez que se degrada la pRB, se activa también la expresión de la enzima ADN polimerasa y con esto se estimula la célula a entrar en división celular, obligando a los Queratinocitos ya diferenciados de las capas suprabasales a reentrar en la fase S del ciclo celular, fenómeno aprovechado para replicar el ADN viral y aumentar el número de copias por célula.<sup>90</sup> Es por ello que se reconoce que la expresión crónica de las proteínas E6 y E7 puede llevar a la inestabilidad genómica y al aumento de la capacidad proliferativa de la célula infectada.<sup>34, 90</sup>

En opinión del autor, este mecanismo viral ilustra cómo el VPH manipula el ciclo celular y su comprensión es crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de prevención y tratamiento.

Pero la proteína E7 es capaz de interferir en el ciclo celular a través de otras vías, E7 se puede unir directamente al complejo ciclina A y E para potenciar la actividad de la CDK2, la cual fosforila más proteínas pRB y consigue liberar todavía más factores transcripcionales E2F, que a su vez aumentado

todavía más los niveles de expresión de las ciclinas, todos esos mecanismos aseguran que los Queratinocitos diferenciados permanezcan en la fase S del ciclo celular.<sup>90</sup>

Como se describió, el VPH en su ciclo de vida puede integrar su genoma al genoma de la célula hospedera. Varios investigadores han reportado que la integración ocurre en determinados sitios calientes, ubicados en determinadas regiones cromosómicas como 3q28, 17q21, 13q22.1, 8q24.21 y 4q13.3, donde se ha visto que ocurre la integración de los mismos con mayor frecuencia.

Al parecer el daño en el ADN en estos sitios calientes es un prerrequisito para la integración del genoma viral, lo cual es ocasionado por la proteína viral E1 o por especies reactivas del nitrógeno o del oxígeno, mediado por la proteína E2 que al interactuar con enzimas antioxidante celulares (Catalasa PDZ), disminuye los niveles de actividad de las mismas; o también porque se une a las proteínas de las crestas mitocondriales (ATP sintasa, Citocromo oxidasa, Citocromo C) induciendo stress oxidativo (Desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante).<sup>82, 86, 99</sup>

Al mismo tiempo es importante la proximidad entre el genoma viral y el genoma celular, acontecimiento que es mediado por E2-BRD4.<sup>31, 34, 78, 82, 86, 99</sup>

Finalmente, la completa fusión del genoma del virus y el genoma hospedero debe ocurrir porque el virus se aprovecha del mecanismo de reparación del ADN de la célula hospedera para su la integración de su genoma pues para ese momento ya ha logrado replicar una cantidad adecuada de su genoma en forma de episoma lo cual incrementa la posibilidad de la integración cuando se pone en marcha el mecanismo de reparación directo del ADN a través de la recombinación homóloga, pues se han encontrado micro secuencias homólogas cercanas a los puntos de ruptura y aprovechados para la integración, aunque no se descarta la recombinación no homóloga.

31, 34, 78, 82, 86, 90, 92

Por otro lado, la típica integración parcial o total del genoma viral en el genoma de la célula hospedera ocurre en el sitio donde se encuentra localizada la secuencia polinucleotídica que codifica para la proteína E2 del virus, con lo cual se fractura dicho gen y se neutraliza la función inhibidora que tiene esta proteína sobre el promotor y sobre la expresión de los genes E6 y E7. Como consecuencia de este crítico hecho se desbloquean estos últimos y ocurre una sobre expresión de los genes E6 y E7.

La disrupción del gen E2 y la sobre expresión de los genes E6 y E7 favorecen la proliferación intensiva y la transformación maligna de las células epiteliales que han sido infectadas por el virus, pues hay que considerar que las proteínas blanco para los productos de la expresión de E6 y E7 son las proteínas p53 y pRb, cuyas funciones son muy importantes en el control del



ciclo celular y la reparación del ADN, así como en la amplificación genómica del virus y otros mecanismos, en las capas medias de los queratinocitos.<sup>31,</sup>

34, 71, 78, 82, 86, 90, 92, 93

Por lo ya explicado, se considera a la integración del genoma del virus en el ADN de la célula hospedera un evento crucial durante el ciclo de vida del VPH. Sin embargo, Die H y cols <sup>94</sup> plantean que no siempre ocurre este fenómeno como lo demuestran algunos resultados obtenidos, razón por la que actualmente se considera que el papel que juega el proceso de integración al genoma de la célula hospedera no está totalmente claro. Algunos autores encontraron integración en el 100 % de los casos, mientras otros lo encontraron en el 82 %, en 70,3 % y hasta en un 45 % de los casos.

93, 94

Estos resultados sugieren que debe existir un mecanismo alternativo para la forma episomal del VPH que también ocasione la transformación cancerosa de las células, probablemente a través de cambios epigenéticos,<sup>73</sup> no obstante, la forma integrada se considera una forma selectiva del estado del virus porque, además de impedir la expulsión de su genoma desde la célula hospedera, puede mantener la expresión de sus genes directamente involucrados en la transformación neoplásica y se evita la muerte de la célula.<sup>93, 94</sup>

Pese a que la proteína E2 interviene en el mecanismo anteriormente explicado, no es su única función. E2 interfiere, como ocurre con otros virus,

en el mecanismo de SUMOilación celular. La SUMOilación es un mecanismo de modificación postraduccional, mediante el cual algunas proteínas celulares son covalentemente modificadas a través de la adición de una pequeña proteína llamada SUMO (de sus siglas en inglés de small ubiquitin-like modifier, pequeño modificador parecida a la ubiquitina), lo cual requiere de enzimas para la activación, la conjugación y la ligación. <sup>100, 101, 102, 103, 104, 105</sup>

La SUMOilación es un mecanismo muy conservado en células eucariotas, ocurre fundamentalmente en las proteínas nucleares y produce varios efectos en la célula que, obedecen al tipo o la naturaleza de la proteína blanco que ha sido modificada. Este regula muchos procesos celulares como reparación, replicación y transcripción del ADN, así como en la degradación, estabilidad, la localización celular de las proteínas, entre otras,<sup>100,101,102,103,104,105</sup> y su manipulación promete ser una futura herramienta en el pronóstico y la terapéutica contra el cáncer. <sup>106, 107, 108, 109, 110, 111</sup>

Como ya se ha abordado la proteína E2 está involucrada en varias funciones vitales para el VPH, durante la infección un virus puede manipular el proceso de SUMOilación para influir sobre otros procesos celulares y asegurar su supervivencia y propagación.

Existen evidencias de que E2 puede ser SUMOilada en la lisina que se encuentra en la posición 292, de ese modo hace más eficiente el control

sobre la replicación y la transcripción del genoma viral. En parte estos efectos se logran a través de la represión o inducción de los genes que codifican para las proteínas SUMO, ella interactúa y secuestra la proteína Ubc9, (de sus siglas en inglés, ubiquitin conjugating enzyme 9) que es la única enzima de conjugación conocida, afecta su propia SUMOilación, con lo cual disminuye la transcripción de E2, y se modifica el efecto represivo que tiene sobre las proteínas E6 y E7 <sup>100, 101</sup>

La diferencia en cuanto a la capacidad de transformación maligna entre los VPH-BR y los VPH-AR se debe a los cambios que existen en sus secuencias codificantes. Esos cambios condicionan una mayor afinidad de las proteínas E6 y E7 de los VPH-AR por sus proteínas blanco p53 y pRB respectivamente, en relación con la menor afinidad encontrada en los VPH-BR. <sup>75, 77</sup> Otro mecanismo de transformación relacionado con el VPH es mediante modificaciones en la metilación del ADN. Se ha demostrado que varios genes humanos han sido metilados en precancer cervical, demostrando el potencial rol de este mecanismo utilizado por el VPH. <sup>112, 113</sup>

Se conoce que la expresión genética es afectada por la metilación del ADN en los sitios de unión para los factores transcripcionales y por ese motivo se bloquean dichas uniones como consecuencias de los cambios en la conformación de la cromatina y además porque se afectan las interacciones con proteínas represoras específicas para estos sitios metilados.<sup>94</sup> Durante la transformación neoplásica de las células del cuello uterino, el VPH puede

desencadenar cambios epigenéticos, tanto en el propio ADN viral como en el ADN genómico de la célula hospedera.

Evitar la activación de la respuesta inmune del hospedero, mediante la cual se controla la replicación del virus, así como su eliminación, es un mecanismo importante desarrollado por el virus para lograr la supervivencia y persistencia en las células infectadas.<sup>82</sup>

A juicio del autor, la evolución del virus para interferir con los mecanismos de defensa del huésped, representa desafíos significativos para el desarrollo de terapias efectivas, pues el virus puede evitar que el sistema inmunológico controle su replicación eliminando las células infectadas y este último es una de las principales estrategias para defenderse de agentes extraños.

Se ha reportado que el VPH depende de la maquinaria de metilación de la célula hospedera para modificar el estatus de metilación de su propio genoma y además el celular. Al actuar sobre los mecanismos de metilación del ADN del hospedero y a través de su efecto sobre las metiltransferasas, el virus promueve la sobre expresión de las metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B, y origina así la hipermetilación del motivo inmunestimulador que se encuentra localizado en la región E6 y E7 presente en el VPH. De este modo el virus restringe la expresión de sus propios genes virales y con ello la expresión de sus proteínas inmunogénicas, con lo cual consigue evadir la respuesta inmune del hospedero.<sup>82</sup>

Se piensa que la metilación del ADN viral puede ser un mecanismo de defensa de la célula hospedera sin embargo, otro hallazgo interesante es la diferencia en la regulación de la expresión genética, tanto en la forma episómica como en la integrada del genoma viral, cuando se estudió el grado de metilación en los sitios de unión para el producto del gen E2 (E2BS I y E2BS II), próximos al promotor P97 que regula la expresión de los genes E6 y E7.<sup>31, 73, 90</sup>

En este caso se ha constatado pérdida de la actividad represora del gen E2 sobre la expresión genética de los genes E6 y E7 debido a la hipermetilación de las islas CpG en dichos sitios de unión, con una sostenida expresión del ARN mensajero de los genes E6 y E7 a pesar de que el gen E2 se encuentra intacto.<sup>31, 73, 90</sup>

Otro aspecto que merece atención es el relacionado con las modificaciones en la metilación y los efectos que ocasiona el VPH sobre el gen DAPK1 y sobre las secuencias repetitivas Alu. Se ha podido constatar que durante la infección por VPH se puede hipermetilar el promotor del gen DAPK1 (del inglés, death associated protein kinase 1 o proteína quinasa 1 asociada a la muerte), un supresor tumoral que está relacionado con la regulación de la apoptosis.<sup>86, 90</sup> y por otro lado la hipometilación de las secuencias repetitivas Alu, secuencias muy abundantes en el genoma humano que representan un 10 % de este.<sup>82</sup>

Se ha comprobado el vínculo directo entre la hipometilación global del ADN genómico en las secuencias Alu y la inestabilidad genética. Esta hipometilación observada en las secuencias repetitivas Alu en el genoma de las células del cuello uterino, transformadas en cancerosas, se ha planteado como un posible mecanismo utilizado por el VPH para mantener la inestabilidad genómica y así sostener el fenotipo carcinogénico de estas células.<sup>82</sup>

La participación de los micro RNA (de sus siglas en inglés miRNA o Micro Ribonucleotic Acid), se ha concebido como otro posible mecanismo empleado por el VPH en el CCU. Los micro RNA son pequeños ARN no codificantes de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud que son capaces de regular la expresión genética de miles de ARN mensajeros (ARNm). Estos actúan regulando negativamente la expresión genética, es decir reprimen la traducción al unirse total o parcialmente al 3'UTR (de sus siglas en inglés Untraslate Region o la región no codificante 3') de su ARNm complementario blanco y con esto se inicia la degradación de los ARNm. También son capaces de promover la unión de proteínas, la unión a promotores de sus genes blancos o de interactuar directamente con otros ARN no codificantes.<sup>114</sup>

El VPH modula la expresión de varios miARN de la célula hospedera a través de la delección, la amplificación y el reordenamiento genómico.<sup>86</sup>

El miARN 3156-3p inhibe el crecimiento y la migración celular e incrementa la apoptosis, además de regular varios aspectos de la angiogénesis. Recientemente se ha demostrado que el VPH regula la expresión del miARN 3156-3p en las células de pacientes con CCU y aunque el mecanismo por el cual este miARN realiza su función aún no se conoce con precisión, se sabe que el VPH disminuye significativamente la expresión del mismo, con lo cual se favorece de forma importante el crecimiento tumoral en el CCU. <sup>114</sup>

También se ha comprobado que en la progresión del CCU existe un incremento de la expresión de miR-886-5p, miR-10a, miR-141, miR-21, miR135b, miR-148a, miR-214 y miR-106b, los cuales tienen un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular, en la apoptosis y en el fenómeno de la adhesión celular. <sup>31</sup> Además se ha podido constatar que la proteína E7 aumenta la expresión de miR-15 y miR-16, en comparación con las células normales de cuello uterino, estos afectan la proliferación celular, la supervivencia y la invasión, aunque las evidencias indican la necesidad de más estudios para comprender mejor estos mecanismos de regulación. <sup>31, 86,</sup>

115

Las proteínas E6 y E7 están involucradas en la activación de varios factores transcripcionales como E2F y Myc-c y estos a su vez promueven la activación de varios microARN, de modo que la sobre expresión de E6 y E7 deprime las concentraciones intracelulares de miR-23a, miR-23b, miR-27b, and miR-143, que específicamente tienen actividad anti-tumoral; también se

ha podido comprobar la disminución de mirARN 34a que regulación la transcripción de p53, se ha observado que la proteína E6 disminuye la expresión de mir34a una pobre expresión de p53.<sup>86</sup>

Por último, resultan interesantes los estudios del perfil proteómico, al compararse células normales del epitelio del cuello uterino con distintas líneas celulares de cáncer de cuello uterino. En uno de esos estudios, con la utilización de electroforesis bidimensional y bioanálisis informático, se investigaron y analizaron las líneas celulares HeLa, SiHa y C-33A,<sup>48</sup> y fue posible identificar unas 48 proteínas que pudieran estar implicadas en el mecanismo de transformación. De estas el 42 % están asociadas al citoesqueleto y el 21 % involucradas en el metabolismo.<sup>91, 116, 117, 118, 119, 120,</sup>

121

Atrajo la atención, de manera especial, una proteína de unos 19 kD llamada Cofilina-1, un miembro de la superfamilia de la Cofilina o de la superfamilia ADF (del inglés, actin-depolymerizing factor o factor de despolimerización de la actina), que se encuentra sobre expresada en las tres líneas celulares estudiadas y específicamente está involucrada en la despolimerización de la actina F, proceso biológico crucial para la mitosis normal, la citocinesis y la migración celular, también resultó notable el hecho de que esta proteína tuviese señal de localización nuclear.<sup>91, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122</sup>

#### **2.2.4 Conclusiones del capítulo I**

- Se realizó una revisión detallada de las teorías actuales sobre la biología



molecular del virus del papiloma humano y se constató su importancia, a partir de la comprensión más profunda de la replicación del virus, su interacción con las células del huésped, así como, el diseño de terapias dirigidas a interrumpir los procesos moleculares claves, asociados a la infección de este y traducir los conocimientos en beneficios tangibles para la salud pública.

- Los mecanismos de transformación cancerosa citados en el texto son diversos y complejos, lo que resalta la capacidad de adaptación de los VPHs. La integración del genoma del VPH, la degradación de proteínas celulares, la manipulación de procesos celulares y la sobreexpresión de proteínas son las rutas más utilizadas por estos virus para garantizar su supervivencia y promover el crecimiento tumoral. Estos mecanismos subrayan la importancia de comprender en detalle los procesos moleculares involucrados en la transformación cancerosa, para desarrollar nuevos enfoques dirigidos al diagnóstico y el tratamiento.

- Es evidente que el avance en el conocimiento de la biología molecular del VPH no responde a un simple interés académico, sino que ha contribuido significativamente a la mejora de estrategias más efectivas en la caracterización molecular de estos virus, que infectan a estas pacientes.

## **2.3 CAPITULO II**

### **Diseño metodológico**

## **2.3 CAPÍTULO II. Diseño metodológico**

### **2.3.1 Objetivo del capítulo**

Describir el diseño metodológico empleado en el estudio molecular del virus del papiloma presente en mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey.

### **2.3.2 Diseño metodológico de la investigación**

Se realizó un estudio analítico de corte transversal en los años 2013, 2019, 2020, 2021, 2022 en la Universidad de Ciencias Médicas, se evaluaron 78 pacientes femeninas con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, en coordinación con el Hospital Provincial Docente Ginecobstétrico "Ana Betancourt de Mora" de Camagüey, el Hospital Oncológico Provincial Docente de Camagüey, "María Curie" y además con el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) y con el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) de Ciudad de La Habana.

La selección de las pacientes que participaron en la investigación tuvo lugar en las consultas de patologías de cuello y la consulta regional de ginecología oncológica, teniendo en cuenta los criterios diagnósticos, de inclusión, exclusión y de salida. Esta se realizó a través de una entrevista en la que se obtuvieron los datos generales, así como la comprobación del diagnóstico positivo por biopsia y por último se les llenó el modelo de recolección de la información.

A las mujeres seleccionadas se les tomó una muestra de tejido en el lugar de la lesión, suficiente y sin afectar a la paciente, para realizar la biopsia y la purificación de ADN genómico.

Para caracterizar los VPHs presentes en las muestras de las pacientes se utilizaron varias técnicas moleculares; PCR convencional, RFLP, secuenciación nucleotídica y qPCR.

### **2.3.2.1 Universo**

El universo de estudio quedó definido por todas las pacientes de los años (2013, 2019, 2020, 2021 y 2022) que acudieron a la consulta de patologías de cuello del Hospital Provincial Ginecobstétrico "Ana Betancourt de Mora" en Camagüey y a la consulta regional de ginecología oncológica del Hospital Oncológico Docente de Camagüey, "María Curie", y que cumplieron con los criterios diagnósticos, de inclusión, exclusión y de salida:

#### **2.3.2.1.1 Criterios diagnósticos**

- Cuadro Clínico: En etapas tempranas es prácticamente asintomático, por lo que se basa fundamentalmente en la anamnesis y examen ginecológico.

Cáncer de cuello uterino: En etapas avanzadas se acompaña de sangramiento intermenstrual, leucorrea y dolor en bajo vientre; en el examen físico con el espéculo se puede apreciar una masa tumoral de tamaño variable, así como lesiones exofíticas, endofíticas o ambas y atípicas en el cérvix.<sup>123</sup>

- Exámenes complementarios:
  - ✓ Citología orgánica:
    - Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL).  
Incluye el VPH y NICI
    - Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL).  
Incluye NICII y NICIII
  - ✓ Prueba de Schiller:
    - Positiva
    - Negativa
  - ✓ Colposcopia:
    - Lesión atípica
    - Lesión endofítica
    - Lesión exofítica
    - Epitelio AB denso, de bordes irregulares ambos labios
    - Epitelio AB denso, de bordes irregulares en labio anterior
    - Epitelio AB denso, de bordes regulares en labio anterior
    - Epitelio AB, de bordes regulares
  - ✓ Biopsia cervical:
    - Coilocito

- NIC I
- NIC II
- NIC III
- Carcinoma in situ
- Carcinoma microinfiltrante
- Carcinoma invasivo

#### 2.3.2.1.2 Criterios de inclusión

- Pacientes femeninas que fueron atendidas en la consulta de patología de cuello del Hospital Provincial Ginecobstétrico y la consulta regional de ginecología oncológica del Hospital Oncológico Docente de Camagüey.
- Pacientes femeninas de la provincia Camagüey
- Pacientes que cumpla con los criterios diagnósticos.

#### 2.3.2.1.3 Criterios de exclusión

- Paciente femenina con otras infecciones de transmisión sexual

#### 2.3.2.1.4 Criterios de salida

- Paciente que, por voluntad propia, no desee continuar en la investigación.

La muestra no probabilística quedó conformada por 53 pacientes que fueron positivas para algún genotipo del virus del papiloma humano.

### **2.3.2.2 Técnica de recogida de la información**

Se utilizó el interrogatorio y se llenó el modelo de recogida de información con los datos según las variables de interés de todas las pacientes de la población de estudio. (Anexo 1)

### **2.3.2.3 Operacionalización de las variables**

La operacionalización de las variables se describe en el anexo 2.

### **2.3.2.4 Procesamiento de las muestras clínicas**

#### **2.3.2.4.1 Técnicas y procedimientos para la toma de muestras**

La toma de las muestras biológicas se realizó a partir de las lesiones intraepiteliales y cáncer, encontradas en el cuello uterino en el momento en examen físico a las pacientes. Las muestras fueron divididas en dos fragmentos con tamaño suficiente para realizar la biopsia confirmativa del CCU y para la extracción de ADN genómico destinado al estudio molecular del VPH respectivamente. Los fragmentos de muestras para el estudio molecular fueron conservados en tubos Eppendorf de 1,5 mL y colocados en congelación para luego ser transportados en hielo hasta los Laboratorios de las Ciencias Básicas y Biomédicas, de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey, donde se conservaron en congelación hasta el momento de su procesamiento o envío en refrigeración hacia el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

#### **2.3.2.4.2 Extracción del ADN de las muestras**

Para la extracción del ADN a partir de las muestras de tejido tomadas de las lesiones y cáncer de cuello uterino de las pacientes, se utilizaron dos protocolos, el Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega Corporation<sup>124</sup> y el Allprep DNA/RNA Mini kit QIAGEN.<sup>125</sup>

#### **2.3.2.4.2.1 Protocolo Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega Corporation**

Para esto se utilizó el estuche comercial (Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega Corporation, EUA),<sup>124</sup> según las recomendaciones del fabricante, los fragmentos de tejido que se encontraban en congelación fueron descongelados hasta alcanzar la temperatura ambiente y luego se colocaron en otro tubo Eppendorf de 1,5 mL. Una vez colocados en un nuevo tubo Eppendorf, se les añadió 275 µL de la solución de digestión Master Mix (200 µL de solución Lisis, 50 µL de EDTA [0,5M y pH 8,0], 20 µL de Proteinasa K [20 mg/mL], cinco µL de solución RNase A [cuatro mg/mL] y luego fueron incubados en baño de maría (Precistern, Selecta P) por 16 horas a 55 °C.

Después los tubos se centrifugaron (centrífuga Kokusan H-1 500 fs, Japón) por 2 minutos (min) a 2000 gravedades (x g), el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo Eppendorf de 1,5 mL y se les añadió 250 µL de tampón lysis. Cada lisado de la muestra se transfirió, de modo independiente, a una minicolumna ensamblada. Se centrifugaron las minicolumnas ensambladas con su tubo recolector por tres min a 13 000 x g y se desechó el líquido recogido. Luego se hicieron cuatro pasos de lavado a las minicolumnas



ensambladas con 650 µL de solución de lavado y se centrifugó cada minicolumna por un min a 13 000 x g, y también se desechó el líquido recogido en los tubos recolectores. Después de esto, se agregaron 250 µL de agua libre de nucleasas, a temperatura ambiente, a cada minicolumna ensamblada y se incubaron durante dos min a temperatura ambiente.

Por último, a las minicolumnas ensambladas se les colocó un tubo Eppendorf nuevo y se centrifugaron por un min a 13 000 x g, para luego recoger la elusión. Se eliminaron las minicolumnas y el ADN extraído y recogido en los tubos Eppendorf fue almacenado a - 20 °C.

#### **2.3.2.4.2 Protocolo Allprep DNA/RNA Mini kit QIAGEN**

Para homogenizar las muestras de tejidos obtenidas de cada paciente se utilizó el estuche comercial (AllPrep DNA/RNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania),<sup>125</sup> según las recomendaciones del fabricante. El tejido fue depositado en un tubo colector suministrado por el Kit), al cual se le añadió 350 µL de solución tampón de lisado RLT Plus\* y fue centrifugado 3 min. a velocidad máxima, luego se eliminó con cuidado el sobrenadante por pipeteo. \* (La composición exacta es confidencial.)

El lisado fue transferido a una columna AllPrep DNA, se colocó en un tubo colector de 2 mL y fue centrifugado por 30 s a 8 000 x g, luego se desechó el precipitado. Se adicionaron 500 µL de tampón de lavado 1 AW1\* en la membrana de la columna AllPrep DNA, que se colocó en otro tubo colector y fue centrifugado por 15 s a 8 000 x g, después se desechó el precipitado. Posteriormente se añadieron 500 µL de tampón de lavado 2 AW2\* a la

columna AllPrep DNA, se colocó en un nuevo tubo colector y fue centrifugado por 2 min a máxima velocidad, se desechó el precipitado.

Por último, la columna AllPrep DNA se colocó en otro tubo colector, se le añadió 100 µL del tampón elusión EB\* y fue incubado 1 min. a temperatura ambiente, seguido de centrifugación 1 min. a 8 000 x g para obtener el ADN.

### **2.3.2.5 Tipificación del virus del papiloma humano**

Para la identificación de los genotipos se utilizaron varias técnicas moleculares, RFLP, secuenciación nucleotídica y también se utilizó el qPCR.

#### **2.3.2.5.1 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)**

Se realizó el RFLP mediante la utilización de PCR convencional y análisis de restricción, según el diseño de un algoritmo diagnóstico.

Inicialmente se amplificado un segmento de ADN a partir del gen L1 del genoma del VPH mediante una de las técnicas de la biología molecular, PCR y luego fueron escogidas las enzimas de restricción necesarias para obtener patrones de bandas distintos, a partir del segmento de ADN amplificado, de modo que se pudieran diferenciar cada genotipo en estudio.

##### **2.3.2.5.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR convencional)**

Se seleccionaron los oligonucleótidos consenso o degenerados My09 y My11, los cuales son unos de los más reportados en la literatura para el diagnóstico del VPH.<sup>52,126</sup> Para este propósito se buscaron las secuencias de

los VPH-AR en las bases de datos GenBank, del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (de sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information) de Estados Unidos.<sup>127</sup> Se analizaron las secuencias con el software Gene Runner, versión 5.08 para Windows; se localizaron las secuencias amplificadas por PCR del gen L1 en los distintos genotipos.

Las secuencias de los oligonucleótidos consensos My09 y My11 son las siguientes:

My09: CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC  
My11: GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG

Los oligonucleótidos consenso constituyen una mezcla de oligonucleótidos con composición nucleotídica similar y básica en común pero que difieren en ciertas posiciones del resto de los oligonucleótidos de la mezcla.<sup>128</sup> Como se puede observar, en estos oligonucleótidos consenso existen nucleótidos variables, como la base señalada con el símbolo M, que puede ser o la base adenina o la citosina; la base señalada con el símbolo R, puede ser la base adenina o la guanina; la del símbolo W puede ser la base adenina o la timina; la del símbolo Y puede ser la base citosina o la timina. Por esta razón los oligonucleótidos My09/My11 pueden hibridar con las secuencias complementarias o casi complementarias de los 18 genotipos VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 55, 56, 58, y 59; de los cuales 11 de esos 18, pertenecen a los VPH de alto riesgo y riesgo intermedio, dentro

de los genotipos VPH más comúnmente encontrados en lesiones cervicales.<sup>36, 126</sup>

Estos oligonucleótidos consensos (My09 y My11), son capaces de reconocer e hibridar en una secuencia nucleotídica complementaria localizada en el gen L1 de varios de los VPH-AR y VPH-BR, y se genera un segmento de ADN de aproximadamente 450 pares de bases.

Se utilizó un termociclador MultiGene TC050-18, Suecia, y se fijaron los siguientes parámetros: desnaturalización inicial, 4 min. a 94 °C, y luego se realizaron 30 ciclos, consistentes en desnaturalización un min. a 94 °C, hibridación un min. a 55 °C, y extensión un min. a 72 °C. Después de los ciclos se realizó una extensión larga de 5 min. a 72 °C. Cada muestra fue amplificada con los cebadores consensos My09/11 (20  $\mu$ mol de cada cebador) en presencia del tampón Taq. Pol (1X) (AppliChem, Alemania), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol) (AppliChem, Alemania), dNTP (200  $\mu$ mol de cada dNTP) (AppliChem, Alemania), Taq. Polimerasa (1U) (AppliChem, Alemania) y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 50  $\mu$ L.

Se concibió como control negativo el uso de, un tubo de reacción sin ADN molde, otro tubo de reacción con ADN genómico humano de paciente no infectado con VPH y como control interno de amplificación los oligonucleótidos PC04/GH20, que generan un segmento de ADN de 268 pb a partir del gen que codifica para la proteína  $\beta$  globina humana.<sup>126</sup>

#### **2.3.2.5.1.2 Análisis de restricción del fragmento amplificado por PCR**

Se examinaron los sitios de corte de varias enzimas de restricción dentro del fragmento amplificado por la PCR, a partir del gen L1 del genoma del VPH mediante el software Gene Runner y se escogieron según los siguientes criterios:

- Las que tuvieran mayor número de sitios de corte por genotipo, en la secuencia amplificada por PCR a partir del gen L1 del genoma del VPH en estudio, según los oligonucleótidos seleccionados.
- Las que durante el análisis de restricción, a través del software Gene Runner, permitieron escoger un patrón de bandas diferencial para cada genotipo en estudio, según el tamaño de los fragmentos generados.
- Las que tuvieran un precio más económico.

