

**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.  
Doctorado en Ciencias Aplicadas**

Doctoranda  
***Lic. María Elina Totaro***

## **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 de Doctorado presentada para obtener el título de  
“Doctor en Ciencias Aplicadas”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director  
***Dr. Domingo Javier Liotta***  
Co-Directora  
***Dra. Inés Badano***

**Posadas, Misiones 2022**




Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y  
Naturales



---

# 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

**Lic. María Elina Totaro**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de  
Misiones para optar al grado académico de

**DOCTORA EN CIENCIAS APLICADAS**

---

**Posadas, República Argentina**

**2022**

**Director**

Dr. Domingo Javier Liotta

**Co-director**

Dra. Inés Badano

**TRIBUNAL EXAMINADOR** (Resolución de Consejo Directivo N°043-22)

Dra. Karina Alejandra Salvatierra

Dr. Cristian Alberto Ferri

Dr. Gerardo Daniel Deluca

**DEFENSA ORAL Y PUBLICA** (Resolución de Consejo Directivo N°)

Posadas, 2022

# **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**

**María Elina TOTARO**

## **Lugar de desarrollo del trabajo de tesis**

Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp),  
Facultad de Ciencias exactas, Químicas y Naturales de la  
Universidad Nacional de Misiones

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN** (Resolución de Consejo Directivo N° 207-15)

Dra. Marina Inés Quiroga

Dr. Pedro Darío Zapata

Dr. Gerardo Daniel Deluca

## **CARRERA DE DOCTORADO DE CIENCIAS APLICADAS**

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y  
Acreditación Universitaria (CONEAU) N° 344/11

*Es una locura odiar a todas las rosas porque  
una te pinchó. Renunciar a todos tus sueños  
porque uno de ellos no se realizó."*

*Antoine de Saint-Exupéry  
(El principito)*

## **Agradecimientos**

A mi hijo por ser mi motor para seguir creciendo

A mi familia por haberme acompañado a lo largo de mi desarrollo personal y profesional.

A mis directores por guiarme para hacer posible este sueño.

A mis amig@s por ser parte de mi familia elegida que me acompaño en todo momento.

A mis compañer@s labimaper@s por atravesar conmigo esta etapa.

Al Dr. Pedro Zapata por contribuir en mi formación profesional.

A la Dra. María Alejandra Picconi por contribuir en mi formación profesional.

Al Dr. Carlos Modenutti y su grupo por instruirme el mundo de las proteínas.

A la Educación Pública Argentina por permitirme aprender, crecer y desarrollarme.

## RESUMEN

El Virus Papiloma Humano tipo 16 (VPH16) es uno de los principales responsables del desarrollo de cáncer de cuello de útero. El cáncer cervical es el tercer cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo y el cuarto cáncer más frecuente entre las mujeres en Argentina. La provincia de Misiones, se considera una región con alta prevalencia de infección por VPH y tasa de mortalidad por cáncer cervical. Este escenario epidemiológico ha convertido al VPH16 en el blanco de vacunas y justifican los estudios de genética viral. Según la variación descrita en sus genomas, el VPH16 se clasifica en 4 linajes: A, B, C y D, que en diversos estudios, muestran una distribución geográfica y un potencial oncogénico diferentes. En este contexto, profundizamos en la variabilidad de la LCR y 3 genes virales del VPH16 (E6, E7 y L1) y su asociación como marcadores de riesgo en el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer cervical en mujeres residentes en la ciudad de Posadas (Misiones, Argentina). Para alcanzar este objetivo se estudió una población a 160 mujeres con prueba positiva de infección por VPH16 y diagnóstico citológico de NLIM, LSIL y HSIL/CC. Se realizó la caracterización genética de la LCR viral y los genes E6, E7 y L1 mediante amplificación por PCR y secuenciación directa por método de Sanger. La clasificación filogenética se realizó mediante métodos bayesianos. Para estimar la asociación entre las variantes genéticas y el riesgo de cáncer cervical se calculó la razón de probabilidad (RP). Las secuencias se tradujeron a proteínas y las variantes proteicas se analizaron *in silico* para comprender su asociación con sus principales blancos celulares. Los polimorfismos diagnósticos y los árboles filogenéticos confirmaron la presencia de linaje A (90,2 %) y D (7,3 %) en la población, similares a otros porcentajes encontrados en Argentina. La presencia del linaje D se asoció con el desarrollo del cáncer cervical con un RP de 13,8 (1,6 – 117,0). Con respecto al gen L1, se identificaron 36 secuencias diferentes, siendo la más común linaje A L1 6434G (35,6 %). La presencia de A6434G no se asoció con la progresión a HSIL/CC [RP= 1,54 (0,45 – 5,2)]. En relación al gen E6, se identificaron 11 secuencias diferentes, la variante más frecuente fue linaje A E6 350G (58,9 %). El polimorfismo T350G se asoció con la progresión a HSIL/CC, con un RP de 19,41 (4,95 - 76,10). En el gen E7 se identificaron 5 secuencias diferentes, de las cuales 2 eran no sinónimas. Debido a su baja frecuencia no pudieron establecerse estudios de asociación en este gen.