De ese modo quedaron seleccionadas las enzimas de restricción PsT I, Dra I, Hae III, Bcl I, EcoR I, Msp I y BamH I, de acuerdo con sus posibles sitios de corte y teniendo en cuenta el patrón diferencial de bandas aportado por los sitios de corte de cada enzima de restricción, de manera que permitiera distinguir cada genotipo de forma individual y con esa información se diseñó un algoritmo diagnóstico.

#### **2.3.2.5.1.3 Algoritmo diagnóstico para la tipificación de los virus del papiloma humano**

A partir de los resultados obtenidos del estudio de restricción se diseñó un algoritmo diagnóstico que finalmente posibilitó la tipificación de los VPH.

La estrategia de trabajo definida fue:

- 1- PCR con oligonucleótidos My09 y My11
- 2- Corte del producto de la PCR con enzima de restricción Pst I
- 3- Corte del producto de la PCR con enzima de restricción Dra I
- 4- Corte del producto de la PCR con las enzimas de restricción Bcl I, Eco R I, Bam H I, o Msp I, Hae III, según corresponda.

#### **2.3.2.5.1.4 Procedimientos para el análisis con enzimas de restricción**

Según el algoritmo diagnóstico, se seleccionaron las enzimas de restricción siguientes: Pst I (New England BioLabs, Reino Unido), Dra I (New England BioLabs, Reino Unido), Bcl I (New England BioLabs, Reino Unido), EcoRI (AppliChem, Alemania), Msp I (New England BioLabs, Reino Unido), y Hae III (New England BioLabs, Reino Unido), los resultados de los estudios de restricción en todos los casos fueron chequeados en un gel de agarosa normal al 2 %.

Se utilizaron las enzimas de restricción Pst I, Dra I y EcoRI en las siguientes condiciones. Digestión con la enzima de restricción Pst I (New England BioLabs, Reino Unido), se depositó en un tubo Eppendorf 2  $\mu$ L de buffer NeB 3 [10X] (100 mM NaCl, 50 mM Tris. HCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (PH 7.9; 25 °C), 2  $\mu$ L de albúmina de suero bovino (BSA) [1  $\mu$ g/ $\mu$ L], 1  $\mu$ L de la mezcla de la enzima de restricción Pst I [1 U/ $\mu$ L], 7  $\mu$ L del producto de la PCR y 8  $\mu$ L de agua destilada estéril, para un volumen final de reacción de

20  $\mu$ L. Después se colocó el tubo de reacción en un Baño de María a 37 °C, durante 2 h para asegurar la digestión completa.

Para realizar el estudio de restricción con la enzima Dra I (New England BioLabs, Reino Unido), se depositó en un tubo Eppendorf 2  $\mu$ L de buffer NeB 4 [10X], 1  $\mu$ L de la mezcla de la enzima de restricción Dra I [1 U/ $\mu$ L], 7  $\mu$ L del producto de la PCR y 10  $\mu$ L de agua destilada estéril, para un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Después se colocó el tubo de reacción en un Baño de María a 37 °C, durante dos horas.

Para realizar el estudio de restricción con la enzima EcoR I (AppliChem, Alemania), se depositó en un tubo Eppendorf 2  $\mu$ L de buffer Eco RI [10X] (100 mM Tris. HCL (PH 7.9; 25 °C), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.025% Triton X-100), 2  $\mu$ L de BSA (de sus siglas en inglés BSA Bovine Serum Albumin o albúmina de suero bovino) [1  $\mu$ g/ $\mu$ L], 1  $\mu$ L de la mezcla de la enzima de restricción EcoR I [1 U/ $\mu$ L], 7  $\mu$ L del producto de la PCR y 8  $\mu$ L de agua destilada estéril, para un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Después se colocó el tubo de reacción en un Baño de María a 37 °C, durante dos horas.

#### **2.3.2.5.2 Secuenciación nucleotídica del producto de la reacción en cadena de la polimerasa**

Los productos amplificados del gen L1 del genoma de VPH obtenidos por la PCR de cada muestra correspondiente a cada paciente, se purificaron con el estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean - Up System (Promega, EUA).<sup>129</sup>

Las muestras líquidas se colocaron en microtubos de 1,5 mL (Eppendorf,

Alemania), se sellaron y rotularon adecuadamente y se enviaron para su secuenciación a la compañía MacroGen (Seúl, Corea del Sur),<sup>130</sup> con el apoyo y la coordinación del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) de La Habana, Cuba. (Anexo 3).

Las secuencias nucleotídicas primarias obtenidas de la compañía MacroGen se analizaron utilizando el paquete informático Vector NTI 7.1 (InforMax, Inc), luego cada secuencia nucleotídica obtenida fue sometida a análisis de alineamiento de secuencias mediante el programa informático BLAST (de sus siglas en inglés para Basic Local Alignment Tool), desarrollada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Se accede al mismo desde el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, de sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information) ubicado en la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de América (NLM, de sus siglas en inglés para National Library of Medicine).<sup>131</sup>

### **2.3.2.5.3 PCR en Tiempo Real (qPCR)**

Para la identificación de los genotipos de mayor relevancia clínica (VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58),<sup>132</sup> también se utilizó qPCR mediante el método TaqMan o Sonda de hidrólisis y se trabajó sobre la plataforma Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA).<sup>68</sup>

Para esto se procedió a añadir en tubos eppendorf 5 µL del ADN extraído de cada muestra de paciente, a 15 µL de una mezcla formada por: (8 µL de agua, 4 µL de mezcla universal de PCR - Roche Diagnostics, Alemania), más 10 pmoles y entre 1-5 pmoles de oligonucleótidos y sonda,



respectivamente. Los cebadores y sondas para cada tipo de VPH y para el gen de la  $\beta$ -globina humana (Biomers net, Alemania) fueron previamente descritos por Schmitz M y cols. en 2009,<sup>133</sup> las mismas se marcaron con los fluorocromos BHQ-1a-6-FAM y TAMRA-6-FAM (BHQ: Black Hole Quencher; FAM: 6-FAM) porque el equipamiento Light Cycler 1.5 de Roche solo posee dos canales de lectura de fluorescencia. (Anexo 4).

Las secuencias de estos oligonucleótidos corresponden a una región de los genes E6 y E7 de VPH. Los parámetros del ciclaje fueron los siguientes: desnaturalización inicial 10 min a 94°C y luego 45 ciclos, consistentes en desnaturalización 15 segundos (s) a 94 °C, hibridación 20 s a 50 °C y extensión 40 s a 60 °C.<sup>133</sup>

Como control negativo el uso un tubo de reacción con todos los componentes de la reacción sin el ADN molde y como controles positivos se emplearon las líneas celulares de la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC (del inglés, American Type Culture Collection) que se mantuvieron en el laboratorio de cultivos celulares del IPK. Las células de carcinoma cervical humano transformadas por VPH fueron:

- SiHa con 1-2 copias del genoma de PVH-16
- HeLa con 10-50 copias del genoma de PVH-18

En todos los casos también se utilizó un fragmento del gen que codifica para la  $\beta$ -globina humana como control interno de amplificación, según recomendaciones de los autores del protocolo original para comprobar la calidad de la extracción de ADN <sup>126,133</sup>

### **2.3.2.6 Cuantificación de carga viral de los genotipos VPH en las muestras de las pacientes**

Para la cuantificar la carga viral de cada genotipo VPH en las muestras de las pacientes se utilizó el qPCR,<sup>134,135,136,137</sup> empleando el método de cuantificación absoluta, empleando curvas estándares previamente confeccionadas,<sup>68</sup> a partir de la línea celular SiHa que contiene entre 1 a 2 copias del ADN viral del VPH-AR 16 por célula. Se realizaron 5 diluciones desde  $10^5$  hasta 10 copias de ADN viral/ $\mu$ L y se montaron por triplicado. Para la confección de la curva estándar se utilizó la versión 3.3 del programa de la plataforma Light Cycler 1.5 de Roche (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA).<sup>68</sup>

### **2.3.2.7 Análisis filogenético para el VPH 16**

El análisis filogenético se realizó para definir el linaje y sublinaje del VPH-AR 16, empleando las secuencias obtenidas por amplificación con los oligonucleótidos consensos My09 y My11, de una región del gen L1 de los VPH-AR 16, presentes en las muestras clínicas de las pacientes.

Para el análisis filogenético se compararon las secuencias obtenidas en el presente estudio con secuencias de referencias de diferentes regiones del mundo. Los resultados obtenidos se clasificaron sobre la base del análisis filogenético como linajes A, B, C o D y sublinajes A1, A2, A3, A4, B1, B2, C, D1, D2, D3, D4, utilizando las secuencias de referencias descritas previamente por Burk RD y Cols, 2013.<sup>138</sup> Las secuencias de referencias están reportadas y se descargaron en formato FASTA de la base de datos

GeneBank de NCBI,<sup>111</sup> con los números de acceso: K02718, AF536179, HQ644236, AF534061, AF536180, HQ644298, AF472509, HQ644257, AY686579, AF402678. Se usó la nomenclatura de linajes y sublinajes propuesta por Burk RD y cols., en 2013.<sup>138</sup> Para la construcción del árbol filogenético se emplearon los métodos estadísticos Maximum Likelihood Tree (máxima verosimilitud), y Bootstrop, además de mejor modelo de sustitución, implementados mediante el software MEGA versión X, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, for bigger datasets.

Para mejor comprensión se puede visualizar el flujograma de trabajo en el anexo 5

#### **2.3.2.8 Procesamiento de los datos**

Con los datos obtenidos de las pacientes, mediante la encuesta, se llenó un formulario que constituyó la fuente primaria de la información. Los datos fueron introducidos y procesados con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v. 21 (IBM Inc., Berkeley, CA, EE.UU) para Windows. Se utilizaron medidas de la estadística descriptiva como distribución de frecuencias absolutas y porcentos, medidas de la estadística inferencial como las pruebas Chi-cuadro de Pearson ( $\chi^2$ ), la prueba exacta de Fisher, ANOVA de un factor, las pruebas no paramétricas de Kruskall-Wallis y U de Mann-Whitney, considerando significativos los valores de  $p < 0,05$  con un nivel de confianza  $> 95$  %. Los resultados se presentaron en tablas y figuras.

#### **2.3.2.9 Consideraciones éticas**

Este estudio se realizó de acuerdo con los principios de la bioética para las investigaciones médicas en seres humanos según se estableció en la declaración de la Asamblea Médica Mundial de Helsinki, con actualización de Edimburgo, Escocia, octubre 2000; Tokio 2004, Seúl, octubre 2008; y Brasil 2013; <sup>139</sup> se siguieron, además, las recomendaciones del Consejo Científico de la Facultad de Ciencias Médicas y del Comité de Ética de las Investigaciones de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey.

La información fue objeto de las normas de protección y seguridad informática para que solo puedan acceder a ella las personas debidamente autorizadas y garantizar su uso apropiado, así como la confidencialidad de los datos personales de las mujeres participantes en el estudio.

Cada paciente fue ampliamente informada de los objetivos del estudio, sobre las características del mismo, beneficios, deberes y derechos. Toda la información se brindó por escrito y de forma oral con lenguaje claro y sencillo y se solicitó el consentimiento de cada mujer durante la evaluación clínica.

(Anexo 6)

Por otro lado, se explicó a las pacientes, el carácter voluntario de su participación en la investigación y de comunicar oportunamente aquellos aspectos que puedan dañar su dignidad y que sus resultados son estrictamente confidenciales, garantizándoles que en los resultados o en las publicaciones derivadas del presente estudio, las pacientes no serán identificadas por sus nombres.

El riesgo para las pacientes fue bajo, pues la muestra fue tomada por personal especializado, cumpliendo rigurosamente con las medidas de asepsia y se utilizó material desechable estéril.

### **2.3.3 Conclusiones del capítulo II**

- Se describió el diseño metodológico basado en un estudio analítico de corte transversal en los años 2013, 2019-2022, donde el universo a investigar quedó definido por todas las pacientes que cumplieron con los criterios diagnósticos, de inclusión, de exclusión y de salidas.

- Se detallaron los procedimientos para la toma de muestras, así como, para la purificación de ADN genómico, mediante las técnicas el Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega Corporation y el Allprep DNA/RNA Mini kit QIAGEN.

- Para la tipificación de los VPH se concibió un procedimiento RFLP utilizando los oligonucleótidos My09/My11 y las enzimas de restricción PsT I, Dra I, Hae III, Bcl I, EcoR I, Msp I y BamH I. Con el mismo propósito se describió el procedimiento qPCR y el método Sonda de hidrólisis o TaqMan en la plataforma Light Cycler 1.5 de Roche Diagnostics. Este último además fue útil para la cuantificación de la carga viral.

- El análisis filogenético se diseñó a partir de la comparación de las secuencias obtenidas del gen L1 del VPH-AR 16 con las secuencias de referencias descritas previamente por Burk RD y Cols, mediante el software MEGA versión X y los métodos estadísticos Maximum Likelihood Tree y Bootstrop.

## **2.4 CAPITULO III**

**Caracterización molecular de los virus del papiloma humano presentes  
en muestras de mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y  
cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey**

## **2.4 CAPÍTULO III. Caracterización molecular de los virus del papiloma humano presentes en muestras de mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey**

### **2.4.1 Objetivo del capítulo**

Describir los resultados obtenidos en la caracterización molecular del virus del papiloma humano presente en mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino en la provincia Camagüey.

### **2.4.2 Resultados y discusión**

#### **2.4.2.1 Características generales de la población estudiada**

En el presente estudio se evaluaron 78 pacientes femeninas con patologías de cuello, que fueron atendidas en las consultas especializadas de los hospitales ginecobstétrico y oncológico de la provincia Camagüey.

Al analizar las variables clínicos-epidemiológicos se comprobó una media para la edad de 35,8 años; de ellas el 46,2% (36/78) en algún momento de su vida sexual activa utilizó un DIU. El 76,9 % (60/78) de las pacientes refirió partos y el 60,2 % (47/78) abortos. Así mismo, el 21,7 % (17/78) de las pacientes, en algún momento fueron diagnosticadas con alguna enfermedad de transmisión sexual.

Con respecto a los hábitos tóxicos, el 37,1 % (29/78), puntualizó un consumo de cigarrillos por encima de una cajetilla diaria, mientras en relación a la menarquia se confirmó una media 11,9 años, y de unos 15,5 años para las

primeras relaciones sexuales. Finalmente, el 34,6% (27/78) refirió más de dos parejas sexuales en los últimos dos años.

#### **2.4.2.2 Características generales de las pacientes positivas al virus del papiloma humano**

De las 78 pacientes evaluadas se confirmó que, 53 de ellas estaban infectadas con algún genotipo del virus del papiloma humano y constituyeron la muestra de estudio.

En el transcurso del estudio se obtuvieron datos sociodemográficos, epidemiológicos y clínicos a partir de la revisión de las historias clínicas de las pacientes. Esos datos se muestran a continuación:

En cuanto al municipio de residencia, prevalecieron las pacientes del municipio Camagüey con el 39,6 % (21/53) y se observó que los municipios con menos casos fueron Carlos Manuel de Céspedes, Jimaguayú y Minas con 1,9 % (1/53) cada uno. (Tabla 1) También se constató que las pacientes que no usaron el DIU predominaron sobre las que lo usaron 58,5 % (31/53). Lo contrario sucedió con respecto a las que tuvieron partos y abortos, en las que sobresalieron las que lo tuvieron con el 75,5 % (40/53) y 58,5 % (31/53), respectivamente. (Tabla 2)

A la inversa sucedió con las pacientes que declararon una ITS, en las que predominaron las que no tuvieron una infección de transmisión sexual con el 75,5 % (40/53) y de igual modo para la variable tabaquismo, en la que prevalecieron las pacientes no fumadoras con el 56,6 % (30/53). También se



examinaron otras variables cualitativas como biopsia positiva y colposcopia positiva, en las que fueron mayoría los resultados positivos con el 94,3 % (50/53) y 86,8% (46/53) respectivamente. (Tabla 2)

Tabla 1. Distribución de pacientes incluidas en la investigación, según municipio de residencia en la provincia Camagüey.

<b>Variable</b>	<b>Grupos o rangos</b>	<b>Total, N=53 n (%)</b>
Municipio de residencia	<b>Camagüey</b>	<b>21 (39,6)</b>
	Guaimaro	8 (15,0)
	Vertientes	7 (13,2)
	Santa Cruz del Sur	5 (9,4)
	Esmeralda	5 (9,4)
	Florida	4 (7,5)
	C. M. de Céspedes	1 (1,9)
	Jimaguayú	1 (1,9)
	Minas	1 (1,9)

**Fuente:** Historia clínica.

Tabla 2. Distribución de pacientes según datos clínicos-epidemiológicos.

(variables cualitativas)

<b>Variable</b>	<b>Grupos o rangos</b>	<b>Total, N=53 n (%)</b>
Uso del DIU	Sí	22 (41,5)
	<b>No</b>	<b>31 (58,5)</b>
Partos	<b>Sí</b>	<b>40 (75,5)</b>
	No	13 (24,5)
Abortos	<b>Sí</b>	<b>31 (58,5)</b>
	No	22 (41,5)

ITS	Sí	13 (24,5)
	<b>No</b>	<b>40 (75,5)</b>
Tabaquismo	Sí	23 (43,4)
	<b>No</b>	<b>30 (56,6)</b>
Biopsia positiva	<b>Sí</b>	<b>50 (94,3)</b>
	No	3 (5,6)
Colposcopia positiva	<b>Sí</b>	<b>46 (86,8)</b>
	No	7 (13,2)

**Fuente:** Historia clínica. **Abreviaturas:** **DIU:** Dispositivo Intra Uterino,

**ITS:** Enfermedad de Trasmisión Sexual.

Como se puede observar en la figura 2 donde se describen los hallazgos colposcópicos, las lesiones exofíticas fueron las de mayor frecuencia con el 37,7 % (20/53), seguidas de las lesiones atípicas con el 18,9 % (10/53) y el epitelio AB denso, de bordes irregulares en ambos labios del cuello uterino con el 11,3 % (6/53). Las otras lesiones encontradas tuvieron una frecuencia de aparición muy inferior.

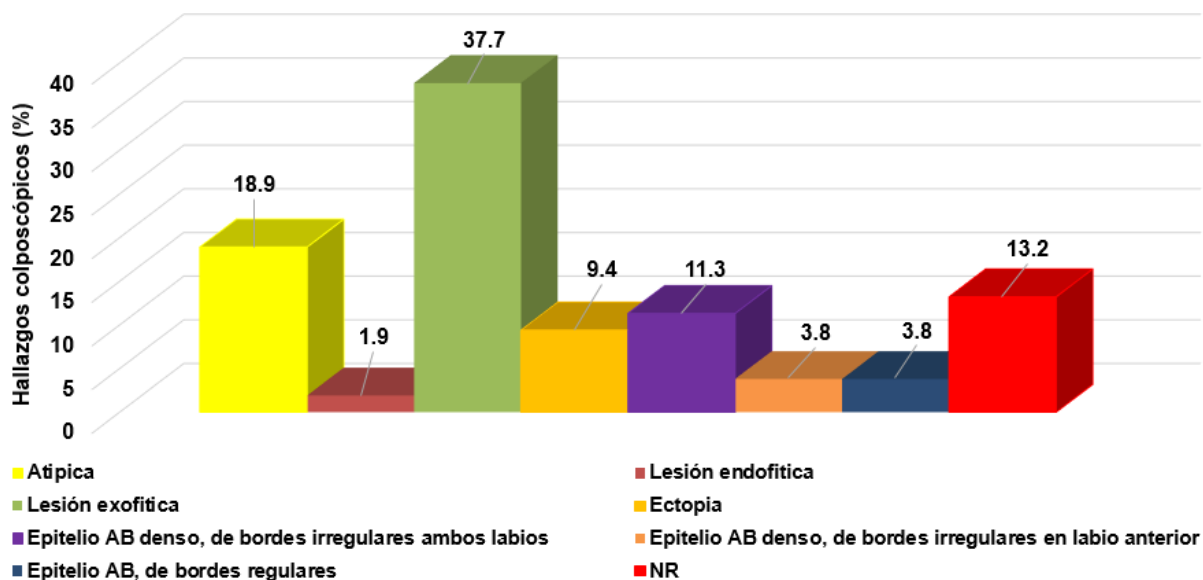


Figura 2. Hallazgos colposc6picos encontrados en lesiones intraepiteliales cervicales y c6ncer cervicouterino en las pacientes VPH positivas incluidas en el estudio.

**Abreviaturas: Epitelio AB:** Epitelio Aceto-Blanco, **NR:** No realizado.

En relaci3n a la variable edad predomin3 el grupo correspondiente a 51- 60 a6os con el 26,4 % (14/53), seguidos del grupo de 20 a 30, con el 20,8 % (11/53); solo el 5,7 % (3/53) fueron menores de 20 a6os. (Tabla 3)

Por otro lado, al evaluar la variable menarquia, predomin3 el grupo que se encontraba entre los 10 a 14 a6os con el 90,5 % (48/53), mientras que en el caso de la variable edad de las primeras relaciones sexuales, sobresali3 el grupo que comenz3 entre los 15 a 20 a6os de edad con el 84,9 % (45/53). Por 6ltimo, la variable n6mero de parejas en los 6ltimos dos a6os, prevalecieron las que tuvieron una sola relaci3n en ese periodo de tiempo con el 56,6 % (30/53). (Tabla 3)

Tabla 3. Distribuci3n de pacientes seg6n datos cl6nicos-epidemiol3gicos.

(variables cuantitativas por rangos)

<b>Variable</b>	<b>Grupos o rangos</b>	<b>Total N=53 n (%)</b>
Edad (a6os)	< 20	3 (5,7)
	<b>20 - 30</b>	<b>11 (20,8)</b>
	31 - 40	9 (17,0)
	41 - 50	10 (18,9)
	<b>51 - 60</b>	<b>14 (26,4)</b>
	> 61	6 (11,3)

Menarquia	< 10 años	2 (3,8)
	<b>10-14 años</b>	<b>48 (90,5)</b>
	>14 años	3 (5,6)
Edad de las primeras relaciones sexuales	< 15 años	8 (15,1)
	<b>15-20 años</b>	<b>45 (84,9)</b>
	>20 años	0 (0,0)
Número de parejas en los últimos 2 años	<b>1</b>	<b>30 (56,6)</b>
	≥ 2	23 (43,3)

**Fuente:** Historia clínica.

La presencia de la infección por un VPH de alto riesgo no es suficiente para que ocurra la transformación maligna en células del cuello uterino, para ello es necesaria la coexistencia con otros factores que favorezcan su desarrollo. Por esta razón muchas investigaciones en este campo se han orientado hacia el estudio de los mismos y aclarar el peso de cada uno de ellos en ese padecimiento. De allí la necesidad de analizar en el presente estudio, la contribución de estos factores predisponentes, en el progreso de la enfermedad presente en las mujeres incluidas en la investigación.

En la tabla 2, se describió un predominio de las pacientes que no usaron el DIU con respecto a las que lo usaron, esto no significa necesariamente que sea un factor protector y no se encontró asociación estadística.

Algunos autores, Beining RM y Cortessis VK,<sup>140,141,142</sup> han planteado el efecto protector del uso del DIU frente a la infección por VPH, inclusive está planteado que el efecto protector crece en la medida que aumenta el número de años en su uso (alrededor de 10 años)

El mecanismo propuesto sugiere que puede inducir una reacción inflamatoria crónica y de baja intensidad a nivel del endometrio, el canal endocervical y el cérvix con alteraciones en la inmunidad de la mucosa local, con aumento de los linfocitos T, que pudiera afectar la persistencia del VPH; aunque algunos atribuyen este efecto protector a que estas mujeres tienen un control ginecológico más estricto.<sup>143</sup> Sin embargo, sigue siendo una controversia porque otros autores en sus trabajos publicados no han podido demostrar diferencias significativas, entre las que lo usan y las que no lo usan.<sup>144,</sup>

<sup>145,146,147,148,149</sup>

En relación a la presencia de partos y abortos, se plantea que será mayor el riesgo de adquirir un VPH y desarrollar una lesión cervicouterina, mientras mayor sea el número de partos, y esto como consecuencia de una mayor cantidad de contactos sexuales, traumas cervicales, desgarros del parto no suturados con más exposición al virus, lo mismo sucede para el aborto, además de que en ambos casos el útero está expuesto a más instrumentación propia de cada proceder.<sup>150, 151, 152, 153</sup> (Tabla 2)

Los resultados de la presente investigación coinciden con lo reportado en la literatura en relación a las variables presencia de partos y abortos, sin embargo como se verá mas adelante, no se encontraron diferencias significativas entre las pacientes que tuvieron partos y abortos con relación a las que no los tuvieron, en opinión del autor, por el número de pacientes incluidas en la investigación.

En muchas publicaciones se reporta como factor predisponente la incidencia

elevada a otras enfermedades de transmisión sexual, porque está asociado a la promiscuidad tanto en la mujer como en su pareja.<sup>154, 155, 156,157, 158.159, 160, 161, 162, 163,164</sup> En el actual estudio no se encontró coincidencia en relación a este factor predisponente, el autor también considera, que es consecuencia del número de pacientes incluidas en la investigación. (Tabla 2)

Se ha reportado que el tabaquismo está asociado a mayor persistencia de la infección por VPH y a la progresión del cáncer de cuello uterino, dependiente de la intensidad y duración del hábito de fumar. Como promedio las pacientes fumadoras tienen el doble del riesgo de lesiones intraepiteliales con respecto a las no fumadoras. Esta relación se argumenta con la comprobación de más de 4000 sustancias carcinogénicas presentes en el humo del cigarro, donde las mujeres que son además mutantes para alguno de los alelos del gen que codifica para la enzima Glutation S-Transferasa tendrán un riesgo aún mayor, pues esta es la encargada de eliminar el 1,3 butadieno, uno de los carcinógenos presente en el humo del cigarro.<sup>165, 166, 167, 168, 169, 170, 171</sup>

Estudios in vitro con líneas celulares normales y neoplásicas mostraron cambios en la expresión genética de enzimas metiltransferasas del ADN, tras la exposición por un breve periodo de tiempo a la nicotina y otros compuestos del humo del cigarro. Todos estos argumentos explican el riesgo incrementado de lesiones intraepiteliales cervicales y CCU en mujeres fumadoras.<sup>172, 173, 174, 175</sup> En Los resultados del presente estudio, de manera general, predominó el grupo de las no fumadoras (tabla 2), sin embargo

como se verá con posterioridad, si hubo asociación estadística significativa de forma individual para algunos VPH en específico y serán explicados los argumentos al respecto, para la variable tabaquismo y también para las variables biopsia y colposcopia positiva.

La edad es otra variable que es necesaria evaluar cuando se estudia la presencia del VPH en las lesiones intraepiteliales cervicales y CCU, la probabilidad de desarrollar esta enfermedad es muy bajo entre las mujeres menores de quince años y se eleva desde la adolescencia hasta mediados de la cuarta década de la vida. Este fenómeno se precisa en los estudios de prevalencia a nivel mundial, en los que advierten dos picos de edades específicas, una en el grupo de mujeres entre los 15 y 25 años de edad que coincide con el inicio de las relaciones sexuales y también un segundo pico en mujeres de edad media, aunque este último no se registra en algunos países.<sup>150, 154, 176, 177, 178</sup>

Este hecho coloca a las adolescentes y a las adultas jóvenes como grupos de riesgo para desarrollar lesiones premalignas y malignas de cuello uterino. Se sabe que en especial las adolescentes, la zona más sensible a la infección por el VPH, la unión escamo-columnar o zona de transformación, se localiza en el exocervix por lo que aumenta la probabilidad de una infección por el virus.<sup>150, 176, 179</sup>

En la descripción de esta variable, se puede afirmar que los resultados de la presente investigación coinciden de forma aproximada con lo reportado en la literatura internacional y también con la nacional más reciente, donde Soto et

al, reportan el grupo de 20 a 30 años de edad como el de mayor frecuencia.<sup>70, 179</sup> (Tabla 3)

La menarquia precoz es otro factor sobre el cual los investigadores no han llegado a un consenso. Patil V y Cols, en su estudio con 230 pacientes encontraron asociación estadística con este factor,<sup>164, 180, 181,182</sup> sin embargo, Cabrera y Benia en sus respectivos estudios no reportaron relación alguna.<sup>176, 183, 184</sup>

Los argumentos para las variables edad de las primeras relaciones sexuales y el número de parejas en los últimos dos años, serán expuestos mas adelante cuando se analicen las asociaciones estadísticas correspondientes.

#### **2.4.2.3 Identificación molecular del virus del papiloma humano en las pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino**

En el presente estudio se analizaron 78 muestras de pacientes con CCU que pertenecían a la provincia Camagüey. Las tomas de las muestras a partir de las lesiones intraepiteliales cervicales y CCU fueron suficientes para el estudio histológico por biopsia y para los estudios moleculares.

##### **2.4.2.3.1 Purificación de ADN genómico a partir de las muestras de pacientes con CCU**

Se purificó ADN genómico a partir de las muestras de cuello uterino obtenidas de cada paciente y su calidad fue verificada por electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,8 %. Se aplicó en cada carril 1 µL, estimándose



un rendimiento de 4 a 60 ng/μL. Algunos de los ADN obtenidos estaban degradados o con baja calidad y fue necesario purificar nuevamente ADN genómico a partir de las muestras correspondientes. (Anexo 7)

#### **2.4.2.3.2 Tipificación de los virus del papiloma humano (VPH)**

Una vez obtenido el ADN de cada una de las muestras de las 78 pacientes, con diagnóstico positivo de CCU, se realizaron las técnicas de RFLP y qPCR para amplificar segmentos de ADN de los genes L1, E6 y E7 del genoma VPH. Se pudo confirmar la presencia de genotipos VPH-AR y VPH-BR en 53 de las muestras de las 78 pacientes, lo que representa el 66, 6 % del total.

##### **2.4.2.3.2.1 Estudio de los VPH mediante Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)**

En general se estudiaron 22 pacientes a través de las técnicas de RFLP y secuenciación nucleotídica.

Como se esperaba, el segmento amplificado por PCR convencional tuvo una longitud de unos 450 pb al ser visualizado en gel de agarosa y ser comparado con los patrones de peso molecular, (100 pb DNA Ladder, Promega, EUA y Molecular Weight Marker XIV, Roche).

Debido a que los oligonucleótidos My09 y My11 empleados hibridan en una región del gen L1 del VPH, según se ha hecho referencia y ha sido reportado por varios autores.<sup>52, 128, 185</sup> La banda de aproximadamente 450 pb, que se observa en el gel, significa que el ADN del VPH está presente en las células estudiadas. (Figura 3 y anexo 8).

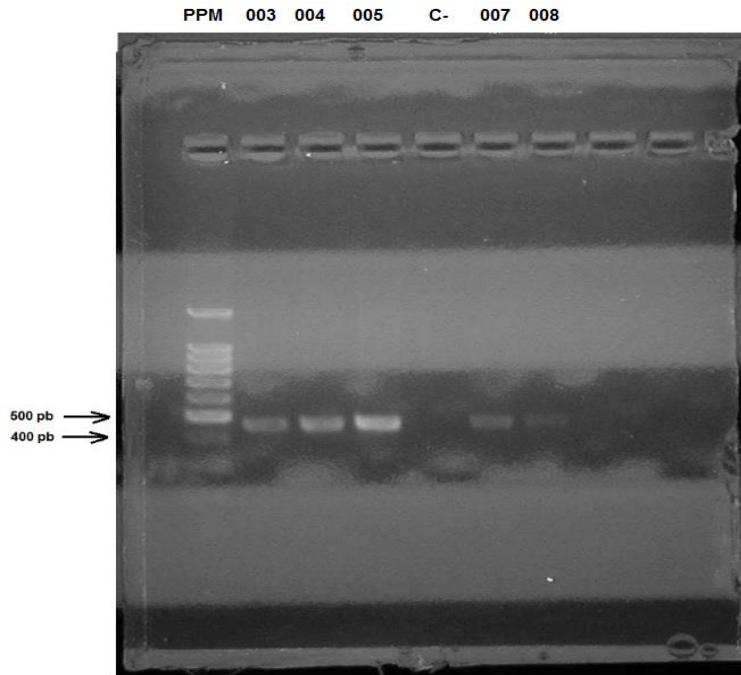


Figura 3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa normal al 0,8 % donde se observan el patrón de peso molecular (PPM), las bandas de 450 pb amplificadas por el PCR convencional de los pacientes jcp003, jcp004, jcp005, jcp007 y jc008 y el control negativo (c-).

Las bandas observadas en los geles de las figuras 5 y 6, se corresponde con un fragmento del gen L1 perteneciente al genoma de los VPH, de cualquiera de los genotipos siguientes: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 55, 56, 58, y 59, puesto que los oligonucleótidos My09/11 son consensos y capaces de detectar 18 genotipos VPH distintos. <sup>128</sup>

Para diferenciar los VPH se diseñó un algoritmo diagnóstico mediante el empleo de endonucleasas de restricción según los criterios descritos en la metodología (Anexo 9), todo lo cual permitió hacer el análisis de restricción del segmento amplificado por la PCR convencional.

Durante la tipificación de los genotipos, según la estrategia diseñada, se usaron las enzimas restricción Pst I, Dra I y EcoR I.

Sin embargo, el estudio de restricción aún así no fue suficiente, por lo cual se procedió a secuenciar los fragmentos de ADN amplificados por PCR convencional a partir de las muestras de las pacientes incluidas en el estudio para confirmar los genotipos sugeridos.

#### **2.4.2.3.2 Confirmación del RFLP por secuenciación nucleotídica**

La confirmación de los resultados del RFLP se realizó mediante la secuenciación de los productos amplificados por la PCR convencional.

Se enviaron a secuenciar a la compañía MacroGen (Seúl, Corea del Sur), los productos obtenidos por PCR convencional de 14 pacientes registrados con los códigos siguientes: (jcp003, jcp004, jcp005, jcp007, jcp008, H11, H12, H13, H14, H16, H18, H19, H20, H21), el resto de las muestras obtenidas no tuvieron la calidad necesaria.

Para algunas muestras con menos concentración de ADN fue imprescindible realizar una segunda ronda de PCR con el objetivo de obtener suficiente material. A continuación, los productos de las amplificaciones correspondientes a una misma muestra se mezclaron, y todas las muestras ya preparadas se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean - Up System (Promega, EUA). De este modo se lograron preparaciones de 30 µL totales de ADN con una concentración de 10 a 80 ng/µL, suficientes para enviarlas a la empresa MacroGen con las ordenes (130606FN-142) y

(140414FN-121), y secuenciar ambas cadenas con los oligonucleótidos My09 y My11.

En el anexo 10 se observan las preparaciones purificadas de las pacientes jcp003-005 y 007-010 que se enviaron para la secuenciación. Las bandas de las pacientes 008 y 010 no se observan bien en la foto, pero fueron positivas al análisis del gel a simple vista en el transiluminador.

#### **2.4.2.3.2.2.1 Procesamiento, ensamblado y alineamiento de secuencias.**

Para realizar el ensamblado de las secuencias primarias recibida de la empresa MacroGen en formato FastQ, se utilizó el software Vector NTI 7.1. Los segmentos de secuencia que presentaron QV menor que 20 (QV, valor de calidad, QV del inglés Qual Value) en la escala Phared, fueron retirados de ambos extremos de la cadena para obtener las cadenas curadas. Las cadenas complementarias curadas fueron ensambladas en el software Vector NTI para obtener las secuencias resultantes de la hebra de doble cadena de cada producto de la PCR.

Posteriormente, los resultados de las secuencias obtenidas se sometieron al análisis de alineamiento de secuencias, usando la herramienta BLAST en la base de datos NCBI.<sup>131</sup> Con la herramienta BLAST los parámetros más importantes a considerar son el por ciento de cobertura (QC, del inglés Query cover), que corresponde al por ciento de cobertura entre nuestra secuencia problema y la secuencia que proporciona la base de datos como la de mayor similitud. El otro parámetro a considerar es el Valor E (EV, del inglés E value), que corresponde con la probabilidad de que ese

apareamiento se haya producido por azar, y por lo tanto, lo que se espera es que E value sea muy pequeño.

Como resultado del análisis con la herramienta BLAST, el alineamiento y porcentaje de cobertura de las secuencias problemas obtuvo entre un 99 y 100 %, lo cual se considera muy factible. En el caso del E Value, todas las secuencias problemas obtuvieron valores en el rango de 0,0 a  $8 \times 10^{-132}$  ( $8e-132$ ), lo cual también se considera óptimo. (Anexos 11, 12 y 13)

#### **2.4.2.3.2.3 Estudio de los VPH mediante PCR en Tiempo Real (qPCR)**

En general se estudiaron 56 pacientes a través de qPCR, de estas pacientes resultaron positivas 31 a VPH, para un 55,3 %. En las restantes 25 muestras de pacientes no se descartan genotipos VPH-AR menos frecuentes pues, en el diseño del qPCR no se incluyeron los oligonucleótidos para identificar genotipos VPH-AR menos frecuentes. No obstante, estas pacientes se descartaron de la investigación.

#### **2.4.2.3.2.4 Frecuencias de infección y genotipos VPH identificados en los pacientes en el periodo de estudio**

A partir de las muestras estudiadas se identificaron ocho genotipos VPHs distintos, seis genotipos de alto riesgo y dos genotipos de bajo riesgo, también se identificaron 10 pacientes infectados con múltiples VPHs.

En la figura 4 se muestran las frecuencias relativas de la infección por VPHs en las 53 pacientes positivas. El genotipo de alto riesgo oncogénico más frecuente fue el VPH-AR 16 con un 67,9% (36/53) de positividad, el segundo

genotipo más frecuentes fue el VPH-AR 31 con un 18,9% (10/53), luego el genotipo VPH-AR-58 para un 15,1% (8/53), mientras el VPH-AR 18 ocupó el cuarto lugar en frecuencia con el 11,3% (6/53), seguidos de los genotipos VPH-AR 52 y 33 con 7,5% (4/53) y 3,8% (2/53) respectivamente.

Se identificaron además genotipos de bajo riesgo oncogénico como el VPH-BR 6 con un 5,7% (3/53) y el genotipo VPH-BR 11 con un 3,8% (2/53). También se identificaron pacientes con infecciones múltiples a varios genotipos VPH-AR y VPH-BR con un 18,9% (10/53).

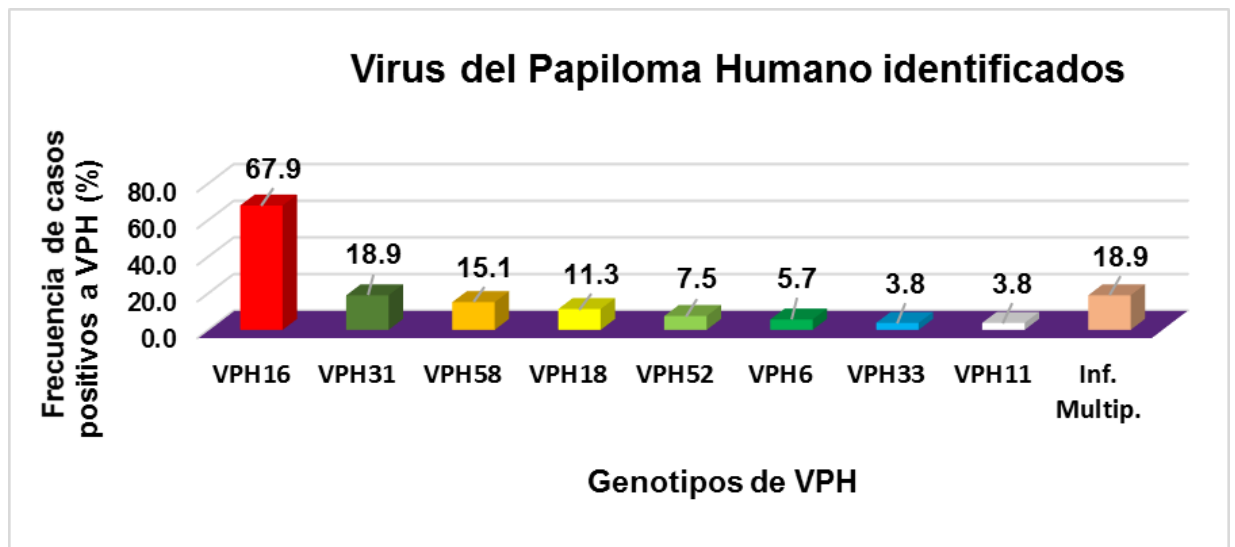


Figura 4. Se muestran las frecuencias relativas de la infección por VPH en las 53 pacientes positivas.

La referencia estándar utilizada para el diagnóstico de las lesiones precancerosas de CCU en muchos países, incluyendo a Cuba, ha sido la citología convencional y la confirmación histológica de una lesión intraepitelial de alto grado (NIC II, NIC III). Para el desarrollo de estas

lesiones, ha sido reconocida la infección con un VPH-AR y su persistencia, como causa necesaria. La infección con un VHP-AR no puede ser demostrada mediante estos métodos diagnósticos sino, a través de los estudios moleculares que validan la presencia del ADN viral y caracteriza el genotipo.<sup>186</sup>

Como resultado de la acumulación del conocimiento en las tres últimas décadas así como las evidencias aportadas por los ensayos realizados en esta área del saber científico, los test de ADN demostraron muy rápido que tenían mayor sensibilidad que la citología convencional, por lo que surge la necesidad de introducirlos en la práctica médica, y se convirtieron en una alternativa atractiva para identificar mujeres con riesgo de desarrollar un cáncer cervical invasivo.<sup>133, 186,187</sup>

Al desarrollar la presente investigación se identificaron, como se esperaba, genotipos que pertenecen al grupo de los VPH-AR, pues es necesario tener en cuenta que en la investigación se incluyeron muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y CCU, sin embargo, también fueron identificados genotipos VPH-BR en muestras de pacientes con infecciones múltiples.

En el mundo los genotipos de alto riesgo reportados para el CCU son: 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y ocho son los causantes del 90 % de los cánceres cervicales, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58, de estos resultan los más frecuentes los genotipos 16 y 18.<sup>36,68,70,132,150,151</sup>

Los datos de prevalencia de los genotipos VPH y su distribución en diferentes áreas geográficas son particularmente importantes para analizar e intentar reducir la carga de epidemiológica de CCU. La importancia radica en que, a partir de esta información esencial, cada país pueda evaluar a gran escala la introducción de una vacuna profiláctica y estimar prospectivamente su eficacia, así como fortalecer y optimizar los programas y estrategias de prevención al identificar las mujeres con mayores riesgos de desarrollar el CCU.

Por otro lado, también favorecen el desarrollo de registros para el cáncer, monitorear el impacto que tienen en el control de esta enfermedad en la población y por último, resulta valioso para la discusión de las políticas nacionales de control y prevención de cáncer, que deben tener en consideración la contribución local de los VPH-AR que además producen otros cánceres como: vulva, vagina, ano, pene, cavidad oral, orofaringe, conjuntiva y piel, entre otros. <sup>133,165, 175, 176</sup>

La prevalencia y distribución de los genotipos VPH varían según la localización geográfica y según la edad con tendencia a disminuir en el envejecimiento. La prevalencia y distribución de los genotipos VPH además varía según el grado de la lesión cervical, observándose un incremento de los genotipos VHP 16 y VPH 18, paralelamente a la severidad de la lesión.

187

En estudio realizado por Themba G. y Cols, en Suazilandia, África del sur, se estimó una prevalencia del VPH-16 en un 12,4 %, sin embargo, el VPH-31 y



el VPH-18 no se identificaron de forma aislada sino en dos grupos de pacientes con infección múltiple a otros VPH-AR, que representaron el 26,7 % y 13,8 % respectivamente, por lo que no se pudo calcular su prevalencia individual de estos últimos. <sup>188</sup>

Resultados diferentes fueron reportados en un estudio realizado por Sabol I y Cols., en Croacia donde el VPH-AR 16 se encontró con una prevalencia de 60,9 % en los pacientes con CCU y el VPH-AR 18 y 31 se encontraron en un 8,7 % y 2,2 % respectivamente, ocupando el tercero y cuarto lugar en frecuencia de aparición. <sup>189</sup>

En otro estudio realizado por Martins TR y Cols, en Brasil se pudo constatar que el virus del papiloma humano de mayor frecuencia fue el VPH-AR 16, seguido de los VPH-AR 31 y el VPH-AR 18 con un 23,2 %, 7,7 % y 5 % respectivamente; no obstante, VPH-AR 16 estuvo presente en 66,7 % de las pacientes con CCU. <sup>187</sup>

Resulta Interesante que en un meta análisis realizado por Bruni L y Cols, en cinco continentes, se encontró que el VPH-AR 16 ocupó el primer lugar en frecuencia en todo el mundo y en cada continente; mientras que el segundo lugar lo ocupó en el mundo el VPH-AR 18, el VPH-AR 31 en Europa y el VPH-AR 52 en África; el VPH-AR 31 y el VPH-AR 18 en América Latina; el VPH-AR 18 en Norte América y Asia. Además, el tercer lugar en frecuencia en el mundo lo ocupó el VPH-AR 52; el VPH-AR 18 en Europa; en África tres de ellos: lo VPH-ARs 31,35 y 18; mientras en América Latina lo fue el VPH-AR 58, para Norte América y Asia lo fue el VPH-AR 52. <sup>187,190</sup>

En el año 2015, Holl K y Cols realizaron otro estudio en diecisiete países europeos donde se pudo corroborar, de modo general, que en el 50,5 % de los adenocarcinomas estaba presente el VPH-AR 16, en el 39,8 % el VPH-AR 18, seguidos de los VPH-ARs 45, 33 y 31 con 8,0 %, 0,6 % y 0,3 % respectivamente. No obstante, a que el VPH-AR 16 fue el de mayor prevalencia, sí se constató de modo específico, que el VPH-AR 18 fue el de mayor frecuencia en Dinamarca, Alemania y Grecia y que el VPH-AR 45 fue el tercero más prevalente en todos los países excepto en Bélgica y Portugal donde se confirmó el VPH-AR 31. <sup>191</sup>

En América Latina y el Caribe aparece con más frecuencia el VP-AR 16 con un 53,2 %.<sup>188</sup> En estudio realizado por de Oliveira en Sao Paulo, Brasil, el VPH-AR 16 se presentó en el 77,6 % de las pacientes, y los VPH-ARs 18, 31, 33 y 35 en el 12,3 %, 8,8 %, 7,1 % y 5,9 % respectivamente.<sup>192</sup> Sin embargo, en este continente también es posible encontrar resultados muy diferentes, Tsung-Chieh J F y Cols. en un estudio realizado en la universidad Washington, observaron que los virus del papiloma más frecuentes no fueron los VPH-ARs 16 y 18 sino, el VPH-AR 53 seguido de los VPH-ARs 51, 16, 31 y 18 con un 16,1 %; 14,4 %; 8,6 %; 5,4 % y 3,7 % respectivamente.<sup>193</sup>

En un estudio realizado en Turquía por Fatma B T y Cols., aparece de nuevo dentro de las infecciones individuales, el virus del papiloma humano. El VPH-AR 16 con mayor frecuencia para un 16,5 %, seguido del VPH-ARs 58, 31 y

33 con 14,3 %, 5,5 % y 5,5 % respectivamente y no se detectó en ninguna muestra estudiada el VPH-AR 18.<sup>194</sup>

Como se puede observar continúan apareciendo evidencias, en otras partes del mundo, que apuntan hacia los VPH-ARs 16, 18, 31, 33, 45 como los más identificados en el CCU, en general el de mayor prevalencia es el VPH-AR 16, aunque en unos pocos países ha resultado ser el VPH-AR 18. En relación al orden de frecuencia, la segunda posición es casi siempre ocupada por los VPH-ARs 18, el 31 o el 58.

En Cuba se han podido constatar los genotipos VPH-ARs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 82, 85, donde el VPH-AR más frecuente fue el VPH-AR 16, seguidos indistintamente como segundo más frecuente, a los VPH-ARs 18, 31 y 33.<sup>52, 60, 66, 195</sup>

La presente investigación reveló que el genotipo más frecuente en la provincia Camagüey, fue el VPH-AR 16, seguido del VPH-AR 31 y el tercero más frecuente fue el VPH-AR 58. El VPH-AR 18 ocupó el cuarto genotipo más frecuente. (Figura 4) Los resultados del actual estudio concuerdan con los obtenidos por otros autores en otros países y además con los reportados al estudiar pacientes de otras provincias Cubanas, pues el genotipo VPH-AR 16 ha sido históricamente el más frecuente de todos ellos.<sup>59,60,66,67,68,70,195</sup>

Sin embargo, el genotipo VPH-AR 31 se reporta como el segundo más frecuente solo en algunos países o áreas geográficas como en Europa, América Latina, Brasil y Cuba.<sup>187,189,195</sup> Un incidente muy distinto es el relacionado con la frecuencia en que aparece el VPH-AR 58, pues en los

estudios epidemiológicos en el mundo casi siempre se presenta como muy poco frecuente.<sup>59,60,187,192,193</sup> Sin embargo, en el estudio de Fatma B T y Cols, en Turquía fue el segundo más frecuente.<sup>194</sup> Los resultados de la presente investigación coinciden con los obtenidos por Bruni L y Cols, que confirman al VPH-AR 58 como el tercero más frecuente en América Latina<sup>190</sup> y muy aproximado a los publicados por Soto Brito Y y Cols, reportado para Cuba como el cuarto más frecuente.<sup>68,195</sup>

En relación al VPH-AR 18, los resultados de la actual investigación notifican a este genotipo como el cuarto más frecuente, lo cual no coincide con lo reportado en la mayoría de los estudios internacionales como el segundo en frecuencia,<sup>189,190,191,192</sup> inclusive como el más frecuente en algunos países europeos como Dinamarca, Alemania y Grecia.<sup>191</sup> Sin embargo, en Cuba solo el trabajo publicado por Río Hernández M A y Cols, lo señala como el segundo más frecuente<sup>66</sup> pues, algunos trabajos de Soto Brito Y y Cols, lo reportan como el tercero más frecuente, lo cual está en mayor correspondencia con lo referido en la actual investigación.<sup>67, 114,195</sup>

El resto de los genotipos identificados en el presente trabajo, VHP-ARs 33, 52, 11 y 6, normalmente se registran en la literatura internacional como de baja frecuencia en las lesiones de cuello uterino de alto grado,<sup>58,59,60,66,68,69,70</sup> aunque, no ocurrió así en uno de los trabajos publicados en Cuba, donde el VPH-AR 33 tuvo el segundo lugar en frecuencia.<sup>68</sup>

Según el autor del presente estudio, las diferencias halladas pueden ser justificadas por el número de pacientes que participaron en la investigación, y es posible que cambien al incluir a un mayor número de pacientes.

Desde el punto de vista de la epidemiología molecular, es importante destacar que hasta el momento en que se realizó la presente investigación, se desconocían los genotipos VPH de alto riesgo que circulaban en la provincia Camagüey, lo cual constituye uno de sus principales aportes al conocimiento.

#### **2.4.2.4 Asociación entre la infección por el virus papiloma humano y algunas variables clínicas epidemiológicas**

Se analizó la asociación entre los VPH-ARs de mayor frecuencia (VPH-ARs 16, 31, 58, 18 y algunas de las variables clínicas epidemiológicas presentes en las pacientes incluidas en la investigación. Las variables evaluadas fueron: DIU, partos, abortos, ITS, tabaquismo, biopsia positiva, colposcopia positiva, edad, menarquía, edad de las primeras relaciones sexuales y el número de parejas en los últimos dos años.

Solo se comprobó asociación estadística, mediante tablas de contingencia, la prueba de Chi-cuadro de Pearson y la prueba exacta de Fisher, entre los VPH-ARs 16 y 31 con la variable tabaquismo, ( $P=0,045$ ) y ( $P=0,031$ ) respectivamente; además para la variable biopsia positiva con el VPH-AR 16 ( $P=0,001$ ) y con el VPH-AR 18 ( $P=0,014$ ), igualmente para la variable colposcopia positiva con el VPH-AR 18 ( $P=0,025$ ), Sin embargo, no se

encontró asociación estadística para el VPH-AR 58 ni para el resto de las variables clínicas epidemiológicas. (Tabla 4)

Tabla 4. Asociación estadística entre los virus del papiloma humano identificados con mayor frecuencia y algunas variables clínico epidemiológicas como tabaquismo, biopsia positiva y la colposcopia positiva.

<b>Variables</b>	<b>VPH-AR 16</b>	<b>VPH-AR 31</b>	<b>VPH-AR 58</b>	<b>VPH-AR 18</b>
Tabaquismo	<b>0,045</b>	<b>0,031</b>	0,255	0,161
Biopsia positiva	<b>0,001</b>	0,054	0,064	<b>0,014</b>
Colposcopia positiva	0,170	0,481	0,285	<b>0,025</b>

**Abreviaturas: VPH-AR:** Virus del papiloma humano de Alto Riesgo.

La asociación estadística de la variable VPH identificado con las variables biopsia y colposcópica positiva, a juicio del autor, se fundamenta en la mayor carga viral del VPH-AR 16 y el VPH-AR 18 con respecto a otros VPH-AR, como será discutido mas adelante.

Tampoco se demostró, al menos con los datos registrados, asociación estadísticamente significativa entre la variable VPH identificado y las variables edad, menarquía, edad de las primeras relaciones sexuales y el número de parejas en los últimos dos años. En opinión del autor del presente trabajo, este hecho puede explicarse por el número de pacientes incluidas en la investigación, a pesar de que estas variables mencionadas,

justificadamente constituyen factores predisponentes como consecuencia de factores fisiológicos y sociales. (Tabla 5)

Tabla 5. Asociación entre los virus del papiloma humano identificados con mayor frecuencia y algunas variables clínico epidemiológicas como edad, menarquia, edad de las primeras relaciones sexuales y el número de parejas en los últimos dos años.

<b>VARIABLES CLÍNICAS</b>	<b>Edad</b>	<b>Menarquia</b>	<b>Edad de las primeras relaciones sexuales</b>	<b>Número de parejas en los últimos 2 años</b>
VPH identificado	0,195	0,346	0,810	0,100

#### **2.4.2.5 Infecciones múltiples por virus del papiloma humano**

Se identificaron infecciones múltiples en el 18,9 % (10/53) de las muestras, encontrándose hasta cuatro genotipos diferentes en una misma muestra. La combinación más frecuente fueron los genotipos VPH-ARs 16, 31, 33 con el 20 % (2/10), seguida de las otras ocho combinaciones VPH-ARs 6,16, 31, 58; VPH-ARs 18, 31, 58; VPH-ARs 16, 31, 58; VPH-ARs 16,52,58; VPH-ARs 18, 31; VPH-ARs 52, 58; VPH-ARs 18, 58; VPH-AR/BRs 6,16, 31, todas con una frecuencia del 10 % (1/10), respectivamente. (Figura 5)

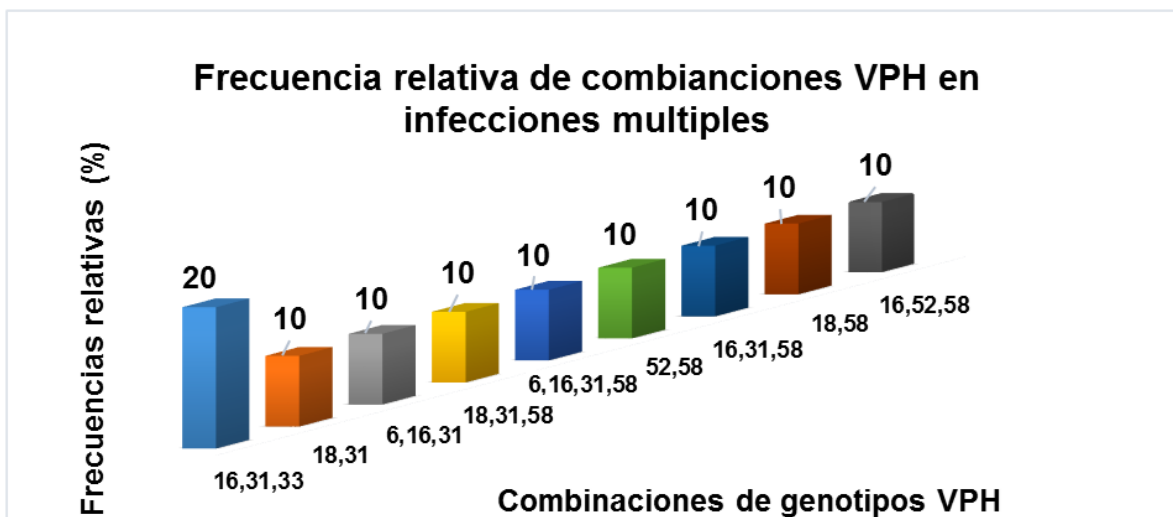


Figura 5. Frecuencias relativas de infecciones múltiples a varios genotipos VPH-AR y VPH-BR, en pacientes en estudio de la provincia Camagüey.