La traducción a proteína de estos SNPs frecuentes indicó un cambio de Treonina por Alanina en la posición 266 de L1 (L1 266A) y un cambio de Lisina por Valina en la posición 83 del gen E6 (E6 83V). El modelado de la estructura terciaria indicó que L1 266A se encuentra en los bucles superficiales del epítipo antigénico y ocupa una posición involucrada en la interacción con el heparánulfato durante el proceso de infección. Por otra parte, el análisis de la estructura terciaria de la proteína E6 indicó que el residuo 83 se encuentra cerca del sitio de

unión con la proteína ubiquitin quinasa E6AP, aunque no participaría directamente en las interacciones. La sustitución por Valina no induciría cambios en la estructura terciaria de la proteína, pero podría aportar cierta flexibilidad y aumentar la afinidad de unión de E6 con la E6AP y otras proteínas con motivos LxxLL. Futuros estudios *in vitro* permitirán comprender la relevancia de estos hallazgos.

Finalmente, ninguno de los SNPs de E7 ocuparon posiciones involucradas en contactos esenciales para la interacción con pRb o la formación de la estructura dimérica de E7, la cual es fundamental para la función *in vivo* de la proteína. Esta secuencia conservada de E7 probablemente se deba a limitaciones funcionales de esta pequeña proteína.

Nuestros resultados confirmaron la asociación del linaje D y la variante E6 350G con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical en la población de estudio. Estos datos contribuyen a comprender las bases biológicas de la incidencia de cáncer cervical en la región, identificar marcadores genéticos para una mejor definición de los grupos de riesgo en la era de la vacuna y generar en el ámbito local una base de datos de secuencias que contribuya al diseño de nuevos fármacos en la terapia contra el cáncer asociado al VPH16.

## **PALABRAS CLAVE**

cáncer de cuello de útero, factores de riesgo genéticos, oncogenes, proteína de la cápside.



## ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is the primary risk factor for developing cervical cancer, particularly HPV type 16. Cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide and the fourth most common cancer among women in Argentina. Misiones province is considered to be a region with a high prevalence of HPV infection and mortality rate of cervical carcinoma. Due to this epidemiological scenario, HPV16 has become the target of commercial vaccines and justifies viral genetic studies. According to variation described in its genomes, HPV16 is classified into 4 lineages: A, B, C and D, which in epidemiological studies exhibited different geographic distribution and oncogenic potential. In this context, we focused in the variability of HPV16 LCR and the 3 viral genes (E6, E7 and L1) regarding to their association as risk markers for the development of cervix lesions and cervical cancer progression in women residing in Posadas city (Misiones, Argentina). To achieve this objective, a population of 160 women with a positive test for HPV16 infection and a cytological diagnosis of NLIM, LSIL and HSIL/CC was studied. Genetic characterization of LCR and E6, E7 and L1 genes was performed by PCR amplification and direct Sanger sequencing method. The phylogenetic classification was carried out using Bayesian methods. Association between genetic variants and risk of cervical cancer, was estimated through *odds ratio* (OR) calculation. Sequences were translated into proteins, and protein variants were analyzed *in silico* to understand their association with their main cell targets. Diagnostic polymorphisms and phylogenetic trees confirmed the presence of the lineage A (90.2%) and D (7.3%) in the population, similar to other percentages found in Argentina. HPV variants from lineage D were more frequently found in women with H-SIL+ than those from lineage A, at an OR of 13.8 (CI 95% = 1.6–117.0). Thirty six different sequences were identified for L1 gene, being the most common the lineage A L1 6434G (35.6%). A6434G polymorphism did not show association with progression to HSIL/CC [OR= 1.54 (0.45 – 5.2)]. Regarding the E6 gene, eleven different sequences were identified, and the most frequent variant was lineage A E6 350G (58.9%). T350G polymorphism was associated with progression to HSIL/CC, with OR of 19.41 (4.95 - 76.10). Five different sequences were identified for the E7 gene, but only two had non-synonymous changes. Due to its low frequency, association studies for this gene could not be established.