En varios estudios el rango reportado de infección múltiple a VPH, fluctúa entre el 11,4% y el 40 %, y el VPH-AR 16 aparece en la mayoría de las combinaciones con otros VPH. <sup>175, 176, 196,197, 198</sup> Recientemente, en el año 2020, Soto Brito Y y Cols, publicaron un trabajo donde el por ciento de infección múltiple alcanzó el 23 % de modo general, en esa investigación participaron pacientes de tres provincias, La Habana, Villa Clara y Holguín. El por ciento de las infecciones múltiples fue del 33,3 %, 30,8 % y 10 % respectivamente.<sup>195</sup>

En los resultados expuestos en el presente trabajo, el 18,9 % (10/53) de las pacientes tuvieron infecciones múltiples y el VPH-AR 16 estuvo presente en cinco de las nueve combinaciones para un 55,5 %, en correspondencia con los anteriormente comentados. Es común encontrar infecciones múltiples a



VPH en mujeres que han tenido múltiples compañeros sexuales, fumadoras, o inmunodeprimidas, entre otros factores.<sup>175, 176, 198</sup>

Al evaluar la asociación estadística para la variable infecciones múltiples y la variable tabaquismo, no hubo diferencias significativas ( $P=0,097$ ), tampoco se encontró diferencias significativas para las variables infecciones múltiples y las variables número de parejas sexuales en los últimos dos años ( $P=0,686$ ).

#### 2.4.2.6 Cuantificación de la carga viral del VPH en las muestras clínicas

De las 56 muestras de pacientes estudiadas por qPCR, el 55,3 % (31/56) resultaron positivas, de ellas fueron seleccionados los genotipos más frecuentes para determinarles la carga viral (VPH-ARs 16, 18, 31, 52 y 58).

Los valores máximos estuvieron por encima de  $10^3$  copias/mL, independientemente del genotipo. Se empleó la prueba no paramétrica Anova de Kruskal-Wallis para constatar diferencias significativas ( $p=0,0001$ ) entre las medianas de las cargas virales de los diferentes genotipos identificados y con mayor frecuencia. Los genotipos con mayor carga viral resultaron ser el VPH-AR 16 y el VPH-AR 18. (Figura 6)

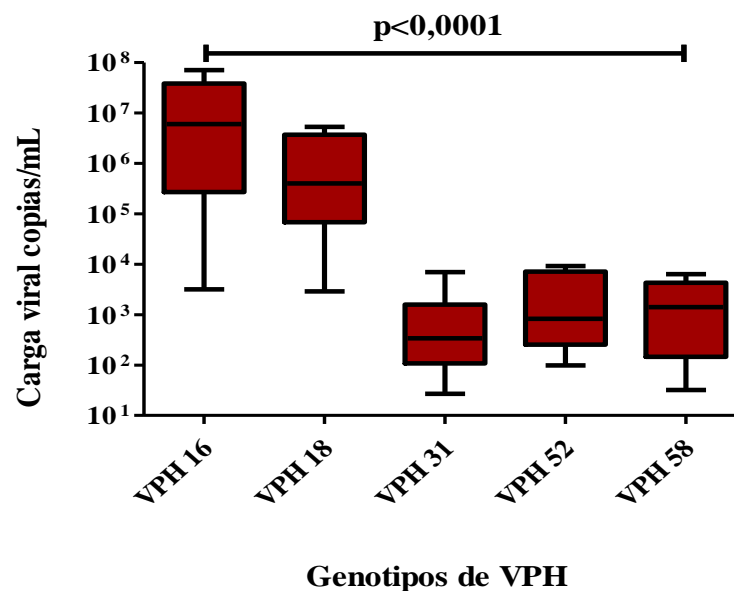


Figura 6. Valores de carga viral de los genotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico, detectados en mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, residentes en la provincia Camagüey.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $p=0,0624$ ) entre las medianas calculadas para las cargas virales de los genotipos VPH-ARs 16 y 18, de acuerdo con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con un valor para el estadígrafo  $U=50,00$  y un nivel de significación del 95 %. (Figura 7)

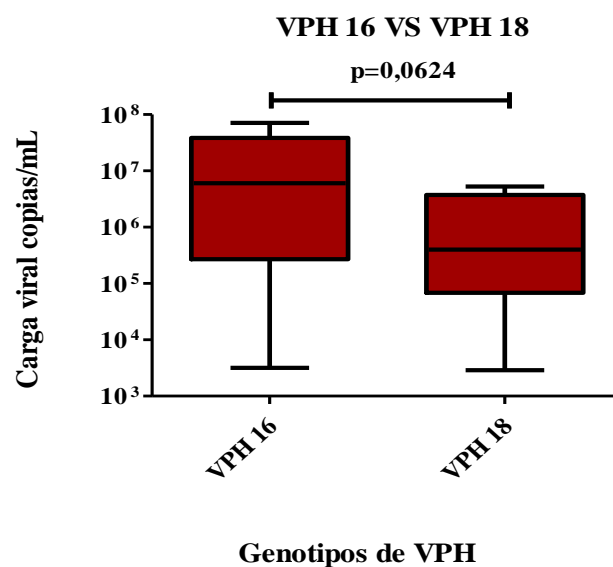


Figura 7. Valores de carga viral de los genotipos del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico VPH 16 y VPH 18, detectados en mujeres en estudio, residentes en la provincia Camagüey.

No obstante, y en correspondencia con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney con un nivel de significación del 95%, sí se observaron diferencias significativas entre genotipos VPH-AR 31, VPH-AR 52 y el VPH-

AR 58 con respecto al VPH-AR 16. Para el VPH-AR 31,  $p=0,0001$  estadígrafo  $U=3,000$ ; para el VPH 52,  $p=0,0021$  estadígrafo  $U=3,000$  y para el VPH 58,  $p=0,0001$  estadígrafo  $U=4,000$ . (Figura 8)

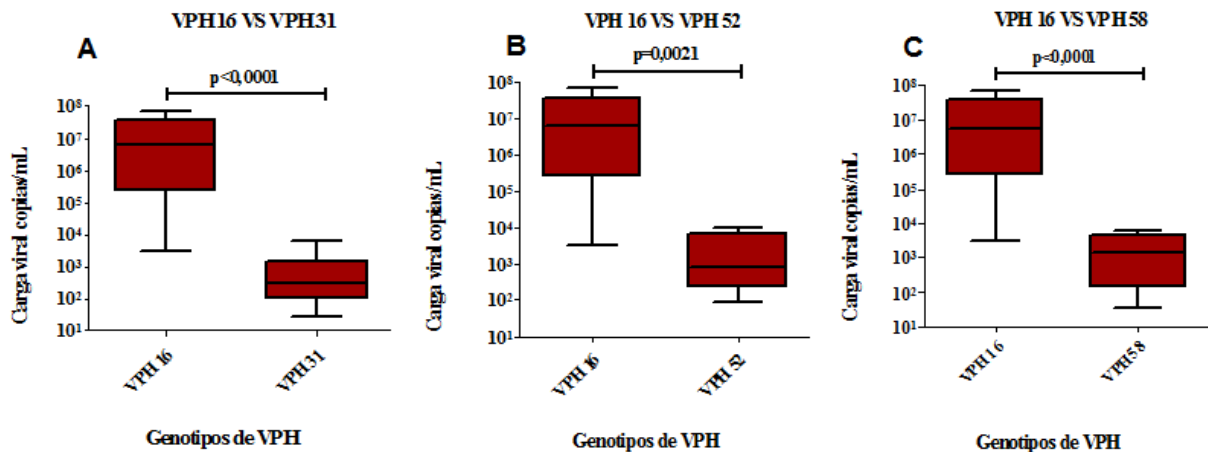


Figura 8. Comparación entre los valores de carga viral del VPH-AR 16 con otros genotipos oncogénicos de VPH detectados en mujeres en estudio, residentes en la provincia Camagüey.

Muchos estudios han planteado que los valores elevados de carga viral de los VPH oncogénicos pudieran ser excelentes candidatos a biomarcadores de severidad, asociado a las lesiones de alto grado y el mal pronóstico.<sup>199, 200, 201, 202</sup>

Este fenómeno se fundamenta en que la integración del genoma VPH al genoma del hospedero está asociado a una mayor carga viral por célula y por tanto, las múltiples copias integradas pudieran contribuir a la persistencia y a funcionar como potenciadores de los eventos de expresión genética de los genes E6 y E7; que a su vez, son principales actores de la carcinogénesis, provocando mayor inestabilidad genética y proliferación

celular.<sup>203</sup> Los resultados de la presente investigación están en correspondencia con lo planteado por estos autores pues, de los VPH-ARs más frecuentes (VPH-ARs 16,18, 31, 52, 58) solo los VPH-ARs con mayor carga viral (VPH-AR 16 y VPH-AR 18), mostraron asociaciones estadísticas, específicamente con las variables tabaquismo, biopsia positiva y colposcopia positiva, como se observa en la tabla 4.

Sin embargo, también se han publicado algunos resultados controversiales en cuanto a la relación encontrada de carga viral y la severidad de las lesiones, parte de ello se debe a que no se ha podido establecer con claridad una la línea base a partir de la cual se consideran elevadas o bajas las cargas virales por varios factores como, diferencias en los métodos de experimentación o diferencias en cuanto a los métodos de estimación en la carga viral, donde parece más reproducible el método de la carga viral por célula.<sup>201</sup>

#### **2.4.2.7 Análisis filogenético de la región secuenciada del gen L1 del VPH-AR 16, a partir de muestras de las pacientes de la provincia Camagüey**

Se realizó el estudio filogenético a partir de las secuencias nucleotídica amplificadas de una región del gen L1 del VPH-AR 16, correspondiente a los pacientes jcp003, jcp004, jcp005, jcp007, jcp008, H11, H12, H13, H14, H16, H19, H20 y H21. Estas secuencias fueron alineadas con las secuencias de referencias para el VPH-AR 16 reportadas por Burk R D y Cols.<sup>138</sup> Una vez

obtenido el alineamiento de las secuencias, las mismas fueron curadas en los dos extremos.

Con el propósito de visualizar mejor las relaciones filogenéticas de las secuencias de los pacientes con las secuencias de referencias, se procedió a realizar dos árboles filogenéticos, separando los pacientes dos grupos, para ello se utilizaron los mismos parámetros y métodos.

#### 2.4.2.7.1 Análisis filogenético para los pacientes jcp003, jcp004, jcp005, jcp007, jcp008

Se realizó, mediante el software MEGA versión 11.0.13, el alineamiento para las secuencias obtenidas del gen L1 del virus del VPH-AR 16 que infectaron los pacientes jcp003, jcp004, jcp005, jcp007 y jcp008 con respecto a las secuencias de referencias. (Anexo 14) Para la construcción del árbol filogenético se empleó el mejor modelo de sustitución nucleotídica: Tamura 3 parámetros, además de los métodos estadísticos máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Tree), y Bootstrop, implementados mediante el software MEGA versión 11.0.13. (Anexo 15, Anexo 16, y figura 9)

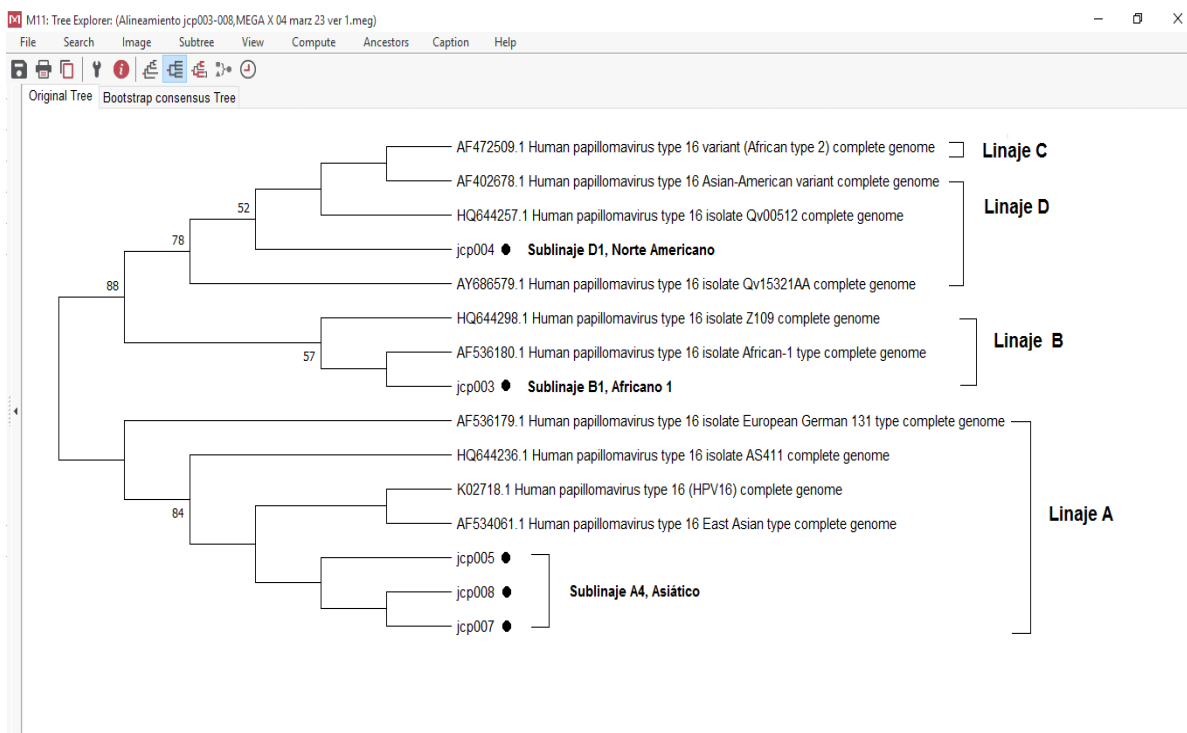


Figura 9. Árbol filogenético donde se observan las relaciones intratípicas de los VPH 16 obtenidas de los pacientes jcp003, jcp004, jcp005, jcp007 y jcp008 con respecto a las secuencias de referencias reportadas del VPH-AR 16.

#### 2.4.2.7.2 Análisis filogenético para los pacientes H11, H12, H13, H14, H16, H19, H20 y H21

Se realizó, mediante el software MEGA versión 11.0.13, el alineamiento para las secuencias obtenidas del gen L1 del virus del VPH-AR 16 que infectaron los pacientes H11, H12, H13, H14, H16, H19, H20 y H21 con respecto a las secuencias de referencias reportadas en la base de datos de NCBI. (Anexo 17)

Para la construcción del árbol filogenético se empleó el mejor modelo de sustitución nucleotídica: Tamura 3 parámetros, además de los métodos estadísticos máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Tree), y Bootstrop, implementados mediante el software MEGA versión 11.0.13. (Anexo 18, anexo 19 y figura 10)

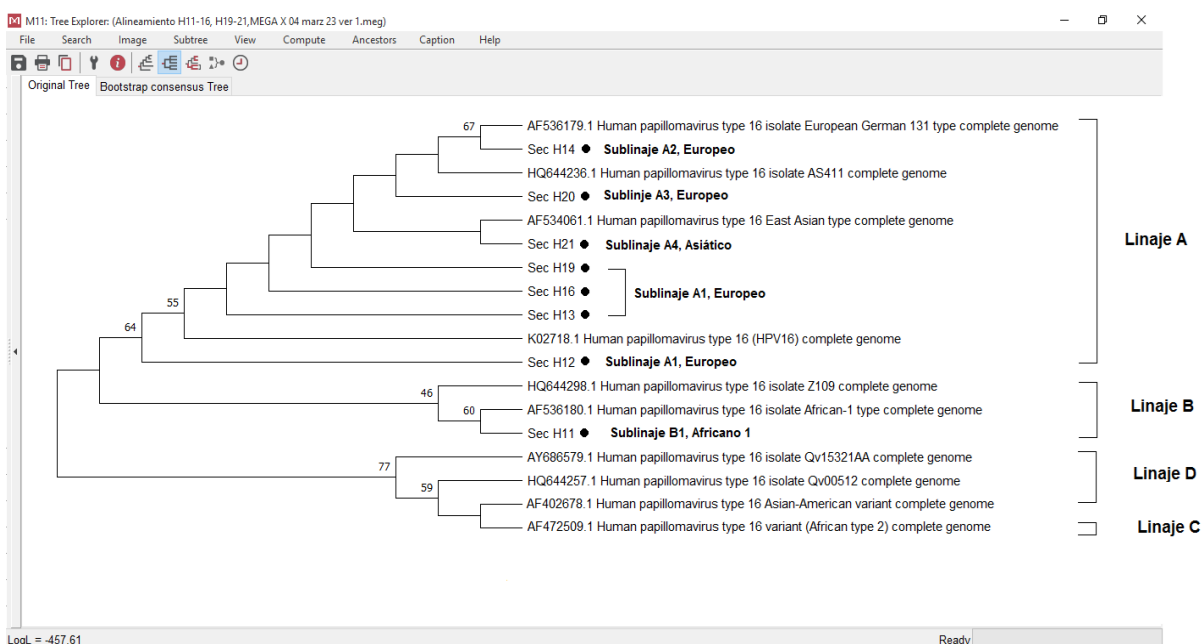


Figura 10. Árbol filogenético donde se observan las relaciones intratípicas de los VPH 16 obtenidas de los pacientes H11, H12, H13, H14, H16, H19, H20 y H21 con respecto a las secuencias de referencias reportadas del VPH-AR 16.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la región del gen L1 del VPH-AR 16, reveló que el 76,9 % (10/13) se agruparon con linaje A, el 15,3 % (2/13) con el linaje B y el 7,6 % (1/13) con el linaje D, no se encontró ningún paciente asociado al linaje C. (Anexo 20) Así mismo se constató que el 46,1 % (6/13) son de origen europeo (sublinajes A1, A2, A3); el 30,7% (4/13) son de origen asiático (sublinaje A4); que el 15,3 % (2/13) son de origen africano (sublinaje B1); y el 7,6 % (1/13) es de origen norteamericano (sublinaje D1) (Anexo 20)

Los linajes europeos del VPH-AR 16 prevalecen en el mundo pero son menos frecuentes en África, Asia y América.<sup>204</sup> Varias investigaciones en América latina reportan distintos por cientos en cuanto las frecuencias encontradas del Linaje A, en Argentina fue un 92,1%<sup>205</sup> en Uruguay 89 %, <sup>206</sup> en Paraguay 82 %, <sup>207</sup> en Ecuador 68 %, <sup>208</sup> en el noreste de Brasil con el 49 %<sup>029</sup> y en México 13%<sup>210</sup> por lo tanto, el 76,9 % encontrado en el presente estudio se aproxima a los resultados obtenidos en las Américas, sobre todo con los reportados en Ecuador y Paraguay.

En la presente investigación el por ciento del linaje D representó el 7,6 %, resultado similar al reportado en Argentina con el 6,9 %; <sup>205</sup> sin embargo, en el artículo publicado por Mendoza L y Cols,<sup>207</sup> ese por ciento en Paraguay

alcanzó un valor superior, 15 % y aún más elevado en Ecuador con el 31%, en Colombia con el 33% y en Brasil el 43 %.<sup>208, 211, 212</sup>

La caracterización y clasificación molecular del VPH-AR 16 en linajes y sublinajes, tiene importancia en la aplicación y la práctica clínica. Varias investigaciones a nivel mundial afirman, que en poblaciones como las latinoamericanas donde conviven muchas etnias, los sublinajes de variantes no europeas son más agresivas en su potencial para progresar hacia el CCU con respecto a los sublinajes europeos.<sup>205, 209, 213, 214</sup>

Badano I y Cols<sup>205</sup>, sugieren que el linaje D podría constituir un factor de riesgo adicional para el desarrollo de CCU en mujeres del Nordeste de Argentina. da Silva R L y Cols<sup>209</sup> identificaron asociación estadística significativa entre el linaje D y el adenocarcinoma, y también en correspondencia con este criterio, Mejía L y Cols<sup>214</sup> consideraron en una de sus publicaciones que los linajes europeos tienen menor capacidad carcinogénica.

Por lo tanto, desde el punto de vista clínico es fundamental evaluar si la paciente está infectada con una variante europea o no, pues hay evidencias científicas que apuntan hacia un mayor riesgo de infección persistente, en particular para el linaje D, <sup>138, 215, 216</sup> confirmado también por Badano I y Cols,<sup>205</sup> en su estudio realizado en Argentina, sugiriendo que este linaje no europeo, podía constituir un factor de riesgo adicional para el desarrollo de CCU en mujeres del nordeste de ese país.



De los ensayos utilizadas actualmente para confirmar una infección por VPH, las pruebas moleculares es una de las más sensible, varias investigaciones epidemiológicas han evidenciado su elevado valor predictivo negativo, lo cual constituye una ventaja notable porque indica que, cuando el diagnóstico molecular es negativo, garantiza que el riesgo de desarrollo de una lesión de alto grado en una paciente, es prácticamente cero en los próximos de cinco años. De ese modo se consigue alargar el pesquisaje para la prevención del CCU cuando se contrasta con la citología cuya propuesta es cada tres años.<sup>175,176</sup>

Esto no significa que los estudios moleculares excluyan las otras pruebas diagnósticas, sino que deben complementarse en el marco del programa de diagnóstico precoz del CCU.

Cada una de estas pruebas cumple su rol, la tendencia actual en los países desarrollados es que la primera opción sea el diagnóstico molecular en el algoritmo de dicho programa, si es negativa se realizará una nueva pesquisa al cabo de 5 años, pero si resulta positiva, alerta sobre los riesgos de evolución hacia el desarrollo de la enfermedad, informando sobre el genotipo, la carga viral, los linajes y sublinajes de VPH-AR, que constituyen marcadores de severidad.<sup>175, 176</sup>

Luego se continuará con la citología que orienta sobre la presencia de cambios celulares asociados a estos virus, seguido de la colposcopia que permite la inspección visual y la localización de la lesión mediante la aplicación del ácido acético o lugol, posibilitando así la toma de muestra para

la biopsia que concluirá con el estudio histológico para determinar el tipo de lesión presente.<sup>175, 176</sup>

Todos estos datos serán de gran valor para el médico de asistencia porque ayudaría a clasificar a las mujeres en grupos de mayor o menor riesgo, en el momento de tomar las decisiones respecto a la terapia y el seguimiento más oportuno de sus pacientes, por lo tanto, es necesario que además de cumplir con las normativas del programa de diagnóstico precoz del CCU, se introduzca el diagnóstico molecular del VPH como parte del mismo, para reducir la incidencia de esta enfermedad en Cuba.<sup>175, 176</sup>

Por último, es importante destacar que la prevención es una de las herramientas más prometedora con la que contamos para evitar que las mujeres se vean afectadas por el CCU, a lo cual contribuyen de manera fundamental los resultados de la presente investigación en el camino hacia una solución anticipada. El conocimiento de los tipos de VPHs, así como las variantes intratípicas circulantes, es esencial a la hora de plantearse el diseño de nuevos preparados vacunales, para garantizar en el futuro, la protección de la población cubana femenina contra esta enfermedad.

No olvidar que estos preparados vacunales además serán potenciadores de la prevención de otros cánceres distintos del CCU, porque los VPH-ARs son causantes de neoplasias en otras localizaciones como vagina, vulva, ano, pene, piel, orofaringe, mama. De allí la importancia de entender el significado y el impacto potencial de la identificación y caracterización

molecular de los VPHs circulantes en el contexto de la epidemiología de esta enfermedad.

La introducción y aplicación de estos resultados en el diagnóstico precoz y la prevención de varios tipos de cánceres además del CCU, contribuirá a salvar más vidas que en la actualidad, otro pequeño paso por el bien y la salud de la población cubana.<sup>150,175</sup>

### 2.4.3 Conclusiones del capítulo III

- Se identificaron por primera vez, en las pacientes femeninas de la provincia Camagüey con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, los VPHs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 52 y 58. Fueron los VPH-ARs 16, 31, 58 y 18, los más frecuentes.
- Se determinó que el 18,9 % de las pacientes estudiadas presentaron infecciones múltiples a VPH, siendo la combinación más frecuente, la que incluía los VPH-ARs 16, 31, 33.
- Se cuantificó la carga viral de VPH-ARs en las muestras clínicas, siendo los VPH-ARs 16 y 18 los que mayor carga presentaron. Los valores máximos estuvieron por encima de  $10^3$  copias/mL, independientemente del genotipo.
- Se determinó que las variantes intratípicas A del VPH-AR 16 fue el más frecuente y los sublinajes encontrados fueron, A1, A2, A3 europeos, el A4 asiático, B1 africano, así como, el D1 norteamericano.

### 3. CONCLUSIONES GENERALES

- Por primera vez, en la provincia Camagüey, se develaron las características moleculares de los virus del papiloma humano que causan lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, en su población femenina.
- El actual estudio realizado en la provincia Camagüey permitió identificar los virus del papiloma humano que circulan en la población, así como, determinar el porcentaje de infecciones múltiples, la carga viral, las variantes intratípicas y el origen geográfico de los VPHs que afectan a pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer de cuello uterino. Estos hallazgos resultan útiles como biomarcadores de severidad asociados a lesiones de alto grado y mal pronóstico.
- Se reafirma la asociación entre la infección por el VPH y variables clínicas epidemiológicas relacionadas, lo que demuestra su papel en la etiología de las lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino.
- Los hallazgos de la presente investigación, resaltan la importancia de la implementación de estudios moleculares en la provincia Camagüey, orientados a la prevención de lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino.

#### 4. RECOMENDACIONES

- Estudiar un número mayor de mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino en la provincia Camagüey.
- Analizar la variabilidad genética del VPH-AR 16 en otras regiones del genoma del virus, como el LCR y el gen E6.
- Utilizar los resultados de la investigación actual como referencia en diseños de futuros candidatos vacunales preventivo para la población cubana.
- Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden ser empleados para mejorar el manejo clínico de los pacientes atendidos en la consulta de patología de cuello y la consulta regional de ginecología oncológica en la provincia Camagüey.
- La presente investigación aporta resultados que pueden ser utilizados en el perfeccionamiento del programa nacional de diagnóstico precoz del cáncer cervicouterino y por lo tanto, la introducción de estos debería ser evaluada por las autoridades responsables.
- Sugerir al Ministerio de Salud Pública la posibilidad de introducir la vacunación preventiva de la población cubana en riesgo de padecer de lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. [actualizado 20 Ene 2022; cited 1 Jun 2022]. Cáncer cérvicouterino; [aprox. 2 pantallas].

Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>

2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. [Internet]. 2021[cited 2022 jun 1]; 71: [about 40 p.]. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>

3. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. World, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. feb, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf>

4. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Asia, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/935-asia-fact-sheet.pdf>

5. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. India, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/356-india-fact-sheet.pdf>

6. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. China, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 3 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/160-china-fact-sheet.pdf>

7. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Japon, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/392-japan-fact-sheet.pdf>

8. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Democratic Republic of Korea, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/408-korea-democratic-people-republic-of-fact-sheet.pdf>

9. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. África, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/903-africa-fact-sheet.pdf>



10. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Nigeria, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/566-nigeria-fact-sheet.pdf>

11. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Sudáfrica, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/710-south-africa-fact-sheet.pdf>

12. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. República Unida de Tanzania, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/834-tanzania-united-republic-of-fact-sheet.pdf>

13. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. República Democrática del Congo, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/180-congo-democratic-people-republic-of-fact-sheet.pdf>

14. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Etiopia, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/231-ethiopia-fact-sheet.pdf>

15. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Europa, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/908-europe-fact-sheet.pdf>

16. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Alemania, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/276-germany-fact-sheet.pdf>

17. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Reino Unido, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/826-united-kingdom-fact-sheet.pdf>

18. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Francia, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/250-france-metropolitan-fact-sheet.pdf>

19. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. España, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 2]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/724-spain-fact-sheet.pdf>

20. Reyes Zuñiga YI, Sanabria Negrín JG, Marrero Fernandez R. Incidencia y mortalidad por cáncer cérvicouterino. Rev. Ciencias Médicas. [Internet]. 2014 sep [citado jun 3 2022]; 18(5): [aprox. 13 p.]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v18n5/rpr05514.pdf>

21. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. América Latina y el Caribe, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 3]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/904-latin-america-and-the-caribbean-fact-sheet.pdf>

22. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Brasil, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 3]; [about 2 p.]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>

23. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Estados Unidos de América, Globocan 2020. Number of new cases in 2020,

both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 3]; [about 2 p.].

Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/840-united-states-of-america-fact-sheet.pdf>

24. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.

México, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages

[Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 3]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheet.pdf>

25. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.

Argentina, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all

ages [Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 3]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/32-argentina-fact-sheet.pdf>

26. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.

República Bolivariana de Venezuela, Globocan 2020. Number of new cases

in 2020, both sexes, all ages [Internet]. March, 2021 [citado 2022 jun 3];

[about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/862-venezuela-fact-sheet.pdf>

27. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.

Caribe, Globocan 2020. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages

[Internet]. March, 2021 [cited 2022 jun 3]; [about 2 p.]. Available from:

<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/915-caribbean-fact-sheet.pdf>

28. Anuario Estadístico de Salud 2016 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud y el Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2017 [citado 13 jul 2022]. Casos positivos de cáncer cérvico-uterino en mujeres examinadas por el programa según etapa clínica. 1990,1995–2016; [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: [http://files.sld.cu/dne/files/2017/05/Anuario Estadístico de Salud e 2016 edici3n 2017.pdf](http://files.sld.cu/dne/files/2017/05/Anuario_Estad%C3%ADstico_de_Salud_e_2016_edici%C3%B3n_2017.pdf)

29. Anuario Estadístico de Salud 2022 [Internet]. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud y el Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2023 [citado 7 oct 2023]. Mortalidad por tumores malignos en el sexo femenino según localización y grupo de edad. 2022; [aprox. 1 pantalla]. Disponible en:

<https://salud.msp.gob.cu/wp-content/Anuario/Anuario-2022.pdf>

30. Cuba. Ministerio de salud Pública. Dirección Provincial Salud de Camagüey, Dpto. Estadística de Salud, Registro provincial de Cáncer Camagüey (2024).

31. Rashmirani S, Nihar Nalini S, Bhagirathi D. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. Infectious Agents and Cancer [Internet]. 2016 nov [citado 2018 jan 17]; 11: [about 11 p.]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123406/pdf/13027\\_2016\\_Article\\_107.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123406/pdf/13027_2016_Article_107.pdf)

32. Averette EH, Nguyen H. Cáncer ginecológico. En: Murphy GP, Lawrence W, Lenhanrd RE. Oncología Clínica: Manual de la America Cancer Society. 2ª ed. Washington: OPS, Publicación Científica No. 559; 1996. P. 618 – 649.

33. Sánchez Ledesma, R, Fernández Martínez, L. C, Rodríguez-Gómez M R, Magahlaes-Puentes H A, y Gómez-Cabrera A E. Factores de riesgo del cáncer cérvico-uterino en San Juan y Martínez, 2020. Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río [Internet]. 2021 [citado 2022 nov 12]; 25(6): [aprox 10 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v25n6/1561-3194-rpr-25-06-e5287.pdf>

34. Evans MF, Zihua Peng KM, Christine SC, Adamson Xiao JM, Hngwei A, Yuling L, et al. HPV E6/E7 RNA In Situ Hybridization Signal Patterns as Biomarkers of Three-Tier Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade. PLOS ONE [Internet]. 2014 mar [cited 2017 oct 16]; 9 (3): [about 12 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953338/pdf/pone.0091142.pdf>

35. Pizarro Looor Y L, Choez Parismoreno T J, y Jurado Echeverria D P. Factores de riesgo que predisponen al cáncer cervicouterino en mujeres de 30 a 50 años. Más Vita [Internet]. 2023 [citado 2024 feb 12]; 5(2): [aprox 2 p.]. Disponible en:

<http://acvenisproh.com/revistas/index.php/masvita/article/view/559/1384>

36. Astudillo González OB, Flores Montesinos C, Espinoza Salamea MR. Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano. Panorama Médico [Internet]. 2014 jul [citado 2018 feb 12]; 8 (1): [aprox. 6 p.]. Disponible en:

[https://www.semanticscholar.org/paper/Diagn%C3%B3stico-molecular-del-virus-del-papiloma-humano-Gonz%C3%A1lez-](https://www.semanticscholar.org/paper/Diagn%C3%B3stico-molecular-del-virus-del-papiloma-humano-Gonz%C3%A1lez-Montesinos/64fc431337a83b685fda89017c4bdbf99b4262ec#citing-papers)

[Montesinos/64fc431337a83b685fda89017c4bdbf99b4262ec#citing-papers](https://www.semanticscholar.org/paper/Diagn%C3%B3stico-molecular-del-virus-del-papiloma-humano-Gonz%C3%A1lez-Montesinos/64fc431337a83b685fda89017c4bdbf99b4262ec#citing-papers)

37. Ghosh SK, B Choudhury B, Hansa J, Mondal R, Singh M, Duttagupta S, et al. Human Papillomavirus Testing for Suspected Cervical Cancer Patients from Southern Assam by Fast-PCR. Asian Pacific J Cancer Prev [Internet]. 2011 jan [cited 2018 mar 5 ]; 12: [about 3 p.]. Available from: [https://journal.waocp.org/article\\_25602\\_ee43b813ced3498d65af634a0fc47a0b.pdf](https://journal.waocp.org/article_25602_ee43b813ced3498d65af634a0fc47a0b.pdf)

38. Kim KH, Greenfield WW, Cannon MJ, Coleman HN, Spencer HJ, Nakagawa M. CD4+ TCell Response Against Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Is Associated with A Favorable Clinical Trend. Cancer Immunol Immunother [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Sep 10];61 (1):[about 8 p.]. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374341/pdf/nihms380403.pdf>

39. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008 [Internet]. Suecia: The Official Web site of the nobel prize; c-2016 [actualizado 2016 Abr 12; cited 2015 Sep 11]. Available from:

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2008/.](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/)

40. Nicole G. Campos, Philip E. Castle, Thomas C. Wright Jr, Jane J. Kim. Cervical Cancer Screening in Low-Resource Settings: A cost-Effectiveness Framework for Valuing Trade offs between Test Performance and Program Coverage. Int J Cancer [Internet]. 2015 nov [cited 2018 feb 6]; 137(9): [about

12 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4910518/pdf/nihms790431.pdf>

41. Zavala A M, Morales Pinargote M M, y Quimiz Lino M B. Virus del papiloma humano: una actualización al diagnóstico y la prevención. Dominio de las Ciencias [Internet]. 2022 [citado 2023 nov 15]; 8(2): [aprox 17 p.]. Disponible en:

<https://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/view/2652/6017>

42. Guevara Gómez H E. Prevalencia de neoplasias del cuello uterino y su asociación con factores de riesgo y citología anormal, Hospital Regional de Moquegua-2017 [Tesis en opción al título de Dra. en Salud Pública]. Lima Perú: Universidad Nacional Federico Villarreal; 2021.

43. Guamaní Carrillo T L. Resultados de técnicas citológicas y moleculares para el diagnóstico del Virus del Papiloma Humano [Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico]. Riobamba, Ecuador. Universidad Nacional de Chimborazo; 2022.

44. Núñez Ortega M, Díaz Calzada M, Jiménez Gala K, Zamora Nuñez G. Estudio clínico y morfológica de las lesiones cervicales de alto grado. Hospital General Docente Abel Santamaría Cuadrado, 2019-2021. Rev Ciencias Médicas [Internet]. 2022 [citado 2023 sep 14]; 26(4): [aprox 12 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v26n4/1561-3194-rpr-26-04-e5472.pdf>



45. Peña López B O, Martínez Vega R A, y Rincón Orozco, B. Estandarización de PCR en tiempo real para detección y cuantificación de los oncogenes E7 de seis Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo. Salud UIS [Internet]. 2023 [citado 2024 feb 15]; 55: [aprox 6 p.]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v55/2145-8464-suis-55-e66.pdf>
46. Duke P, Godwin M, Ratnam S, Dawson L, Fontaine D, Traverso-Yepey M, et, al. Effect of vaginal self-sampling on cervical cancer screening rates: a community-based study in Newfoundland. BMC Women's Health [Internet]. 2015 jun [cited 2018 jan 12]; 15: [about 9 p.]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461929/pdf/12905\\_2015\\_Article\\_206.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461929/pdf/12905_2015_Article_206.pdf)
47. Entrevista con Ralph Richart. Boletín informativo sobre el virus del papiloma humano. VPH Hoy, N. 2, pag 5, Marzo 2001
48. Pereira Leto MG, dos Santos Júnior GF, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. An Bras Dermatol [Internet]. 2011 jan [cited 2017 dic 14]; 86 (2): [about 12 p.]. Available from: [http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n2/en\\_v86n2a14.pdf](http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n2/en_v86n2a14.pdf)
49. Piña Napal JC, Crespo Campos G, Fando Calzado R, Casanova Corona G, Curbelo Toledo M, Guerra Rodríguez MM. Identificación molecular de genotipos papilomavirus humanos en pacientes con cáncer de cuello uterino. Arch Med Camagüey [Internet]. 2016 [citado 27 feb 2017]; 20 (3): [aprox. 11 p.]. Disponible en:

<http://www.revistaamc.sld.cu/index.php/amc/article/view/4324/2426>

50. Piña Napal J C, Crespo Campos G, Fando Calzado R, Valdés Silva Y, Molecular Identification of Human Papilloma Virus Genotypes in Patients With Cervical Cancer. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [Internet]. 2019 [citado 10 ene 2020]; 38(1): [aprox. 8 p.]. Disponible en:

<http://www.revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/149/pdf>

51. Piña Napal J C, Soto Brito Y, Tamayo Castro R, Crespo Campos G, Mederos Matos A, Ramírez Cardentey C. Genotipos del virus del papiloma humano en mujeres atendidas en consultas de patologías cervicouterinas en Camagüey. Rev Cubana Med Trop. [Internet]. 2024 [citado 12 abr 2024]; 76: [aprox. 25 p.]. Disponible en:

<https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/1130/678>

52. Hang Lee S, Vigliotti JS, Vigliotti VS, Jones W. From Human Papillomavirus (HPV) Detection to Cervical Cancer Prevention in Clinical Practice. Cancers [Internet]. 2014 oct [cited 2018 mar 5]; 6: [about 27 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276957/pdf/cancers-06-02072.pdf>

53. Pengming S, Yiyi S, Guanyu R, Xiaodan M, Yafang K, Binhua D, Fen L. Clinical validation of the PCR-reverse dot blot human papillomavirus genotyping test in cervical lesions from Chinese women in the Fujian province: a hospital-based population study. J Gynecol Oncol [Internet]. 2017

Sep [cited 2017 Oct 18]; 28(5) [about 14 p.]. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5540716/pdf/jgo-28-e50.pdf>

54. Castle PE, Lorincz AT, Mielzynska-Lohnas I, Scott DR, Glass AG, Sherman, ME, et al. Results of human papillomavirus DNA testing with hybrid capture 2 assay are reproducible. J. Clin. Microbiol [Internet]. 2002 [cited 2017 dic 24]; 40: [about 2 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120262/pdf/1017.pdf>

55. Sundstrom K, Lamin H, Dillner J. Validation of the cobas 6800 human papillomavirus test in primary cervical screening. PLOS ONE [Internet]. 2021 feb [cited 2022 Oct 18]; [about 8 p.]. Available from:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7894810/pdf/pone.0247291.p](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7894810/pdf/pone.0247291.pdf)

[df](#)

56. Bravo Crespo D I, Román Collazo C A. Métodos diagnósticos de VPH para la prevención del cáncer cérvico uterino en Ecuador. Revista de Salud, [Internet]. 2021 [citado 20 mar 2023]; 4(11): [aprox. 16 p.]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.bo/pdf/vrs/v4n11/2664-3243-vrs-4-11-176.pdf>

57. [Smith](#) MA, [Sherrah](#) M, [Sultana](#) F, [Castle](#) PE, [Arbyn](#) M, [Gertig](#) D, et al. National experience in the first two years of primary human papillomavirus (HPV) cervical screening in an HPV vaccinated population in Australia: observational study. BMJ [Internet]. 2022 mar. [cited 2022 Oct 18]; (376) [about 10 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8965648/>

58. Melo A, Montenegro S, Liempi S, Moreno S, de La Barra T, Guzmán P. Frecuencia de alteraciones citológicas cervicales y virus papiloma humano en una muestra de estudiantes universitarias en Temuco, Chile. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2019 mar [citado 2022 Oct 18]; 36(4) [aprox. 7 p.]. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v36n4/0716-1018-rci-36-04-0421.pdf>

59. Falcón-Córdova D, Carrero Y. Situación actual de la infección por virus del papiloma humano (VPH) asociado a lesiones cervicales en mujeres del ecuador. Revisión Sistemática. Kasma [Internet]. 2021 mar [citado 2022 Oct 18]; 49(1) [aprox. 13 p.]. Disponible en:

<https://produccioncientificaluz.org/index.php/kasma/article/view/33050/37740>

60. Chichao X, Sile L, Teng L, Ziguí C, Chan PK, Siaw SB. Current Updates on Cancer-Causing Types of Human Papillomaviruses (HPVs) in East, Southeast, and South Asia. Cancers [Internet]. 2021 mar [cited 2022 Oct 18]; (13) [about 33 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8198295/pdf/cancers-13-02691.pdf>

61. Gates A, Pillay J, Reynolds D, Stirling R, Traversy G, Korownyk C. Screening for the prevention and early detection of cervical cancer: protocol for systematic reviews to inform Canadian recommendations. BMC. [Internet]. 2021 jan [cited 2022 Oct 18]; 10(2) [about 22 p.]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7777363/pdf/13643\\_2020\\_Article\\_1538.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7777363/pdf/13643_2020_Article_1538.pdf)

62. Yanxia Z, Heling Bao, Lan Ma, Bo Song, Jiangli Di, Linhong Wang, et al. Real-world effectiveness of primary screening with high-risk human papillomavirus testing in the cervical cancer screening programme in China: a nationwide, population-based study. BMC Medicine [Internet]. 2021 jul [cited 2022 Oct 18]; [about 8 p.]. Available from:

<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12916-021-02026-0.pdf>

63. Rebolj M, Cuschieri K, Mathews CS. Pesola F, Denton Karin, Kitchener H, et al. Extension of cervical screening intervals with primary human papillomavirus testing: observational study of English screening pilot data. BCM [Internet]. 2022 may [cited 2022 Oct 18]; [about 8 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9153243/>

64. Chrysostomou AC, Stylianou DC, Constantinidou A, Kostriki LG. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. Viruses [Internet]. 2018 dic. [cited 2022 Oct 18]; 10 (729) [about 35 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315375/pdf/viruses-10-00729.pdf>

65. Paluku JL, Carter TE, Lee M, Bartels SA. Massive single visit cervical pre-cancer and cancer screening in eastern Democratic Republic of Congo. BMC Women's Health. [Internet]. 2019 mar [cited 2022 Oct 18]; 19(43) [about 8 p.]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6399865/pdf/12905\\_2019\\_Article\\_737.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6399865/pdf/12905_2019_Article_737.pdf)

66. Ríos Hernández MA, Hernández Menéndez M, Aguilar Vela de Oro FO, Silveira Pablos M. Tipos de papilomavirus humanos más frecuentes en muestras cubanas de cáncer cervical Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2010 [citado 9 oct 2015]; 36(2) [aprox. 8 p.], Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v36n2/gin09210.pdf>

67. Soto Brito Y, Muné M, Goicolea A, Morales E, Santoyo JM, Valdés O, et al. Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 1998 [citado 11 jun 2015]; 50(3): [aprox.9p.].Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v50n3/mtr04398.pdf>

68. Soto Brito Y, Kourí Cardella V, Martínez Rodríguez P.A, Correa Sierra C. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación de papilomavirus humano de alto riesgo oncogénico. VacciMonitor [Internet]. 2012 [citado 12 oct 2015]; 21(1): [aprox.7p.]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v21n1/vac07112.pdf>

69. Soto Brito Y, Limia León CM, Kourí Cardellá V, Goicolea Maiza A , Capó de Paz V, Muné Jiménez M. Papilomavirus humanos y otros factores asociados al desarrollo de lesiones cervicouterinas en mujeres cubanas Panorama Cuba y Salud. [Internet]. 2016 [citado 12 oct 2019]; 11(1): [aprox.10 p.]. Disponible en:

<http://www.revpanorama.sld.cu/index.php/panorama/article/download/535/pdf>

21

70. Soto Brito Y, Sánchez Domínguez Y, Ortega León D, Kourí Cardellá V, Palenzuela Díaz A, Rodríguez Lay LA. Evaluación de estuches de PCR-tiempo real para detección de virus del papiloma humano de alto riesgo. Rev Cubana Med Trop. [Internet]. 2022 [citado 12 ene 2023]; 74(1): [aprox. 26p.]. Disponible en:

<http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/download/752/561>

71. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. John Rev. Med. Virol [Internet]. 2016 jan [cited 2018 jan 17]; 25: [about 22 p.]. Available from:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.1822/pdf>

72. Santaclara Maneiro V. Factores genéticos pronósticos y de susceptibilidad en el cáncer de cuello de útero. [Tesis en opción al título de Dr. en Ciencias de la Salud]. Murcia, España: Universidad Católica de Murcia; 2022.

73. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. Journal of Oncology [Internet]. 2019 may [cited 2023 feb 4]; [about 11 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6811952/pdf/JO2019-3257939.pdf>

74. Padilla Mendoza J R. Identificación de proteínas con cambios en la fosforilación de residuos de serina en la progresión del cáncer cérvico-uterino por infección con VPH. [Tesis en opción al título de Dr. en Ciencias]. Ciudad de México, México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2022.

75. Macías Macías O J. Virus de papiloma humano y cáncer cervicouterino en mujeres que acuden al hospital oncológico de Solca de la ciudad de Portoviejo. [Tesis en opción al título de licenciada en laboratorio clínico]. Manabí-Ecuador: Facultad de ciencias de la salud, Universidad Estatal del Sur de Manabí, 2022.

76. Magaña Reyes J, López Vera Y, Negrete Ruiz J, Portillo Esquivel A, Picazo Carranza A R, Tripp Gudiño J J. Incidencia de Lesiones Cervicales de Alto y Bajo Grado Ocasionadas por el Virus del Papiloma Humano. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* [Internet]. 2024 [citado 12 abr 2024]; 8(1): [aprox. 14 p.]. Disponible en:

<https://scielo.isciii.es/pdf/jonnpr/v6n2/2529-850X-jonnpr-6-02-283.pdf>

77. Prado-Peláez J G, Hernández Pacheco I, Ruvalcaba Ledezma J C, Ceruelos Hernández M D C A. VPH: Generalidades, prevención y vacunación. *Journal of Negative and No Positive Results*. [Internet]. 2021 [citado 23 ene 2023]; 6(2) ): [aprox. 9p.]. Disponible en:

<https://scielo.isciii.es/pdf/jonnpr/v6n2/2529-850X-jonnpr-6-02-283.pdf>



78. Bhattacharjee R, Sachi Das S, Sudha Biswal S, Das D, Basu A, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer:

Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* [Internet]. 2022 mar [cited 2022 dic 4]; 174: [about 17 p.]. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842822000993>

79. Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer* [Internet]. 2011 nov [citado 2017 oct 16]; 10: [about 62 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248866/pdf/1476-4598-10-140.pdf>

80. Olvera Vazquez M. Participación de la oncoproteína E5 de VPH16 en el splicing alternativo de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima [Tesis en opción al título de Master en Ciencias]. Ciudad de México, México: Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2021

81. Núñez Troconis J. Papel del virus del papiloma humano en el desarrollo del cáncer del cuello uterino. *Investigación Clínica* [Internet]. 2023 [citado 2024 ene 15]; 64(2): [aprox 11 p.]. Disponible en:

<http://ve.scielo.org/pdf/ic/v64n2/2477-9393-ic-64-02-233.pdf>

82. Sen S, Mandal P, Bhattacharya A, Kundu S, Chowdhury RR, Mondal NR, et al. Impact of viral and host DNA methylations on HPV16-related cervical

cáncer Pathogenesis. Tumor Biology [Internet]. 2017 may [cited 2017 nov 17]; 38 (1): [about 13 p.]. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1010428317699799>

83. Xie J, Zhang P, Crite M, DiMaio D. Papillomaviruses Go Retro. Pathogens [Internet]. 2020 april [cited 2022 nov 17]; 9 (267): [about 11 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7238053/pdf/pathogens-09-00267.pdf>

84. Tocto Merchán D S, Salazar Martínez C D, Pérez Landázuri T R, Vizueta Bustamante M C. Algunas consideraciones relacionadas con las infecciones por el virus papiloma humano. RECIAMUC [Internet]. 2022 [citado 2023 ene 12]; 6(3): [aprox 10 p.]. Disponible en:

<https://www.reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/944/1365>

85. Núñez Troconis J. Epidemiología del virus del papiloma humano. Investigación Clínica [Internet]. 2022 [citado 2023 feb 14]; 63(2): [aprox 14 p.]. Disponible en:

<http://ve.scielo.org/pdf/ic/v63n2/0535-5133-ic-63-02-170.pdf>

86. Gupta SM, Mania-Pramanik J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogénesis. Journal of Biomedical Science [Internet]. 2019 april [cited 2022 nov 17]; 26 (28): [about 19 p.]. Available from:

<https://jbiomedsci.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12929-019-0520-2.pdf>

87. Sánchez Bouza M D J, Sánchez Frenes P, Ayala Reina, Z E, Sánchez Sánchez P J, Santos Solís M. Una mirada al cáncer desde la perspectiva molecular. Revista Finlay [Internet]. 2022 [citado 2023 jun 22]; 12(2): [aprox 12 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/rf/v12n2/2221-2434-rf-12-02-208.pdf>

88. Riethdorf S. Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. Virchows Arch [Internet]. 2000 [cited 2022 nov 17]; 447: [about 9 p.]. Available from:

[https://www.researchgate.net/profile/Karin-Milde-Langosch/publication/12182521\\_Riethdorf\\_S\\_Riethdorf\\_L\\_Milde-Langosch\\_K\\_Park\\_TW\\_Loning\\_TDifferences\\_in\\_HPV\\_16-\\_and\\_HPV\\_18\\_E6E7\\_oncogene\\_expression\\_between\\_in\\_situ\\_and\\_invasive\\_adenocarcinomas\\_of\\_the\\_cervix\\_uteri\\_Virchows\\_Arch\\_437\\_4/links/00b7d5344ee99d5f74000000/Riethdorf-S-Riethdorf-L-Milde-Langosch-K-Park-TW-Loning-TDifferences-in-HPV-16-and-HPV-18-E6-E7-oncogene-expression-between-in-situ-and-invasive-adenocarcinomas-of-the-cervix-uteri-Virchows-Arch.pdf?\\_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19](https://www.researchgate.net/profile/Karin-Milde-Langosch/publication/12182521_Riethdorf_S_Riethdorf_L_Milde-Langosch_K_Park_TW_Loning_TDifferences_in_HPV_16-_and_HPV_18_E6E7_oncogene_expression_between_in_situ_and_invasive_adenocarcinomas_of_the_cervix_uteri_Virchows_Arch_437_4/links/00b7d5344ee99d5f74000000/Riethdorf-S-Riethdorf-L-Milde-Langosch-K-Park-TW-Loning-TDifferences-in-HPV-16-and-HPV-18-E6-E7-oncogene-expression-between-in-situ-and-invasive-adenocarcinomas-of-the-cervix-uteri-Virchows-Arch.pdf?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19)

89. Naranjo Hernández L, Villafuerte Reinante J, Rodríguez Márquez, Alonso Vila Y. Condiciones que favorecen el desarrollo del cáncer cervicouterino en la adolescencia. Revista Finlay [Internet]. 2023 [citado 2023 abr 12]; 13(2): [aprox 16 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/rf/v13n2/2221-2434-rf-13-02-209.pdf>

90. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *Journal of General Virology* [Internet]. 2021 jan [cited 2022 nov 17]; 102: [about 28 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8148304/pdf/jgv-102-1540.pdf>

91. Pappa K, Lygirou V, Kontostathi G, Zoidakis J, Makridakis M, Vougas K, et al. Proteomic Analysis of Normal and Cancer Cervical Cell Lines Reveals Deregulation of Cytoskeleton-associated Proteins. *Cancer Genomic & Proteomics* [Internet]. 2017 jun [citado 2017 dic 20]; 14 (1): [about 14 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572303/pdf/cgp-14-253.pdf>

92. Hassan s, Soliman A, Orlicchio A, Verginelli F. Viral Manipulation of the Host Epigenome as a Driver of Virus-Induced Oncogenesis. *Microorganisms* 2021 [Internet]. 2021 may [cited 2022 dic 20]; 9: [about 40 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8227491/pdf/microorganisms-09-01179.pdf>

93. Warowicka A, Broniarczyk J, Weglewska M, Kwaśniewski W, Goździcka-Józefiak A. Dual Role of YY1 in HPV Life Cycle and Cervical Cancer Development. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2022 mar [cited 2022 nov 17]; 23: [about 19 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8998550/pdf/ijms-23-03453.pdf>

94. Die H, Jia L, Ying H, Xiaonan L, Baohua L, Yang L, et al. Viral E6 is overexpressed via high viral load in invasive cervical cancer with episomal HPV16. BMC Cancer [Internet]. 2017 feb [citado 2017 nov 17]; 17: [about 8 p.]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5311840/pdf/12885\\_2017\\_Article\\_3124.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5311840/pdf/12885_2017_Article_3124.pdf)

95. Cáncer. En: Bruce Alberts. Biología molecular de la célula. 5ª ed. Barcelona: ediciones Omega; 2010. p. 1205-68.

96. Sánchez Ramos J. Estudio del efecto de E2 de VPH16 sobre la expresión de genes responsivos a daño al DNA y su participación en la regulación del ciclo celular. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias]. Ciudad de México, México: Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2022

97. Zimmermann H, degenkolbe R, ulrich bernard H, o'connor MJ. The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Can Down-Regulate p53 Activity by Targeting the Transcriptional Coactivator CBP/p300. J. VIROL. [Internet]. 1999 feb [cited 2017 nov 17]; 73 (8): [about 11 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112697/>

98. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein: Induction of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression through Myc and GC-Rich Sp1 Binding Sites. J. VIROL. [Internet]. 2001 jun [cited 2017 nov 17]; 75 (12): [about 8 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC114268/>

99. Jiménez Ángel R. Análisis del proteoma de la mitocondria en líneas celulares de Cáncer Cervicouterino. [Tesis en opción al título de Biólogo]. Cuernavaca, Morelo, México: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autonoma del Estado de Morelo; 2023

100. Lowrey AJ, Cramblet W, Bentz GL. Viral manipulation of the celular sumoylation machinery. Cell Communication and Signaling [Internet]. 2017 jan [cited 2019 oct 10]; 38 (1): [about 4 p.]. Available from:

<https://biosignaling.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12964-017-0183-0>

101. Fan Y, Li X, Zhang L, Zong Z, Wang F, Huang J, et, al. SUMOylation in Viral Replication and Antiviral Defense. Adv. Sci [Internet]. 2022 jan [cited 2023 april 10]; 9: [about 14 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8895153/>

102. Kukkula A, Ojala VK, Mendez LM, Sistonen L, Elenius K, Sundvall M. Therapeutic Potential of Targeting the SUMO Pathway in Cancer. Cancers [Internet]. 2021 aug [cited 2023 april 10]; 13: [about 32 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8431684/>

103. Sabatini ME, Compagnoni M, Maffini F, Miccolo C, Pagni F, Lombardi M, et al. The UBC9/SUMO pathway affects E-cadherin cleavage in HPV-positive head and neck cancer Mol. Biosci. Cancers [Internet]. 2022 aug [cited 2023 april 10]; 9: [about 9 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9411811/pdf/fmolb-09-940449.pdf>

104. Zhi-JIAN H, YAN-hU F, BAO-hONG G, YU-MIN L, HAO C. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer. *Inter. Jour Onc* [Internet]. 2018 aug [cited 2023 april 10]; 52: [about 14 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5843405/pdf/ijo-52-04-1081.pdf>

105. Mounira K. Chelbi-Alix and Pierre Thibault. Crosstalk Between SUMO and Ubiquitin-Like Proteins: Implication for Antiviral Defense. *Front. Cell Dev. Biol.* [Internet]. 2021 april [cited 2023 april 10]; 9: [about 19 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8097047/pdf/fcell-09-671067.pdf>

106. Christopher Brackett, Brian S. J. Blagg. Current Status of SUMOylation Inhibitors. *Curr Med Chem.* [Internet]. 2021 jan [cited 2023 april 10]; 28(20): [about 33 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8483067/pdf/nihms-1700327.pdf>

107. Zhike C, Jian Y, Lijuan T, Xue S, Yu L, Ziqing S, et al. SUMOylation patterns and signature characterize the tumor microenvironment and predict prognosis in lung adenocarcinoma. *Front. Cell Dev. Biol.* [Internet]. 2023 apr [cited 2023 may 18]; 11: [about 19 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10133499/pdf/fcell-11-1094588.pdf>

108. Imbert F, Dianne Langford D. Viruses, SUMO, and immunity: the interplay between viruses and the host SUMOylation system. *Journal of NeuroVirology* [Internet]. 2021 aug [cited 2022 oct 10]; 27: [about 11 p.].

Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8330205/>

109. Leny L, Gilson T, Androphy EJ, De Smet M. Regulation of the Human Papillomavirus Lifecycle through Post-Translational Modifications of the Viral E2 Protein. *Pathogens* [Internet]. 2021 jun [cited 2022 oct 10]; 10(93): [about 11 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8308518/>

110. Basukala O, Banks L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. *Viruses* [Internet]. 2021 sep [cited 2022 nov 17]; 13 (10): [about 36 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8541208/pdf/viruses-13-01892.pdf>

111. Fan Y, Li X, Zhang L, Zong Z, Wang F, Huang J, Zeng L, Zhang C, Yan H, Zhang L, Zhou F. SUMOylation in Viral Replication and Antiviral Defense. *Adv Sci.* [Internet]. 2022 Mar; [cited 2023 sep 16]; 9(7): [about 14 p.].

Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8895153/pdf/ADVS-9-2104126.pdf>



112. Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, González P, Ferrera A, Picconi MA, et, al. Multicentric study of cervical cáncer screening with human papillomavirus testing and assessment of triage methods in Latin America: the ESTAMPA screening study protocol. *BMJ Open* [Internet]. 2020 april [cited 2022 oct 10]; 10 (6): [about 14 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7252979/pdf/bmjopen-2019-035796.pdf>

113. Luviano Jaimes H. H. Efecto de la expresión de la oncoproteína E6 de las variantes AA-a, E-G350 y E-A176/G350 del VPH-16 en la metilación de genes relacionados con adhesión, migración e invasión celular. [Tesis en opción al título de Master en Ciencias Biomédicas]. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México: Universidad Autónoma de Guerrero; (2021).

114. Xia YF , Pei GH, Wang YK. miR-3156-3p is downregulated in HPV positive cervical cancer and performs as a tumor-suppressive miRNA. *virology Journal* [Internet]. 2017 feb [citado 2019 oct 10]; 14 (20): [about 13 p.]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291972/pdf/12985\\_2017\\_Article\\_695.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291972/pdf/12985_2017_Article_695.pdf)

115. Hernández A, Marina A. Análisis del efecto del resveratrol como quimiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de la vía de reparación NHEJ. [Tesis en opción al título de Master en Ciencias]. Ciudad de México, México: Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2023

116. Shishkin S, Eremina L, Pashintseva N, Kovalev L, Kovaleva M. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2017 [cited 2019 oct 10]; 18 (10): [about 27 p.].

Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297645/pdf/ijms-18-00010.pdf>

117. Bamburg JR, Minamide LS, Wiggan ON, Lubna H. Tahtamouni LH, Kuhn TB. Cofilin and Actin Dynamics: Multiple Modes of Regulation and Their Impacts in Neuronal Development and Degeneration. *Cells* [Internet]. 2021 [cited 2022 oct 10]; 10: [about 46 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8534876/pdf/cells-10-02726.pdf>

118. Hocky G M, Sindelar C V, Cao W, Voth G A, De La Cruz E M. Structural Basis of Fast- and Slow-Severing Actin-Cofilactin Boundaries. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2021 [cited 2022 oct 10]; 296: [about 12 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33508320>

119. Purde V, Busch F, Kudryashova E, Wysocki V H, Kudryashov D S. Oligomerization Affects the Ability of Human Cyclase Associated Proteins 1 and 2 to Promote Actin Severing by Cofilins. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2019 [cited 2022 oct 10]; 20: [about 17 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31718088>

120. Tanaka, K.; Takeda, S.; Mitsuoka, K.; Oda, T.; Kimura-Sakiyama, C.; Maéda, Y.; Narita, A. Structural basis for cofilin binding and actin filament

disassembly. Nat. Commun. [Internet]. 2018 [cited 2022 oct 10]; 9: [about 6 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749375>

121. Kruyer, A.; Ball, L.E.; Townsend, D.M.; Kalivas, P.W.; Uys, J.D. Post-Translational S-Glutathionylation of Cofilin Increases Actin Cycling during Cocaine Seeking. PLoS ONE [Internet]. 2019 [cited 2022 oct 10]; 14: [about 16 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31550273>

122. Lopez Yubero M P. Estudio del papel del citoesqueleto en las propiedades físicas y mecánicas de células cancerosas. [Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias]. Asturias, España: Universidad de Oviedo; 2023

123. Cabezas Cruz E. Lesiones malignas del útero. En: Rigol Ricardo O. Obstetricia y ginecología. La Habana: Ecimed; 2004. p.297-312.

124. Promega Corporation [Internet]. Madison: Promega; 2013 [update 2016 april 12; cited 2018 Jan 15]. Wizard SV Genomic DNA Purification System (Technical Bulletin) 2009; [about 16 p.]. Available from: <http://www.promega.com/%7E/media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20genomic%20dna%20purification%20system%20protocol.pdf?la=en>

125. Allprep DNA/RNA Micro HandBook [Internet]. Alemania: QIAGEN; 2020 [cited 2022 Oct 9]. Available from:

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/buffers-reagents/>

126. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi T, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. J Clin Microbiol [Internet]. 2000 Jan [cited 2015 Oct 9];38(1):[about 4 p.]. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88724/pdf/jm000357.pdf>

127. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [update 2022 Dic 08; cited 2023 Jun 1]. Nucleotide: NCBI; Genbank; [about 1 screens]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

128. Jacobs MV, Roda Husman AM de, Brule AJ van der. Group-specific Differentiation between high and low risk human Papillomavirus genotypes by general primer mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. J Clin Microbiol [Internet]. 1995 jun [cited 2015 oct 10]; 3 (4): [about 5 p.]. (1995; 3(4):901-5.) Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228064/pdf/330901.pdf>

129. Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System [Internet]. EEUU: Promega; 2019 [cited 2022 may 7]. Available from:

[https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system-protocol.pdf?rev=39cbdfc6eec849db9f6dd9915d714930&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system-protocol.pdf?rev=39cbdfc6eec849db9f6dd9915d714930&sc_lang=en)

130. Macrogen [Internet]. Korea del Sur; [updated 2022 april16; cited 2023 may 4]. Available from: <http://dna.macrogen.com/>

131. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Bethesda MD: NCBI; [update 2023 apr 28; cited 2022 feb 7]. BLAST; [about 1 screens]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

132. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med.* [Internet]. 2015 feb [cited 2022 april 10]; 372(8): [about 12 p.]. Available from:

[https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1405044?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1405044?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20www.ncbi.nlm.nih.gov)

133. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol.* [Internet]. 2009 jan [cited 2016 april 10]; 44 (4): [about 5 p.]. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653209000389?via%3Dihub>

134. Prasongdee P, Tippayawat P, Limpaboon T, Leelayuwat C, Wongwattanakul M, Jearanaikoon P. The development of simultaneous measurement of viral load and physical status for human papillomavirus 16 and 18 co-infection using multiplex quantitative polymerase chain reaction. *Oncol Lett.* [Internet]. 2018 [cited 2022 oct 9]; 16(6): [about 10 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6256370/pdf/ol-16-06-6977.pdf>

135. Bordigoni A, Motte A, Dupont HT, Colson P, Desnues C. Development and validation of multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. Scientific Report [Internet]. 2021 [cited 2022 oct 10]; 11: [about 10 p.]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7889863/pdf/41598\\_2021\\_Article\\_83489.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7889863/pdf/41598_2021_Article_83489.pdf)

136. Mesa Arango JA, Tapia Vela L J, Loaiza Díaz N, et al. Detección y genotipificación del virus del papiloma humano de alto riesgo mediante PCR multiplex en tiempo real (RT-PCR VPH AR). Medicina y Laboratorio [Internet]. 2021; [citado 2023 oct 10]; 25(2): [aprox 3 p.]. Disponible en:

<https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2021/myl212h.pdf>

137. Williams J, Kostiuk M, Biron V L. Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers. Front Oncol. [Internet]. 2022 Apr [cited 2023 nov 11]; 12: [about 16 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9092940/pdf/fonc-12-864820.pdf>

138. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. Virology [Internet]. 2013 oct [cited 2022 nov 10]; 445 (0): [about 24 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979972/pdf/nihms508824.pdf>

f

139. Asamblea Médica General. Declaración del Helsinki de la Asociación Médica Mundial. [Internet]. 2008 [cited 2015 febrero 12. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3007220.pdf>
140. Beining RM, Leslie KD, Smith EM, Dokras A. A meta-analysis of intrauterine device use and risk of endometrial cancer. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2008 [cited 2022 oct 10]; 18: [about 7 p.]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1047279707004905?via%3Dihub>
141. Cortessis VK, Barrett M, Brown Wade N, Enebish T, Perrigo JL, Tobin J. Intrauterine device use and cervical cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 [cited 2022 oct 10]; 130: [about 10 p.]. Available from: <https://www.bonasavoir.ch/fileadmin/content/bas/files/cancerP5.pdf>
142. Skorstengaard M, Lynge E, Napolitano G, Blaakær J, Bor P. Risk of precancerous cervical lesions in women using a hormone-containing intrauterine device and other contraceptives: a register-based cohort study from Denmark. *Hum Reprod.* [Internet]. 2021 Jun [cited 2023 nov 12]; 36(7): [about 11 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8213448/pdf/deab066.pdf>
143. Castellsagué X, Díaz M, Vaccarella S, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, et al. Intrauterine device use, cervical information and risk of cervical cancer: a pooled analysis of 26 epidemiological studies. *Lancet Oncol* [Internet]. 2011 [cited 2022 oct 10]; 12: [about 8 p.]. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470204511702236>

144. Ajah LO, Chigbu CO, Ozumba BC, Oguanuo TC, Ezeonu PO. Association of Intrauterine Device (IUD) and Cervical Neoplasia study in poor Nigerian population. J Clin Diagn Res [Internet]. 2016 april [cited 2022 oct 10]; 10 (6): [about 14 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963718/pdf/jcdr-10-QC05.pdf>

145. Skorstengaard M, Lynge E, Napolitano G, Blaakær J, Bor P. Risk of precancerous cervical lesions in women using a hormone-containing intrauterine device and other contraceptives: a register-based cohort study from Denmark. [Internet]. 2021 may [cited 2022 oct 10]; 36(7): [about 12 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8213448/pdf/deab066.pdf>

146. Spotnitz ME, Natarajan K, Ryan PB, Westhoff CL. Relative Risk of Cervical Neoplasms Among Copper and Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System Users. Obstet Gynecol [Internet]. 2020 feb [cited 2022 oct 10]; 135(2): [about 9 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7012337/pdf/ong-135-319.pdf>

147. Martínez E D O, Parra X R S, Ocampo K T D, Andrade P C M, Mendoza C A B, Sierra S C B. Realidades de los factores anticoncepcionales como protectores contra el desarrollo de cáncer cervicouterino por VPH. Scientific and Educational Medical Journal [Internet]. 2022 [citado 2023 abr 8]; 6(1): [aprox 12 p.]. Disponible en:



<https://medicaljournal.com.co/index.php/mj/article/view/108/205>

148. Aguilar Camacho B G. Cancer de cuello uterino: Factores epidemiológicos asociados [Tesis en opción al título de Especialista en Obstetricia y Ginecología]. Caracas, Venezuela: Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela; 2022.

149. Sangay Chuquiruna L W. Determinantes que se relacionan con el rechazo del dispositivo intrauterino. Centro de Salud Magna Vallejo. Cajamarca 2021. [Tesis en opción al título de Especialista en Obstetricia]. Cajamarca, Perú: Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Cajamarca; 2022.

150. Abrahantes AA, Oliver M, González MM, Rodríguez K, Muñoz ON, Castro A. Cáncer cérvicouterino. Algo para reflexionar Cervical cancer. A call for reflection. Medisur [Internet]. 2019 dic [citado 2022 oct 10]; 17 (6): [aprox 10 p.]. Disponible en:

<http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4446>

151. Domínguez S, Trujillo T, Aguilar K, Hernández M. Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2018 [ citado 27 Jun 2019 ]; 44 (1): [aprox. 9 p]. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2018000100017&lng=es.\)](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2018000100017&lng=es.)

152. Sánchez Mercado SI. Determinantes que se relacionan con el rechazo del dispositivo intrauterino. Centro de salud magna vallejo. Cajamarca. [Tesis en opción al título de Profesional de: Obstetra]. Cajamarca, Perú: Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Cajamarca; 2021.

153. Tesfaye E, Kumbi B, Mandefro B, Belayihun M, Hemba Y, Kant Prajapati K, Chandra Singh S, Prevalence of human papillomavirus infection and associated factors among women attending cervical cancer screening in setting of Addis Ababa, Ethiopia. Sci Rep [Internet]. 2024 [cited 2024 abr 18]; 14: [about 12 p.]. Available from:

<https://www.nature.com/articles/s41598-024-54754-x.pdf>

154. Medina G, Carbajales EB. Citologías alteradas en mujeres pertenecientes a un grupo básico de trabajo de Camagüey. Rev Inf Cient [Internet]. 2021 [citado 2022 oct]; 100(6): [aprox 10 p.]. Disponible en:

<http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/3559>

155. Montesino JC, Arronte ME, Matos A, Áreas DE, Fernández A. Comportamiento de factores de riesgo en pacientes con citologías anormales en el estado Miranda, Venezuela. Rev Cubana Obst Gin [Internet]. 2017 [citado 16 May 2021]; 43(1):[aprox. 7p.]. Disponible en:

<https://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/229/377>

156. Pérez Sanjuán P, Rosales Luis Y, Fernández Peña I, Sánchez Pérez E. Comportamiento de los factores de riesgo asociados al cáncer de cuello uterino en el Policlínico Alex Urquiola Marrero, Holguín, Cuba. CCM [Internet]. 2019 [Citado 10 jun 2022]; 23(4): [Aprox. 9 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v23n4/1560-4381-ccm-23-04-1242.pdf>

157. Rivas Moreno P V. Transmisión y prevención del virus de Papiloma Humano en niños y adolescentes. [Tesis en opción al título de Doctora en Medicina]. San Miguel, El Salvador: Facultad Multidisciplinaria Oriental Departamento de Medicina, Universidad de el Salvador; 2023

158. Cabellos A, Correa M, Rivera F, Marshall M, Cabrera K, Vargas, F, Aguayo M. Prevalencia de infección por Chlamydia trachomatis y relación con el perfil de conductas sexuales en adolescentes y mujeres jóvenes de la Provincia de Osorno, Chile. Revista chilena de infectología [Internet]. 2023 [citado 2024 ene 6]; 40(1): [aprox 6 p.]. Disponible en:

<https://www.scielo.cl/pdf/rci/v40n1/0716-1018-rci-40-01-0015.pdf>

159. Villagra Carrón V, Bobadilla M L, Olmedo G B, Pratt Santacruz P, Ortiz R V, Lopez Ibarra G, Kawabata A. Distribución de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico y otras infecciones de transmisión sexual en mujeres paraguayas con y sin virus de la inmunodeficiencia humana. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud [Internet]. 2022 [citado 2023 ene 12]; 20(3): [aprox 8 p.]. Disponible en:

<http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v20n3/1812-9528-iics-20-03-134.pdf>

160. Sanz-Lorente, M. Las enfermedades de transmisión sexual en el siglo XXI. Hospital a Domicilio [Internet]. 2023 [citado 2024 ene 6]; 7(2): [aprox 6 p.]. Disponible en:

<https://scielo.isciii.es/pdf/had/v7n2/2530-5115-had-7-02-91.pdf>

161. Vidal Torres D. Asociación del desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales con la presencia de coinfecciones del VPH y otros patógenos asociados a infecciones vaginales [Tesis en opción al título de Especialista en Ginecología y Obstetricia]. Nuevo León, México: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2022.

162. González González I. Prevalencia de la asociación de la infección de *Ureaplasma spp.* con el Virus del Papiloma Humano en pacientes de la consulta de colposcopia del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González [Tesis en opción al título de Especialista en Ginecología y Obstetricia]. Nuevo León, México: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2023.

163. Sánchez Ledesma L, Fernández Martínez L, Rodríguez-Gómez MR, Magahlaes Puentes HA, Gómez Cabrera A. Factores de riesgo del cáncer cérvico-uterino en San Juan y Martínez, 2020. *Rev Ciencias Médicas* [Internet]. 2021 [citado 10 jun 2022]; 25(6):[aprox. 10 p.]. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpr/v25n6/1561-3194-rpr-25-06-e5287.pdf>

164. Alonso Triana L, Hernández Hernández JR, Ugalde Pérez M, Reyes Tápanes M, et al. Factores de riesgo del cáncer cérvico uterino en adolescentes de la Universidad de Ciencias Médicas de Matanzas. *Rev.Med.Electrón.* [Internet]. 2021 Feb [Citado 10 jun 2022]; 43(1): 2784-2794. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rme/v43n1/1684-1824-rme-43-01-2784.pdf>

165. Pérez R, Cordero Y, del Río T. Mujeres fumadoras y su asociación con atipia del cérvix uterino en Las Tunas, Cuba. Revista Médica Sinergia [Internet]. 2019 jul [citado 2022 oct 10]; 4 (7): [aprox 14 p.]. Disponible en:

<https://doi.org/10.31434/rms.v4i7.258>

166. Heredia Ruiz D, Herrera Martínez M, Fernández Caraballo D, López Ocampo LG. Asociación entre polimorfismos de Glutation s-transferasa y cáncer cérvico uterino. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2017 [citado 2022 nov 12]; 43(3): [aprox 9 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v43n3/gin17317.pdf>

167. Rojas Cisneros N, Ruíz Saucedo R. Consumo de tabaco y neoplasia intraepitelial cervical. Rev. Fac. Med. Hum. [Internet]. 2021 [citado 2022 oct 14]; 21 (1): [aprox 11 p.]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rfmh/v21n1/2308-0531-rfmh-21-01-157.pdf>

168. Bravo Polanco E, Águila Rodríguez N, GuerraVillarpanda D, Blanco Vázquez Y, Rodríguez González O, Oliva Santana M. Cáncer cérvico uterino: prevención y tratamiento. Medisur [Internet]. 2020 [citado 2022 sep 18]; 18 (4): [aprox 8 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/ms/v18n4/1727-897X-ms-18-04-685.pdf>

169. Ortega Flores J M, Sáenz Nieto J C, Posada Macías F, Velarde Loya M. Prevalencia de genotipos de VPH de alto riesgo detectado mediante PCR en mujeres del estado de Chihuahua. Acta médica Grupo Ángeles [Internet]. 2022 [citado 2023 jun 9]; 20 (3): [aprox 7 p.]. Disponible en:

<https://www.scielo.org.mx/pdf/amga/v20n3/1870-7203-amga-20-03-227.pdf>

170. Quintana Milla J M. Factores de riesgo no asociados al virus del papiloma humano en el desarrollo del cancer de cuello uterino en pacientes atendidas en el hospital Carlos Lanfranco La Hoz durante el 2019. [Tesis en opción al título de Profesional de Médico Cirujano]. Lima, Perú: Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Privada San Juan Bautista; 2021.

171. Flores A. Conocimientos y riesgos sobre el VPH y su relación con el cáncer cervicouterino en mujeres entre 20 y 59 años de edad. RIDE [Internet]. 2022 [citado 2023 oct 14]; 12 (24): [aprox 26 p.]. Disponible en: <https://cathi.uacj.mx/bitstream/handle/20.500.11961/22185/articulo%20ride.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

172. Prasada Kabekkodu S, Chakrabarty S, Ghosh S, Brand A, Satyamoorthy K. Epigenomics, Pharmacoepigenomics, and Personalized Medicine in Cervical Cancer Public Health Genomics [Internet]. 2017 april [cited 2022 nov 12]; 20: [about 15 p. ]. Available from: [https://www.academia.edu/52245257/Epigenomics\\_Pharmacoepigenomics\\_and\\_Personalized\\_Medicine\\_in\\_Cervical\\_Cancer?hb-sb-sw=51697046](https://www.academia.edu/52245257/Epigenomics_Pharmacoepigenomics_and_Personalized_Medicine_in_Cervical_Cancer?hb-sb-sw=51697046)

173. Chelsey C, Spriggs C, Laimins LA. Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. Viruses [Internet]. 2017 [citado 2022 nov 12]; 9 (232): [about 14 p.]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/72c2/49082c4653c79f693633a672d4b4028e10e5.pdf>

174. Fonseca Moutinho J A. Smoking and Cervical Cancer. ISRN Obstetrics and Gynecology [Internet]. 2011 may [cited 2022 nov 12]; 10: [about 6 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3140050/pdf/OBGYN2011-847684.pdf>

175. Trujillo Perdomo TC, Domínguez Bauta SR, Ríos Hernández MA, Hernández Menéndez M. Prevalencia del virus del papiloma humano en mujeres con citología negativa. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2017 [citado 2022 nov 12]; 43(1): [aprox 13 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v43n1/gin17117.pdf>

176. Domínguez Bauta SR, Trujillo Perdomo T, Aguilar Fabrè K, Hernández Menéndez M. Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2018 [citado 2022 nov 12]; 44(1): [aprox 13 p.]. Disponible en:

<http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v44n1/gin17118.pdf>

177. Caputo G, Simón C, Alonso G, Puche M S, Campagna C, Sansone F, Porcel M. Epidemiología y frecuencia de enfermedades de transmisión sexual y su repercusión en la mucosa bucal. Una revisión narrativa. Rev Asoc Odontol Argent [Internet]. 2022 [citado 2023 sep 6]; 110 (1): [aprox 7 p.]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.ar/pdf/raoa/v110n1/2683-7226-raoa-110-1-48.pdf>

178. Romero P, Ramírez E, Muñoz M, Muñoz P, González C, Orellana C, Reyes A. Lesiones anogenitales por Virus Papiloma Humano. Estudio de

prevalencia en niños, niñas y adolescentes no vacunados. *Andes pediátrica* [Internet]. 2023 [citado 2024 feb 10]; 94 (1): [aprox 7 p.]. Disponible en:

<https://www.scielo.cl/pdf/andesped/v94n1/2452-6053-andesped-andespediatr-v94i1-3534.pdf>

179. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Green J, La Vecchia C, et al. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2009 [cited 2022 nov 12]; 18: [about 9 p. ]. Available from:

<https://aacrjournals.org/cebip/article-pdf/18/4/1060/2269577/1060.pdf>

180. Patil V, Wahab S, Zadpey S, Vasudeo N. Development and validation of risk scoring system for prediction of cancer cervix. *Indian J Public Health* [Internet]. 2006 [cited 2022 nov 9]; 50 (1): [about 4 p. ]. Available from:

[https://www.researchgate.net/profile/Sanjay-Zodpey/publication/6606420\\_Development\\_and\\_validation\\_of\\_risk\\_scoring\\_system\\_for\\_prediction\\_of\\_cancer\\_cervix/links/62c7f38d3bbe636e0c4aa0d0/Development-and-validation-of-risk-scoring-system-for-prediction-of-cancer-cervix.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sanjay-Zodpey/publication/6606420_Development_and_validation_of_risk_scoring_system_for_prediction_of_cancer_cervix/links/62c7f38d3bbe636e0c4aa0d0/Development-and-validation-of-risk-scoring-system-for-prediction-of-cancer-cervix.pdf)

181. Carrión Ordóñez J I, Soto Brito Y, Pupo Antúnez M. Infección por virus del papiloma humano en mujeres del Cantón Cañar, Ecuador. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2020 [citado 11 jun 2021]; 72(1): [aprox. 20 p.].Disponible en:



<http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v72n1/1561-3054-mtr-72-01-e500.pdf>

182. Osorio Castaño J H, Pérez Villa M, Montoya Zapata C P, Cardona Restrepo F A. Características citológicas previas al diagnóstico de cáncer de cérvix en mujeres de Medellín (Colombia). Universidad y Salud [Internet]. 2020 [citado 14 jun 2021]; 22(3): [aprox.6 p.]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v22n3/2389-7066-reus-22-03-231.pdf>

183. Cabrera Guerra II, Ortiz Sánchez Y, Suárez Gómez YL, Socarrás Rodríguez R, Vázquez Rosales I. Factores de riesgo asociados al cáncer cérvico-uterino en el área de salud de Santa Rita. Revista Médica Multimed [Internet]. 2016 [citado 2022 nov 12]; 20(5): [aprox 18 p.]. Disponible en:

<https://revmultimed.sld.cu/index.php/mtm/article/download/392/625>

184. Benia W, Tellechea G. Estudio de los factores de riesgo para cáncer de mama y cuello uterino en mujeres usuarias de tres policlínicas barriales de Montevideo. Rev Med Uruguay 2000 [Internet]. 2000 [citado 2022 nov 12]; 16 (2): [aprox 10 p.]. Disponible en:

<https://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/2000v2/art2.pdf>

185. Iglesias Osores S, Serquén López L M. Virus papiloma humano y factores asociados en pacientes con citología desconocida atendidas en el norte de Perú. Rev Peru Ginecol Obstet. [Internet]. 2020 [citado 10 mar 2021]; 66(3): [aprox.7 p.]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rgo/v66n3/2304-5132-rgo-66-03-00009.pdf>

186. Orioni M, Cristoforoni P, Carminati G, Stefani C, Costa S, Sandri MT et, al. E6/E7 mRNA testing for human papilloma virus-induced high-grade

cervical intraepithelial disease (CIN2/CIN3): a promising perspective. *ecancer* [Internet]. 2015 [cited 2022 nov 12]; 9 (533): [about 10 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435751/pdf/can-9-533.pdf>

187. Martins TR, Mendes de Oliveira C, Reis Rosa L, de Campos Centrone C, Regina Rodrigues CL, Lina Villa L, et, al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. Martins et al. *Virology Journal* [Internet]. 2016 [cited 2022 nov 12]; 13 (138): [about 4 p. ]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982268/pdf/12985\\_2016\\_Article\\_594.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982268/pdf/12985_2016_Article_594.pdf)

188. GinindzaTG, Dlamini X, Almonte M, Herrero R, Jolly PE, Tsoka-Gwegweni JM, et al. Prevalence of and Associated Risk Factors for High Risk Human Papillomavirus among Sexually Active Women, Swaziland. *PLOS ONE* [Internet]. 2017 jan [cited 2022 dic 7]; 12(1): [about 15 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256897/pdf/pone.0170189.pdf>

189. Sabol I, Milutin Gasperov N, Matovina M, Bozinovic K, Grubišić G, Fistonc I, et al. Cervical HPV type-specific pre-vaccination prevalence and age distribution in Croatia. *PLOS ONE* [Internet]. 2017 [cited 2022 nov 12]; 12 (7): [about 4 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5503252/pdf/pone.0180480.pdf>

190. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* [Internet]. 2010 [cited 2022 nov 14]; 202 (12): [about 10 p.]. Available from:

<https://academic.oup.com/jid/article/202/12/1789/2192082?login=false>

191. Holl K, Nowakowski AM, Powell N, McCluggage WG, Collas De Souza S, Tjalma WA, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study. *Int. J. Cancer* [Internet]. 2015 [cited 2022 nov 22]; 137: [about 10 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5034816/pdf/IJC-137-2858.pdf>

192. de Oliveira CM, Fregnani JH, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 [cited 2022 sep 10]; 13: [about 8 p. ]. Available from:

<https://bmccancer.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/1471-2407-13-357.pdf>

193. Tsung-chieh JF, Long Fu X, Ayaka H, Hughes JP, Qinghua F, Schwartz SM, et al. Short-term Natural History of High-Risk Human Papillomavirus Infection in Mid-Adult Women Sampled Monthly (Short title: Short-term HPV

Natural History in Mid-Adult Women). *Int J Cancer* [Internet]. 2015 nov [cited 2022 jun 17]; 137 (10): [about 10 p.]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4591913/pdf/nihms721343.pdf>

194. Fatma B T, Fatma S, Meryem G, Buket A, Baris P, Mesut A. et al. The prevalence of human papillomavirus (HPV) genotypes detected by PCR in women with normal and abnormal cervico-vaginal cytology. *Ginekologia Polska* [Internet]. 2018 [cited 2022 jul 12]; 89 (2): [about 5 p. ]. Available from:

[https://journals.viamedica.pl/ginekologia\\_polska/article/view/GP.a2018.0011/43299](https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/GP.a2018.0011/43299)

195. Guilarte-García E, Soto-Brito J, Kourí-Cardellá V, Limia-León CM, Sánchez-Alvarez ML, Rodríguez-Díaz AE, et al. Circulation of Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis in Cuban Women. *MEDICC Review* [Internet]. 2020 jan [citado 2022 feb 13]; 22(1): [aprox 11 p.]. Disponible en:

<https://mediccreview.org/wp-content/uploads/2020/02/MR-January2020-Guilarte-Circulation-Human-Papillomavirus.pdf>

196. Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM. Role of HPV genotype, multiple infections and viral load on the risk of high-grade cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* [Internet]. 2019 [cited 2022 dic 7]; 28 (11): [about 8 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8394698/pdf/nihms-1730809.pdf>

197. Zhao S, Zhao X, Hu S, Lu J, Duan X, Zhang X, et al. Distribution of high-risk human papillomavirus genotype prevalence and attribution to cervical precancerous lesions in rural North China. *Chin J Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2022 ene 12]; 31 (4): [about 9 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6736663/pdf/cjcr-31-4-663.pdf>

198. So KA, Lee IH, Lee KH, Hong SR, Kim YJ, Seo HH, et al. Human papillomavirus genotype-specific risk in cervical carcinogenesis. *J Gynecol Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2022 nov 12]; 30 (4): [about 9 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6543103/pdf/jgo-30-e52.pdf>

199. Oyervides Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Sánchez Domínguez CN, Berlanga Garza A, Antonio Macedo M, Valdéz Chapa LD, et al. Multiple HPV Infections and Viral Load Association in Persistent Cervical Lesions in Mexican Women. *Viruses* [Internet]. 2020 [cited 2022 abr 14]; 12 (380): [about 12 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7232502/pdf/viruses-12-00380.pdf>

200. Wang W, Zhang X, Li M, Hao C, Liang H. Association between Vaginal Infections and the Types and Viral Loads of Human Papillomavirus: A Clinical Study Based on 4,449 Cases of Gynecologic Outpatients. *Can J Infect Dis*

Med Microbiol [Internet]. 2020 [cited 2022 feb 12]; 2020: [about 6 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7128038/pdf/CJIDMM2020-9172908.pdf>

201. Jongseung K, Bu Kyung K, Dongsoo J, Hyeong Lee C, Ju-Won R, Joo-Young K. Type-Specific Viral Load and Physical State of HPV Type 16, 18, and 58 as Diagnostic Biomarkers for High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or Cervical Cancer. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 [cited 2022 nov 8]; 52 (2): [about 9 p. ]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7176961/pdf/crt-2019-152.pdf>

202. Long W, Yang Z, Li X, Chen M, Liu J, Zhang Y, et al. HPV-16, HPV-58, and HPV-33 are the most carcinogenic HPV genotypes in Southwestern China and their viral loads are associated with severity of premalignant lesions in the cervix. *Virology Journal* [Internet]. 2018 [cited 2022 abr 4]; 15 (94): [about 8 p. ]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5970451/pdf/12985\\_2018\\_Article\\_1003.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5970451/pdf/12985_2018_Article_1003.pdf)

203. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017 [cited 2022 nov 12]; 13 (4): [about 8 p. ]. Available from:

<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1006211&type=printable>

204. Chiesa IJ, Perez MS, Nuñez GG, Pirola DA. Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina. *VirusDis* [Internet]. 2016 jan [cited 2022 abr 9]; 27 (1): [about 6 p. ]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758316/pdf/13337\\_2015\\_Article\\_295.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758316/pdf/13337_2015_Article_295.pdf)

205. Badano I, Totaro ME, Culasso AC, Sanabria DJ, Schurr TG, Balette IC, et al. Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 [cited 2021 mar 5]; 29: [about 6 p. ]. Available from:

[https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/29964/CONICET\\_Digital\\_Nro\\_48ca90d0-d7ee-4efa-b202-053f540275c0\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/29964/CONICET_Digital_Nro_48ca90d0-d7ee-4efa-b202-053f540275c0_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

206. Ramas V, Mirazo S, Bonilla S, Ruchansky D, Arbiza J. Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women. *Gene* [Internet]. 2018 may [cited 2021 nov 8]; 654: [about 6 p. ]. Available from:

<https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/j.ijgo.2013.01.020>

207. Mendoza L. Distribución de aislados de variantes de VPH-16 en mujeres paraguayas con diferentes grados de lesión cervical (2014 Science National Prize). *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* [Internet]. 2015 [cited 2022 nov 4]; 13 (1): [about 3 p. ]. Disponible en:

<http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v13n1/v13n1a15.pdf>

208. Bedoya Pilozo CH, Medina Magües L, Espinosa García M, Sánchez M, Parrales Valdiviezo JV, Molina D, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human papillomavirus infection in women with cervical lesions and cancer from the coastal region of Ecuador Rev Argent Microbiol [Internet]. 2018 [cited 2020 nov 26]; 50 (2): [about 10 p. ]. Available from:

[https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/4335/Bedoya-Pilozo%20C\\_2018\\_Molecular%20epidemiology%20and%20phylogenetic.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/4335/Bedoya-Pilozo%20C_2018_Molecular%20epidemiology%20and%20phylogenetic.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

209. da Silva RL, da Silva Batista Z, Bastos GR, Cunha APA, Figueiredo FV, de Castro LO, et al. Role of HPV 16 variants among cervical carcinoma samples from Northeastern Brazil. BMC Womens Health [Internet]. 2020 [cited 2022 sep 10]; 20 (1): [about 11 p. ]. Available from:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7395427/pdf/12905\\_2020\\_Article\\_1035.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7395427/pdf/12905_2020_Article_1035.pdf)

210. Calleja-Macias I, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez Guerrero J, et al. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. Virology [Internet]. 2004 feb [cited 2022 sep 14]; 319 (2): [about 8 p. ]. Available from:

[https://www.academia.edu/en/5723994/Genomic\\_diversity\\_of\\_human\\_papillomavirus\\_16\\_18\\_31\\_and\\_35\\_isolates\\_in\\_a\\_Mexican\\_population\\_and\\_relationship\\_to\\_European\\_African\\_and\\_Native\\_American\\_variants](https://www.academia.edu/en/5723994/Genomic_diversity_of_human_papillomavirus_16_18_31_and_35_isolates_in_a_Mexican_population_and_relationship_to_European_African_and_Native_American_variants)



211. Lopera EA, Baena A, Florez V, Montiel J, Duque C, Ramirez T, et al. Unexpected inverse correlation between Native American ancestry and Asian American variants of HPV16 in admixed Colombian cervical cancer cases. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014 [cited 2022 sep 28]; 28: [about 5 p. ]. Available from:

[https://www.academia.edu/47730939/Unexpected\\_inverse\\_correlation\\_between\\_Native\\_American\\_ancestry\\_and\\_Asian\\_American\\_variants\\_of\\_HP16\\_in\\_admixed\\_Colombian\\_cervical\\_cancer\\_cases](https://www.academia.edu/47730939/Unexpected_inverse_correlation_between_Native_American_ancestry_and_Asian_American_variants_of_HP16_in_admixed_Colombian_cervical_cancer_cases)

212. Lopes da Silva R, da Silva Batista Z, Rodríguez Bastos G, Almeida Cunha AP, Figueiredo FV, Oliveira de Castro L, et al. Role of HPV 16 variants among cervical carcinoma samples from Northeastern Brazil. *BMC Women's Health* [Internet]. 2020 [cited 2022 mar 2]; 20 (162): [about 11 p. ]. Available from:

<https://bmcwomenshealth.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12905-020-01035-0.pdf>

213. Totaro ME. Análisis de los Genes E6, E7 y L1 del virus Papiloma Humano tipo 16 como marcadores pronóstico tempranos de la progresión de lesiones de Cuello Uterino. [Tesis en opción al título de Doctora en Ciencias Aplicadas]. Posadas, República Argentina: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones; 2022

214. Mejía L, Muñoz D, Trueba G, Tinoco L, Zapata S. Prevalence of human papillomavirus types in cervical cancerous and precancerous lesions of Ecuadorian women. *J Med Virol* [Internet]. 2016 [cited 2022 sep 10]; 88 (1): [about 8 p. ]. Available from:

[https://www.researchgate.net/profile/Lorena-Mejia-Castaneda/publication/279302217\\_Prevalence\\_of\\_Human\\_Papillomavirus\\_types\\_in\\_cervical\\_cancerous\\_and\\_precancerous\\_lesions\\_of\\_Ecuadorian\\_women/links/5df062ca92851c83647390c5/Prevalence-of-Human-Papillomavirus-types-in-cervical-cancerous-and-precancerous-lesions-of-Ecuadorian-women.pdf?\\_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uliwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19](https://www.researchgate.net/profile/Lorena-Mejia-Castaneda/publication/279302217_Prevalence_of_Human_Papillomavirus_types_in_cervical_cancerous_and_precancerous_lesions_of_Ecuadorian_women/links/5df062ca92851c83647390c5/Prevalence-of-Human-Papillomavirus-types-in-cervical-cancerous-and-precancerous-lesions-of-Ecuadorian-women.pdf?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uliwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19)

215. Badano I, Totaro ME, Culasso AC, Sanabria DJ, Schurr TG, Balette IC, et al. Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 [cited 2022 nov 19]; 29: [about 6 p. ]. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S156713481400416X?via%3Dihub>

216. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a casecontrol study. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2001 [cited 2022 sep 10]; 93 (17): [about 6 p. ]. Available from:

<https://academic.oup.com/jnci/article/93/17/1325/2519481>

## 6. ANEXOS.

### Anexo 1. MODELO DE RECOGIDA DE LA INFORMACIÓN (CUESTIONARIO)

\_\_\_\_\_  
Fecha de toma de muestra      Tipo de Muestra      Muestra tomada por      Hospital

#### I- DATOS PERSONALES.

Nombre \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_ Apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Color de la Piel: \_\_\_\_\_ Número e  
HC: \_\_\_\_\_ CI: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_

Centro de Trabajo: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

#### II-ULTIMO GRADO DE ESCOLARIDAD ALCANZADO.

Elemental\_\_\_ Primario\_\_\_ Secundaria\_\_\_ Pre o tecnológico\_\_\_ Universitario\_\_\_

#### III-SITUACIÓN LABORAL.

Ama de casa\_\_\_ Estudiante\_\_\_ Obrera\_\_\_ Técnica\_\_\_ Profesional\_\_\_ Cuenta  
propia\_\_\_

#### IV-ESTADO CIVIL.

Soltera\_\_\_ Casada\_\_\_ Viuda\_\_\_ Divorciada\_\_\_

#### V-HISTORIA ANTICONCEPTIVA.

**a: (actual)** DIU\_\_\_ Progesten+Estradiol\_\_\_ Prog\_\_\_ Control\_\_\_ Condón\_\_\_  
Tiempo de uso \_\_\_\_\_

#### **b: (anterior a la actual)**

DIU\_\_\_ P+E\_\_\_ P\_\_\_ Control \_\_\_\_\_ Tiempo de uso \_\_\_\_\_

#### VI-HISTORIA OBSTÉTRICA.

Edad de la primera menstruación \_\_\_\_\_

Última menstruación (fecha) \_\_\_\_\_

Trastornos Menstruales \_\_\_\_\_ Metrorragia \_\_\_\_\_ Leucorrea \_\_\_\_\_

Menopausia \_\_\_\_\_ Espontánea \_\_\_\_\_

Quirúrgica \_\_\_\_\_ Total \_\_\_\_\_

Parcial \_\_\_\_\_

Edad de inicio de las primeras relaciones sexuales \_\_\_\_\_

Embarazos \_\_\_\_\_ Primer parto \_\_\_\_\_ Total \_\_\_\_\_ Abortos Espontáneos \_\_\_\_\_

Normales \_\_\_\_\_ Provocados \_\_\_\_\_

Patológicos\_\_\_\_\_

Número de parejas en los últimos dos años\_\_\_\_\_

**VII-HISTORIA GINECOLÓGICA y de ITS.**

**a) Antecedentes de enfermedades ginecológicas de naturaleza infecciosa:**

Condiloma\_\_\_ Gonorrea\_\_\_ Monilias\_\_\_ Sífilis\_\_\_ Trichomonas\_\_\_ Herpes Genital\_\_\_

Clamidia\_\_\_\_\_ Herpes Oral\_\_\_\_\_

Otras\_\_\_\_\_

Actuales ITS\_\_\_\_\_

**b) Antecedentes de prueba citológica alterada: Si\_\_\_ Fecha\_\_\_\_\_**

Diagnóstico\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

**c) Antecedentes de cirugía cervical: Si\_\_\_ Fecha\_\_\_\_\_**

Diagnóstico\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

**d) Antecedentes de colposcopia positiva Sí\_\_\_ Fecha\_\_\_\_\_**

Diagnóstico\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

**VIII-HÁBITOS TÓXICOS** (en los últimos 10 años): a) Cigarro\_\_\_\_\_ b) Alcohol\_\_\_\_\_ (≥1

vez x sem) Drogas\_\_\_\_\_ (alguna vez)

**IX- ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER**

Parentesco\_\_\_\_\_ Tipo de cáncer\_\_\_\_\_

**X-RESULTADOS:**

\_\_\_\_\_

Prueba citológica	Biopsia	PVH-RCP	Carga viral
-------------------	---------	---------	-------------

Colposcopia:\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Anexo 2. Operacionalización de las variables

<b>VARIABLES</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>
Edad (años)	Cuantitativa discreta por intervalos	< 20 20 - 30 31 - 40 41 - 50 51 - 60 > 61	Según edad en años cumplidos
Municipio de residencia	Cualitativa nominal politómica	Camagüey Vertientes Guaimaro Santa Cruz del Sur Esmeralda Florida C.M. de Céspedes Jimaguayú Minas	Municipio donde reside de forma permanente en la provincia Camagüey
Uso del DIU	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según haya usado o no, un dispositivo intrauterino. Datos de la historia clínica.
Partos	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según haya tenido alumbramiento a través de la vagina. Datos de la historia clínica.
Abortos	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según haya tenido interrupción o finalización prematura del embarazo de forma natural o voluntaria. Datos de la historia clínica.
Infecciones de transmisión sexual (ITS)	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según antecedentes o presencia de ITS. Datos de la historia clínica.
Tabaquismo	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Según antecedentes de adicción al cigarro. Datos tomados de la historia

			clínica.
Biopsia positiva	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Informe positivo o no, de resultados del estudio histológico por el dpto. de anatomía patológica, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Datos tomados de la historia clínica y de la encuesta.
Colposcopia positiva	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Colposcopía positiva en el momento del estudio, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Datos tomados de la historia clínica y encuesta.
Edad de la menarquia	Cuantitativa discreta por intervalos	< 10 años 10-14 años >14 años	Según la edad en la paciente tuvo su primera menstruación. Datos de la historia clínica.
Edad de las primeras relaciones sexuales	Cuantitativa discreta por intervalos	< 15 15-20 >20	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera relación sexual.
Número de parejas en los últimos 2 años	Cuantitativa discreta por intervalos	1 >2	Número de personas con las que mantuvo relaciones sexuales en el periodo analizado.
Diagnóstico histopatológico	Cualitativa ordinal	NR Negativo Coilocito NIC I NIC II NIC III CIS CIN	Según el informe de anatomía patológica de acuerdo con la interpretación de los resultados de la citología cervical, según la clasificación de Bethesda, 2001. Datos tomados de la historia clínica y de la encuesta.

Diagnóstico colposcópico	Cualitativa nominal politómica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesión atípica</li> <li>• Lesión endofítica</li> <li>• Lesión exofítica</li> <li>• Epitelio denso, bordes irregulares ambos labios. AB de</li> <li>• Epitelio denso, bordes irregulares en labio anterior. AB de</li> <li>• Epitelio denso, bordes regulares en labio anterior. AB de</li> <li>• Epitelio AB, de bordes regulares.</li> </ul>	Colposcopia positiva en el momento del estudio, según el Programa Cubano de Diagnóstico Precoz del Cáncer de Cuello de Útero. Datos tomados de la historia clínica y de la encuesta.
Genotipos VPH	Cualitativa nominal politómica	<p>           VPH-BR 6            VPH-BR 11            VPH-AR 16            VPH-AR 18            VPH-AR 31            VPH-AR 33            VPH-AR 35            VPH-AR 39            VPH-AR 45            VPH-AR 52            VPH-AR 56            VPH-AR 58         </p>	Según la identificación de VPH Alto o Bajo riesgo, mediante las técnicas de RFLP, secuenciación nucleotídica o qPCR.
Infecciones múltiples con VPH	Cualitativa nominal politómica	<p>Combinaciones de los VPH</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 18,31</li> <li>• 18,58</li> </ul>	Según la presencia de infección por varios genotipos de VPH en muestras de cérvix.

- 52,58
- 6,16,31
- 16,31,33
- 16,31,58
- 16,52,58
- 18,31,58
- 6,16,31,58

Carga viral de VPH	Cuantitativa continua	Valor numérico en copias/mL	Valor de la carga viral por genotipo, según qPCR y los estándares de concentración conocida.
Variantes del VPH-AR 16	Cualitativa nominal politómica	Variante (sublinajes A1,A2,A3, europeos; A4 asiático).	A Según la probabilidad obtenida mediante la construcción del árbol filogenético con el software MEGA.
		Variante (sublinajes B1, B2, africano 1).	B
		Variante (africano 2).	C
		Variante (sublinajes D1, norte americano; D2 y D3, D4, asiático-americanos)	D

**Abreviaturas:** VPH: NR: no realizado; VPH: virus del papiloma humano;

**CIS:** Carcinoma in Situ; **CIN:** Carcinoma infiltrante; **Epitelio AB:** Epitelio aceto-blanco.



**Anexo 3.** Carta acuerdo de coordinación con Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), y confirmación de secuenciación nucleotídica correspondiente al proyecto de investigación "Identificación molecular de Papillomavirus humanos en pacientes con cáncer de cuello uterino en la provincia Camagüey.



CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
Ave 25 # 15202 Esq. 21-A, Cubanacán, Playa  
Apartado 6414 Tel. (537) 208-5236, La Habana, CUBA.

Ciudad de La Habana, 18 de abril de 2017

"Año 59 de la Revolución"

A quien pueda interesar:

Por medio de la presente comunico que el Dr. Juan Carlos Piña Napal, profesor de la universidad de Ciencias Médicas de Camagüey, previa coordinación, de mutuo acuerdo y con el apoyo de nuestro centro, ha cumplimentado la secuenciación nucleotídica de los productos de P.C.R. correspondientes al proyecto de investigación "Identificación molecular de Papillomavirus humano en pacientes con cáncer de cuello uterino de la provincia de Camagüey".

Sin otro asunto que tratar y para que así conste, firma la presente:

Dr C. Rafael Fando Calzada

Vicedirector de Investigación – Desarrollo e innovación



**Anexo 4.** Secuencias de los cebadores y sondas empleadas en la qPCR reportadas previamente por Schmitz M y cols.

<b>Cebadores y Sondas</b>	<b>Secuencias 5' - 3'</b>
<b>VPH 6 +</b>	5' TGGGGTAATCAACTGTTTGTACTGTGGTA 3'
<b>VPH 6 -</b>	5' GCATGTACTCTTTATAATCAGAATTGGTGTATGTG 3'
<b>VPH 6 Sonda</b>	5' GACATTATGTGCATCCGTAACACTAC 3'-Cy5
<b>VPH 11 +</b>	5' CTGGGGAAACCACTTGTGGTACTGTG 3'
<b>VPH 11 -</b>	5' CGCATGTATTCCTTATAATCTGAATTAGTGTATGTA 3'
<b>VPH 11 Sonda</b>	5' GACACTATGTGCATCTGTGTCTAA 3'-Cy5
<b>VPH 16 +</b>	5' GAA CCG AAA CCG GTT AGT ATA A 3'
<b>VPH 16 -</b>	5' ATG TAT AGT TGT TTG CAG CTC TGT 3'
<b>VPH 16 Sonda</b>	5' CAT TTT ATG CAC CAA AAG AGA ACT GCA ATG TTT C 3'-FAM
<b>VPH 18 +</b>	5' GGA CCG AAA ACG GTG TAT ATA A 3'
<b>VPH 18 -</b>	5' CAG TGA AGT GTT CAG TTC GGT 3'
<b>VPH 18 Sonda</b>	5' ATG TGA GAA ACA CAC CAC AAT ACT ATG GCG CG 3'-FAM
<b>VPH 31 +</b>	5' GAA CCG AAA ACG GTT GGT ATA TA 3'
<b>VPH 31 -</b>	5' ATC GTA GGG TAT TTC CAA TGC 3'
<b>VPH 31 Sonda</b>	5' CAT AGT ATT TTG TGC AAA CCT ACA GAC GCC ATG T 3'-FAM
<b>VPH 33 +</b>	5' GCA TGA TTT GTG CCA AGC AT 3'
<b>VPH 33 -</b>	5' CTC AGA TCG TTG CAA AGG TTT 3'
<b>VPH 33 Sonda</b>	5' ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA CAG TGC GTG GAA TGC FAM
<b>VPH 45 +</b>	5' CAG TGT AAT ACA TGT TGT GAC CAG 3'
<b>VPH 45 -</b>	5' ACA GGA TCT AAT TCA TTC TGA GGT 3'
<b>VPH 45 Sonda</b>	5' CAA GAA AGA CTT CGC AGA CGT AGG GAA ACA C 3'-FAM
<b>VPH 52 +</b>	5' AAA CGG TCA GAC CGA AAC C 3'
<b>VPH 52 -</b>	5' CAG CAC CTC ACA CAA TTC GT 3'
<b>VPH 52 Sonda</b>	5' AAC ACA GTG TAG CTA ACG CAC GGC CAT GT 3' -Cy5
<b>VPH 58 +</b>	5' CAC GGA CAT TGC ATG ATT TGT 3'
<b>VPH 58 -</b>	5' TCA GAT CGC TGC AAA GTC TTT 3'

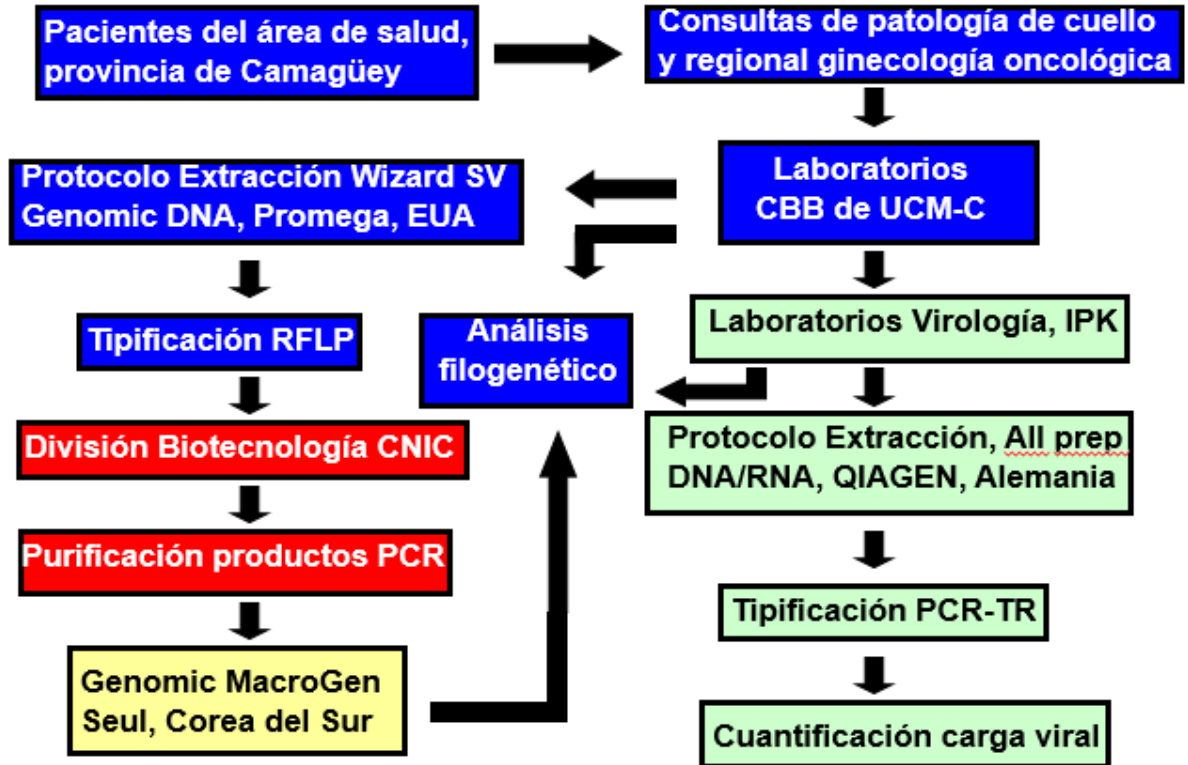
<b>VPH 58 Sonda</b>	5´ TTT CAA TTC GAT TTC ATG CAC 3´-FAM
<b>βG +</b>	5´ ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3´
<b>βG -</b>	5´ CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3´
<b>βG Sonda</b>	5´ TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC 3´-FAM

**Fuente:** (113)

**Abreviaturas:** **VPH:** virus del papiloma humano; **βG:** β-globina.

Anexo 5. Flujoograma de trabajo

## Resumen del flujoograma de trabajo



## **Anexo 6. Consentimiento informado**

Se me ha informado que en la Universidad de Ciencias Médica de Camagüey se desarrolla un estudio para identificar el virus que causa el cáncer de cuello uterino. Este virus, que es un miembro de la familia de los Papilomavirus, puede originar este cáncer en más del 99 % de las pacientes afectadas. Se me ha informado además que este estudio contribuirá a conocer cuál de los miembros de esta familia de virus es el más frecuente en la ciudad de Camagüey, todo lo cual será un aporte que contribuirá a mejorar el manejo médico integral de esta enfermedad. Después de aclaradas las dudas, declaro mi voluntad de brindar información bajo las siguientes condiciones:

- Mi participación en el mismo es totalmente voluntaria.
- Se hará una evaluación en consulta médica formada por especialistas en Ginecología y Obstetricia, Anatomía Patológica y en Bioquímica Clínica. Se realizarán solo los exámenes requeridos para la confirmación del diagnóstico clínico planteado y se me explicará previo a la realización de los mismos.
- Los resultados se me informarán de forma comprensible, a través de esta consulta y no serán utilizados para otros estudios no relacionados con esta investigación. Estos se publicarán solo en medios científicos y en ningún caso incluirá algún dato que revelen mi identidad.

- Soy libre de abandonar en cualquier momento que desee el estudio y no impedirá en ningún momento que reciba los beneficios que se obtengan de la mismas bien sean médicos o sociales.

Nombre y Apellidos del Paciente: \_\_\_\_\_

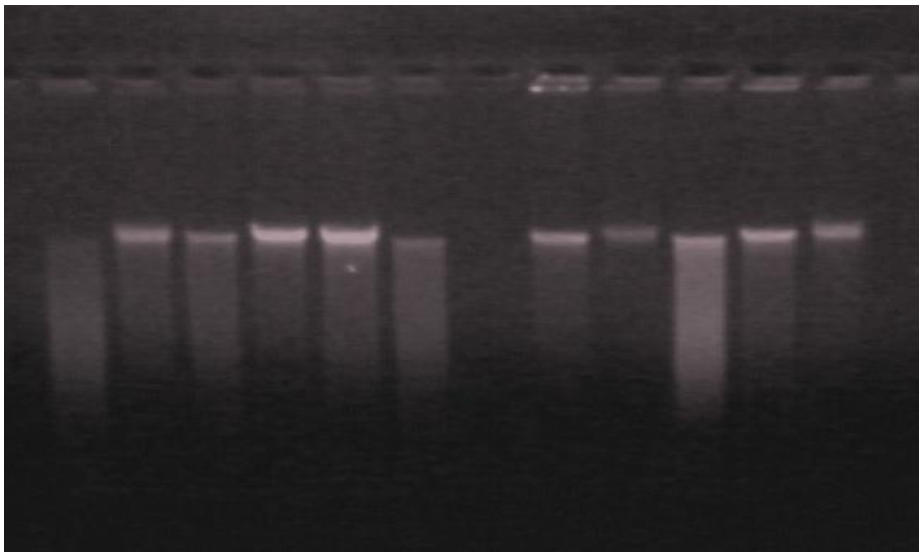
Firma: \_\_\_\_\_

Nombre y Apellidos del Investigador: \_\_\_\_\_

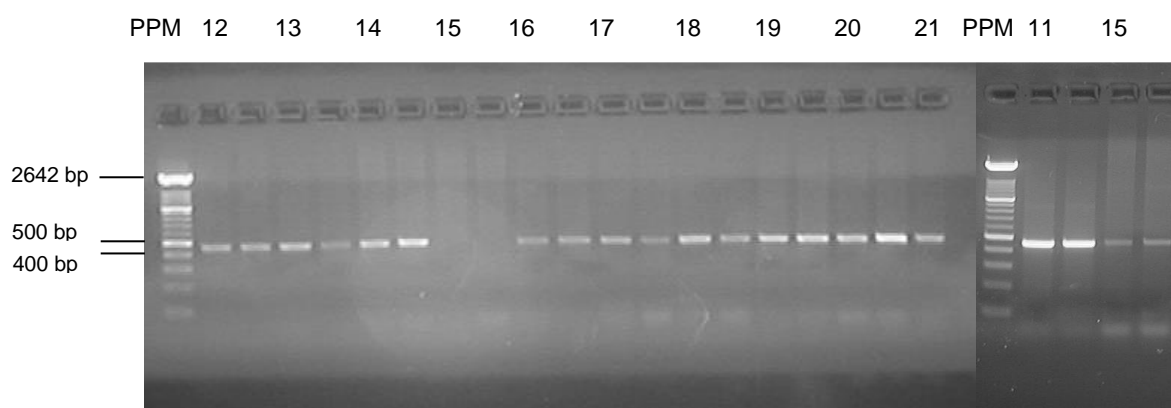
Firma: \_\_\_\_\_

**Anexo 7.** Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,8% para evaluar la cantidad y calidad del ADN total purificado. Se ordenaron las muestras de izquierda a derecha, desde el H11 hasta H22.

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



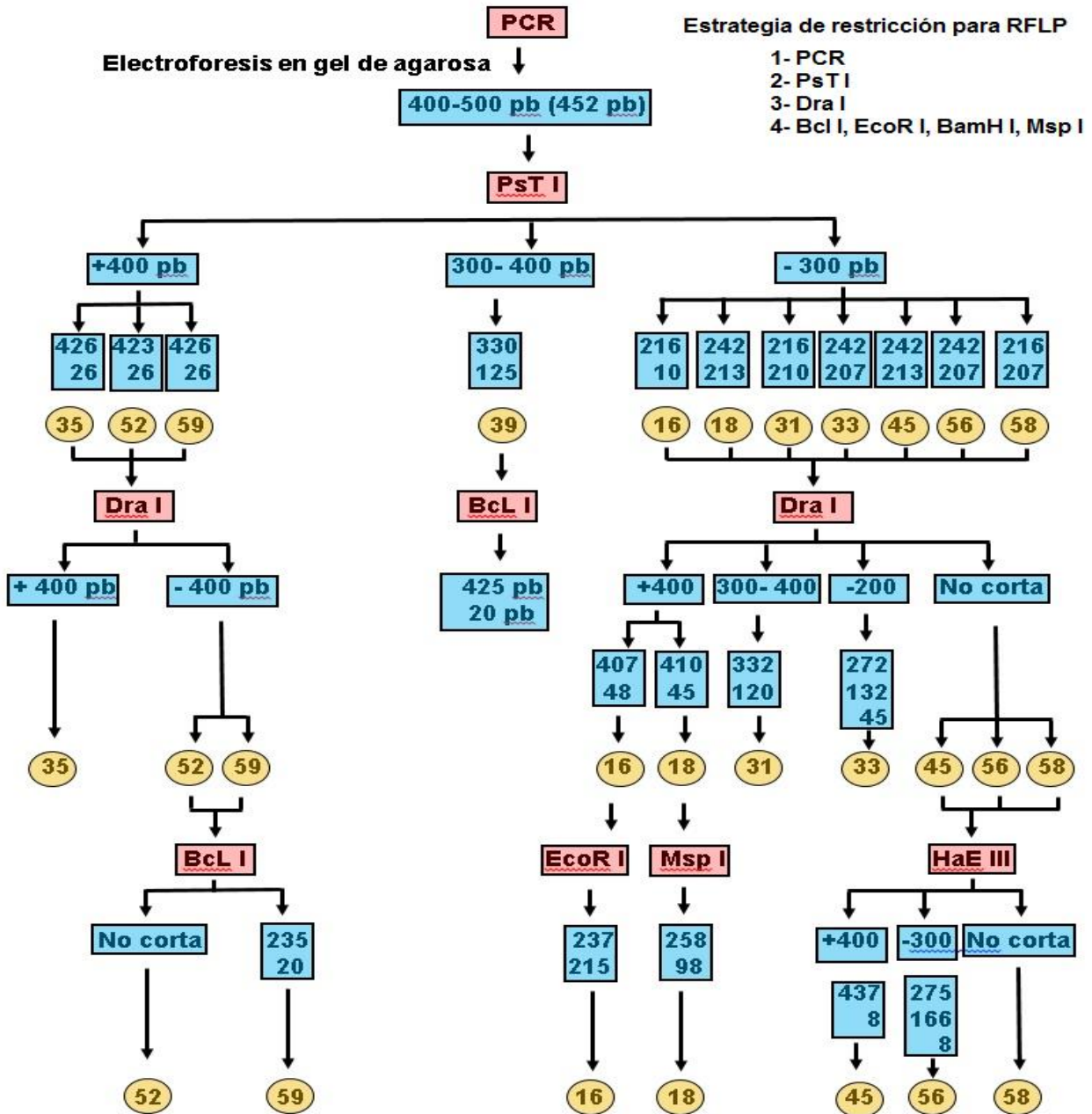
**Anexo 8.** Electroforesis de ADN en gel de agarosa normal al 0,8 % donde se observan el patrón de peso molecular (PPM), las bandas de 450 pb amplificadas por el PCR convencional de los pacientes H11-H20 (por duplicado); paciente H21 (simple).





**Anexo 9.** Algoritmo diagnóstico diseñado para tipificación de los VPHs

mediante estudio de restricción.

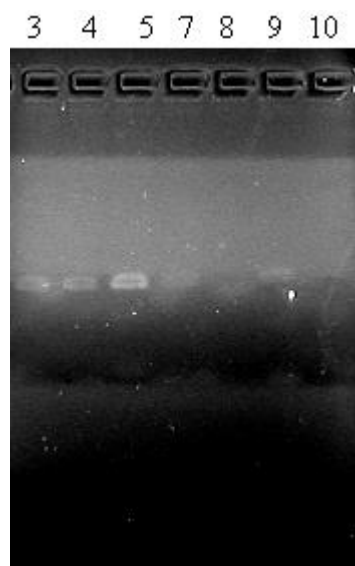


**Estrategia de restricción para RFLP**

- 1- PCR
- 2- PsT I
- 3- Dra I
- 4- BcI I, EcoR I, BamH I, Msp I

**Nomenclatura.** Cuadro rojo: Enzima de restricción; cuadro azul: tamaño de fragmento en electroforesis (pb); círculo amarillo: posible VPH.

**Anexo 10.** Electroforesis en gel de agarosa normal al 0,8 % para comprobar el contenido de 1 $\mu$ L ADN de la preparación purificada de los productos de la PCR de los pacientes jcp003-005 y 007-010.

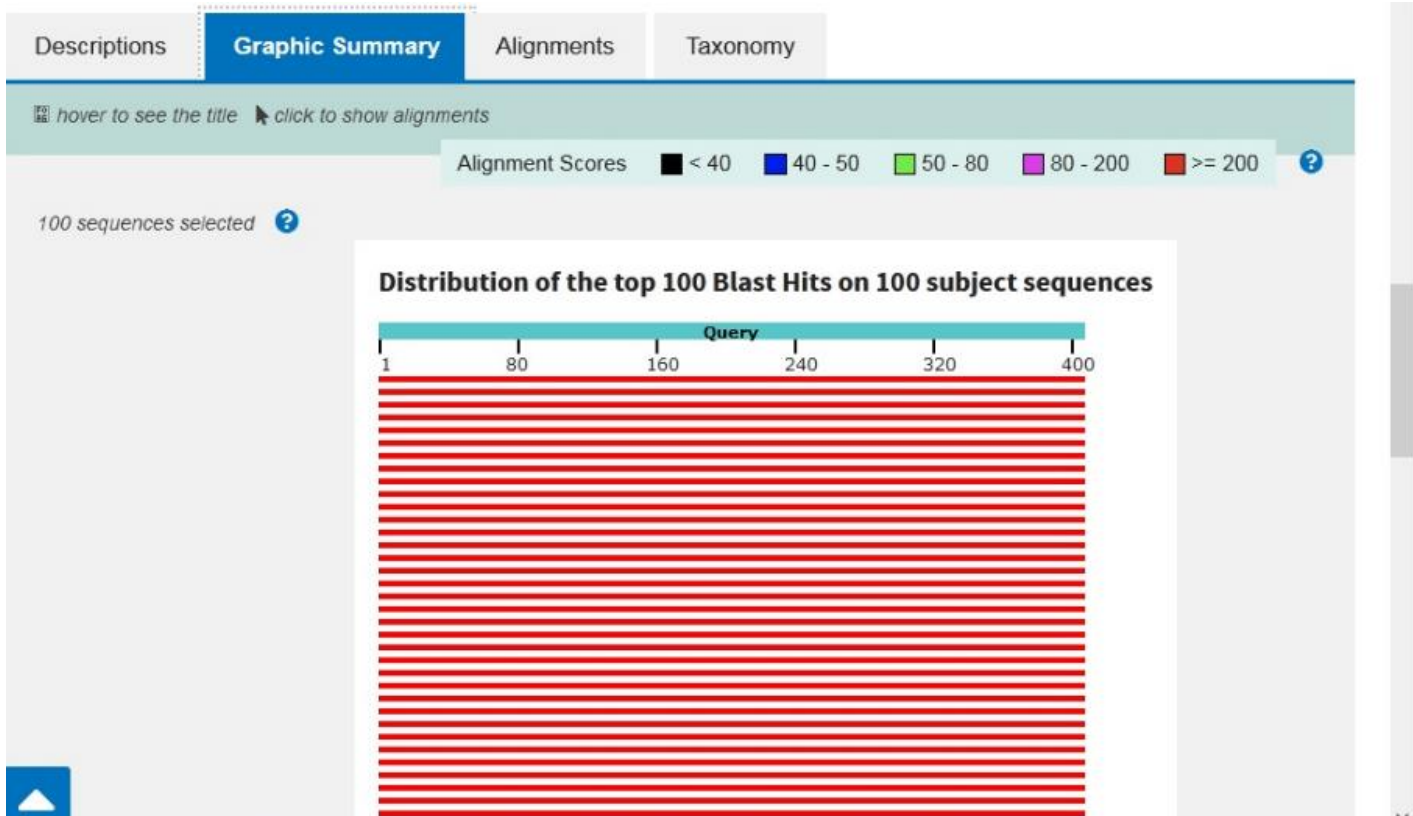


**Anexo 11.** Se muestra la descripción del análisis con la herramienta BLAST

para la secuencia nucleotídica del paciente jcp008.

Sequences producing significant alignments									
Download <span>▼</span> Select columns <span>▼</span> Show 100 <span>▼</span> <span>?</span>									
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected <span style="float: right;"> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a> <a href="#">MSA Viewer</a> </span>									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 TK179 genomic DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7906	<a href="#">LC511112.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 TK174 genomic DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7905	<a href="#">LC511111.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 TK171 genomic DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7905	<a href="#">LC511110.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 SW070 genomic DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7905	<a href="#">LC511109.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 SW069 genomic DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7905	<a href="#">LC511108.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 SW061 genomic DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7688	<a href="#">LC511105.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 isolate C680 L1 protein gene, partial cds</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	1385	<a href="#">MK716214.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 isolate xuca1916, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7912	<a href="#">MK484705.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 K1753 DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7905	<a href="#">LC456606.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 K1755 DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7904	<a href="#">LC456607.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 K1844 DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7905	<a href="#">LC456613.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Human papillomavirus type 16 K2022 DNA, complete genome</a>	Human pa...	752	752	100%	0.0	100.00%	7906	<a href="#">LC456615.1</a>

**Anexo 12.** Se muestra el porcentaje de cobertura en el gráfico resumen durante el análisis con la herramienta BLAST para la secuencia nucleotídica del paciente jcp008



**Anexo 13.** Se muestra el alineamiento de bases durante el análisis con la herramienta BLAST para la secuencia nucleotídica del paciente jcp008, con un 100 % de cobertura para los 407 pb.

Descriptions   Graphic Summary   **Alignments**   Taxonomy

Alignment view   Pairwise    CDS feature   [Restore defaults](#)   [Download](#)

100 sequences selected

[Download](#)   [GenBank](#)   [Graphics](#)   [Next](#)   [Previous](#)   [Descriptions](#)

**Human papillomavirus type 16 TK179 genomic DNA, complete genome**  
 Sequence ID: [LC511112.1](#)   Length: 7906   Number of Matches: 1

Range 1: 6600 to 7006   [GenBank](#)   [Graphics](#)   [Next Match](#)   [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
752 bits(407)	0.0	407/407(100%)	0/407(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   ATGGCATTGTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAA
          |||
Sbjct 6600 ATGGCATTGTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAA

Query 61  ATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTA
          |||
Sbjct 6660 ATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTA

Query 121 AGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAAA
          |||
Sbjct 6720 AGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAAA

Query 181 TAACCTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTGGAGG
          |||
Sbjct 6780 TAACCTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTGGAGG

Query 241 ACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTG
          |||
Sbjct 6840 ACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTG

Query 301 TAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCC
          |||
Sbjct 6900 TAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCC

Query 361  TAAAAAATACACTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCT 407
          |||
Sbjct 6960 TAAAAAATACACTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCT 7006
  
```

< >





**Anexo 15.** Cálculo del mejor modelo de sustitución nucleotídica T92 (Tamura 3 parámetros) necesario para la construcción del árbol filogenético.

MEGA Caption Expert: Find Best-Fit Substitution Model (ML)

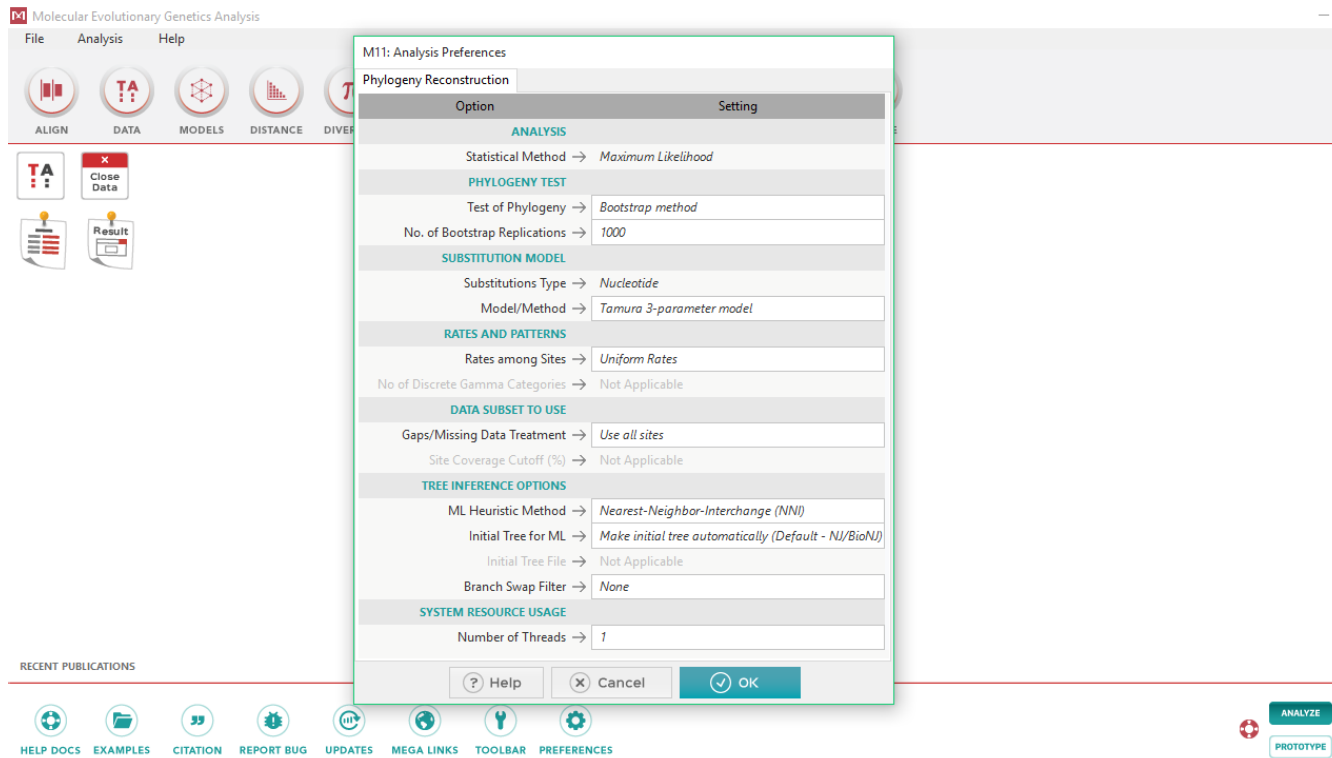
File Edit View Help

Results

**Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models**

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92	29	1503.030	1308.817	-625.264	n/a	n/a	2.68	0.324	0.324	0.176	0.176	0.041	0.022	0.131	0.041	0.131	0.022	0.041	0.242	0.022	0.242	0.041	0.02
T92+I	30	1510.544	1309.644	-624.667	0.49	n/a	2.70	0.324	0.324	0.176	0.176	0.041	0.022	0.132	0.041	0.132	0.022	0.041	0.242	0.022	0.242	0.041	0.02
T92+G	30	1511.142	1310.241	-624.966	n/a	0.05	2.76	0.324	0.324	0.176	0.176	0.040	0.022	0.132	0.040	0.132	0.022	0.040	0.244	0.022	0.244	0.040	0.02
T92+G+I	31	1517.388	1309.801	-623.736	0.73	0.35	2.88	0.324	0.324	0.176	0.176	0.039	0.021	0.134	0.039	0.134	0.021	0.039	0.246	0.021	0.246	0.039	0.02
HKY	31	1518.629	1311.043	-624.356	n/a	n/a	2.68	0.339	0.309	0.191	0.161	0.039	0.024	0.120	0.043	0.143	0.020	0.043	0.230	0.020	0.254	0.039	0.02
TN93	32	1525.527	1311.255	-623.452	n/a	n/a	2.68	0.339	0.309	0.191	0.161	0.040	0.024	0.063	0.044	0.209	0.021	0.044	0.338	0.021	0.133	0.040	0.02
HKY+I	32	1526.138	1311.866	-623.757	0.49	n/a	2.70	0.339	0.309	0.191	0.161	0.039	0.024	0.121	0.043	0.143	0.020	0.043	0.231	0.020	0.254	0.039	0.02
HKY+G	32	1526.719	1312.447	-624.048	n/a	0.05	2.77	0.339	0.309	0.191	0.161	0.038	0.024	0.121	0.042	0.144	0.020	0.042	0.232	0.020	0.256	0.038	0.02
JC	27	1529.841	1349.004	-647.376	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
K2	28	1531.418	1343.892	-643.811	n/a	n/a	2.68	0.250	0.250	0.250	0.250	0.034	0.034	0.182	0.034	0.182	0.034	0.034	0.182	0.034	0.182	0.034	0.03
HKY+G+I	33	1532.954	1311.997	-622.812	0.59	0.13	2.89	0.339	0.309	0.191	0.161	0.037	0.023	0.123	0.041	0.145	0.019	0.041	0.235	0.019	0.258	0.037	0.02
TN93+I	33	1533.054	1312.097	-622.862	0.49	n/a	2.71	0.339	0.309	0.191	0.161	0.039	0.024	0.063	0.043	0.210	0.021	0.043	0.339	0.021	0.133	0.039	0.02
TN93+G	33	1533.689	1312.732	-623.179	n/a	0.05	2.78	0.339	0.309	0.191	0.161	0.038	0.024	0.063	0.042	0.213	0.020	0.042	0.344	0.020	0.132	0.038	0.02
JC+I	28	1537.393	1349.867	-646.798	0.49	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
JC+G	28	1538.097	1350.571	-647.151	n/a	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
K2+I	29	1538.960	1344.746	-643.229	0.49	n/a	2.69	0.250	0.250	0.250	0.250	0.034	0.034	0.182	0.034	0.182	0.034	0.034	0.182	0.034	0.182	0.034	0.03
K2+G	29	1539.629	1345.416	-643.563	n/a	0.05	2.73	0.250	0.250	0.250	0.250	0.034	0.034	0.183	0.034	0.183	0.034	0.034	0.183	0.034	0.183	0.034	0.03
TN93+G+I	34	1540.055	1312.414	-622.009	0.73	0.42	2.91	0.339	0.309	0.191	0.161	0.037	0.023	0.062	0.041	0.216	0.019	0.041	0.349	0.019	0.131	0.037	0.02
JC+G+I	29	1546.493	1352.279	-646.995	0.43	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
K2+G+I	30	1547.982	1347.082	-643.386	0.46	0.05	2.78	0.250	0.250	0.250	0.250	0.033	0.033	0.184	0.033	0.184	0.033	0.033	0.184	0.033	0.184	0.033	0.03

**Anexo 16.** Parámetros seleccionado para la construcción del árbol filogenético: métodos estadísticos máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Tree), Bootstrap y Tamura 3 parámetros.





**Anexo 17.** Alineamiento para los pacientes H11, H12, H13, H14, H16, H19, H20 y H21 con respecto a las secuencias de referencias para el VPH-AR 16, según el método Clustal W.

M11: Tree Explorer: (Alineamiento H11-16, H19-21, MEGA X 04 marz 23 ver 1.meg)

Menu: Data, Display, Search, Groups, Highlight, Statistics, Help

Toolbar: File operations, Search, and other utility icons.

Name	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
1. Sec H21 305 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
2. Sec H20 311 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
3. Sec H19 299 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
4. Sec H16 305 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
5. Sec H14 313 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
6. Sec H13 313 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
7. Sec H12 220 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
8. Sec H11 241 pb	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
9. K02718.1 Human papillomavirus type 16 (HPV16) complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
10. HQ644298.1 Human papillomavirus type 16 isolate Z109 complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
11. HQ644257.1 Human papillomavirus type 16 isolate Qv00512 complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
12. HQ644236.1 Human papillomavirus type 16 isolate AS411 complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
13. AY686579.1 Human papillomavirus type 16 isolate Qv15321AA complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
14. AF536180.1 Human papillomavirus type 16 isolate African-1 type complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
15. AF536179.1 Human papillomavirus type 16 isolate European German 131 type complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
16. AF534061.1 Human papillomavirus type 16 East Asian type complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
17. AF472509.1 Human papillomavirus type 16 variant (African type 2) complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A
18. AF402678.1 Human papillomavirus type 16 Asian-American variant complete genome	A	T	G	G	G	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	T	T	T	A	C	A	G	T	T	T	A	T	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	G	C	A	A

Site# 37 / 168 Highlighted: None 18 taxa selected Data

Windows taskbar: 05:10 p. m. 03/03/2022

## Anexo 18. Cálculo del mejor modelo de sustitución nucleotídica T92 (Tamura 3 parámetros) necesario para la construcción del árbol filogenético

MEGA Caption Expert: Find Best-Fit Substitution Model (ML)

File Edit View Help

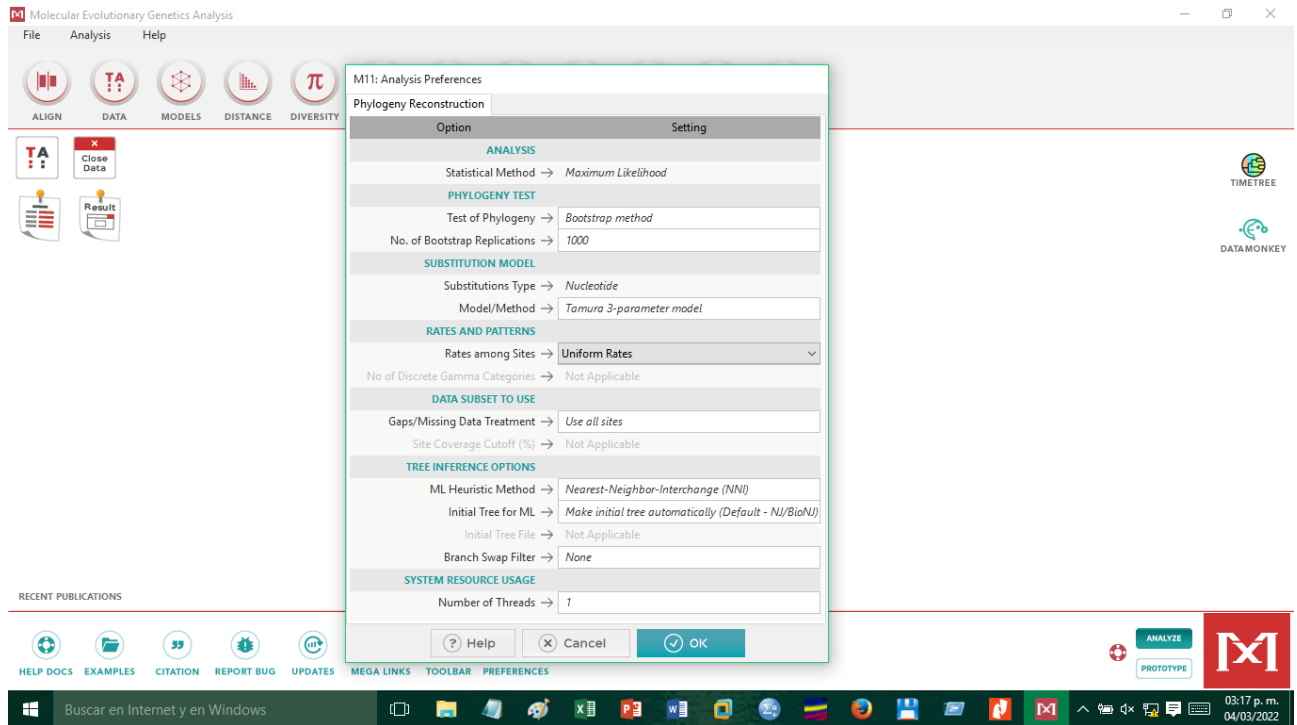
Results

**Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models**

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	$\beta(A)$	$\beta(T)$	$\beta(C)$	$\beta(G)$	$r(AT)$	$r(AC)$	$r(AG)$	$r(TA)$	$r(TC)$	$r(TG)$	$r(CA)$	$r(CT)$	$r(CG)$	$r(GA)$	$r(GT)$	$r(GC)$	
T92	35	1212.256	984.070	-456.786	n/a	n/a	2.01	0.317	0.317	0.183	0.183	0.050	0.029	0.125	0.050	0.125	0.029	0.050	0.217	0.029	0.217	0.050	0.02	
T92+G	36	1218.444	983.753	-455.612	n/a	0.05	2.06	0.317	0.317	0.183	0.183	0.049	0.029	0.126	0.049	0.126	0.029	0.049	0.218	0.029	0.218	0.049	0.02	
T92+I	36	1220.087	985.396	-456.434	0.49	n/a	2.02	0.317	0.317	0.183	0.183	0.050	0.029	0.126	0.050	0.126	0.029	0.050	0.217	0.029	0.217	0.050	0.02	
JC	33	1221.374	1006.201	-469.878	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
K2	34	1225.749	1004.069	-467.799	n/a	n/a	2.01	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.167	0.042	0.167	0.042	0.042	0.167	0.042	0.167	0.042	0.042	0.04
T92+G+I	37	1226.235	985.040	-455.241	0.48	0.05	2.11	0.317	0.317	0.183	0.183	0.048	0.028	0.127	0.048	0.127	0.028	0.048	0.220	0.028	0.220	0.048	0.02	
HKY	37	1226.348	985.152	-455.297	n/a	n/a	2.01	0.338	0.296	0.205	0.162	0.046	0.032	0.111	0.053	0.141	0.025	0.053	0.203	0.025	0.231	0.046	0.03	
JC+G	34	1227.472	1005.792	-468.660	n/a	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
JC+I	34	1229.147	1007.468	-469.498	0.49	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
K2+G	35	1231.883	1003.697	-466.599	n/a	0.05	2.03	0.250	0.250	0.250	0.250	0.041	0.041	0.167	0.041	0.167	0.041	0.041	0.167	0.041	0.167	0.041	0.041	0.04
TN93	38	1232.377	984.678	-454.045	n/a	n/a	2.01	0.338	0.296	0.205	0.162	0.048	0.033	0.040	0.054	0.228	0.026	0.054	0.328	0.026	0.083	0.048	0.03	
HKY+G	38	1232.455	984.756	-454.084	n/a	0.05	2.06	0.338	0.296	0.205	0.162	0.046	0.032	0.112	0.052	0.142	0.025	0.052	0.204	0.025	0.233	0.046	0.03	
K2+I	35	1233.695	1005.509	-467.505	0.49	n/a	2.01	0.250	0.250	0.250	0.250	0.041	0.041	0.167	0.041	0.167	0.041	0.041	0.167	0.041	0.167	0.041	0.041	0.04
HKY+I	38	1233.965	986.266	-454.839	0.49	n/a	2.02	0.338	0.296	0.205	0.162	0.046	0.032	0.111	0.053	0.141	0.025	0.053	0.203	0.025	0.232	0.046	0.03	
JC+G+I	35	1235.619	1007.434	-468.467	0.45	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.08
TN93+G	39	1238.380	984.178	-452.780	n/a	0.05	2.09	0.338	0.296	0.205	0.162	0.046	0.032	0.039	0.053	0.232	0.025	0.053	0.335	0.025	0.081	0.046	0.03	
K2+G+I	36	1239.832	1005.141	-466.307	0.45	0.05	2.06	0.250	0.250	0.250	0.250	0.041	0.041	0.168	0.041	0.168	0.041	0.041	0.168	0.041	0.168	0.041	0.041	0.04
TN93+I	39	1240.028	985.826	-453.604	0.49	n/a	2.03	0.338	0.296	0.205	0.162	0.047	0.033	0.039	0.054	0.229	0.026	0.054	0.330	0.026	0.082	0.047	0.03	
HKY+G+I	39	1240.200	985.998	-453.690	0.48	0.05	2.12	0.338	0.296	0.205	0.162	0.045	0.031	0.113	0.051	0.143	0.024	0.051	0.206	0.024	0.235	0.045	0.03	
TN93+G+I	40	1246.514	985.810	-452.580	0.40	0.05	2.15	0.338	0.296	0.205	0.162	0.045	0.031	0.038	0.052	0.235	0.025	0.052	0.339	0.025	0.080	0.045	0.03	

03:16 p. m. 04/03/2022

**Anexo 19.** Parámetros seleccionados para la construcción del árbol filogenético: métodos estadísticos máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Tree), Bootstrap y Tamura 3 parámetros.



**Anexo 20.** Por cientos de los linajes A, B, D y sublinajes del VPH-AR 16, obtenidos a partir del análisis filogenético de las secuencias amplificadas de la región del gen L1, en pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino de la provincia Camagüey.