Translation of frequent SNPs indicated a change from Threonine to Alanine at position 266 of L1 (L1 266A) and a change from Lysine to Valine at position 83 of E6 gene (E6 83V). Protein structure showed that L1 266A is found in the surface loops of the antigenic epitope and is involved in the interaction with heparan sulfate during the infection process. On the other hand, the analysis of E6 protein indicated that residue 83 is close to the binding site with the e6ap ubiquitin kinase protein, although it would not participate directly in these interactions, this

substitution would not induce changes in the tertiary structure of the protein, but could provide some flexibility and increase the binding affinity of E6 for the e6ap and other proteins with LxxLL motifs.

Finally, none of the E7 SNPs were involved in essential contacts with pRb or the formation of the dimeric structure of E7, which would be fundamental for the *in vivo* function of the protein. This conservation of E7 is probably due to functional limitations of this small protein.

Results confirmed the association of Lineage D and the E6 350G variant with an increased risk of developing cervical cancer in the study population. This data contributes to understand the biological bases of cervical cancer incidence in this region, to identify genetic markers for a better definition of risk groups in the vaccine era, and to generate locally a database of sequences in order to design new drugs for therapy against HPV16-associated cancer.

### **KEY-WORDS**

cervical cancer, genetic risk factors, oncogenes, capsid protein.

## INDICE

|   |           |
|---|-----------|
| Agradecimientos.....  | iv        |
| Resumen.....  | v         |
| Abstract.....   | vii       |
| Indice de tablas.....   | xii       |
| Indice de figuras.....  | xiv       |
| Lista de abreviaturas y acrónimos.....  | xv        |
| <b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Hipótesis.....   | 1         |
| 1.2. Objetivo general.....  | 1         |
| 1.3. Objetivos específicos.....   | 2         |
| 1.4. Justificación.....   | 2         |
| Referencias Bibliográficas.....   | 4         |
| <b>CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO.....</b>   | <b>7</b>  |
| 2.1. Cáncer Cervical.....   | 7         |
| <i>El cáncer de cérvix y su agente causal - el Virus Papiloma Humano.....</i> | <i>7</i>  |
| 2.2. El Virus Papiloma Humano.....  | 9         |
| <i>Taxonomía.....</i>   | <i>9</i>  |
| 2.3. Virus Papiloma Humano tipo 16.....                                       | 12        |
| <i>Variantes virales.....</i>   | <i>12</i> |
| <i>Estructura del genoma viral.....</i>                                       | <i>13</i> |
| 2.4. Oncongen E6.....   | 14        |
| 2.5. Oncongen E7.....   | 16        |
| 2.6. Gen de la proteína de la cápside L1.....                                 | 17        |
| Referencias Bibliográficas.....   | 19        |
| <b>CAPITULO 3. METODOLOGÍA.....</b>   | <b>25</b> |
| 3.1. Definición operacional de las variables y categorías.....                | 25        |
| 3.2. Descripción del ámbito de estudio.....                                   | 25        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3. Tipo de estudio y diseño .....                                 | 25        |
| 3.4. Población.....   | 25        |
| <i>Universo o Población objetivo</i> .....                          | 25        |
| <i>Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión</i> ..... | 25        |
| <i>Población accesible: Selección y tamaño de la muestra</i> .....  | 25        |
| 3.5. Consideraciones éticas.....                                    | 25        |
| 3.6. Genotipificación de VPH .....                                  | 25        |
| <i>Muestras Biológicas</i> .....                                    | 26        |
| <i>Extracción de ADN</i> .....                                      | 26        |
| <i>Control de calidad genómico</i> .....                            | 27        |
| <i>Detección molecular de VPH</i> .....                             | 27        |
| <i>Tipificación viral</i> .....                                     | 27        |
| 3.7. Caracterización genética de VPH16.....                         | 27        |
| <i>Variantes de VPH16</i> .....                                     | 27        |
| <i>Caracterización genética de los genes E6, E7 y L1</i> .....      | 27        |
| 3.8. Plan de análisis de los resultados. ....                       | 28        |
| <i>Análisis de Secuencias</i> .....                                 | 28        |
| <i>Análisis Filogenético</i> .....                                  | 28        |
| <i>Datación Molecular</i> .....                                     | 28        |
| <i>Estadística descriptiva</i> .....                                | 29        |
| <i>Estadística Analítica</i> .....                                  | 29        |
| <i>Estudios de Asociación</i> .....                                 | 29        |
| 3.9. Análisis de Proteínas .....                                    | 29        |
| <i>Modelado proteico</i> .....                                      | 30        |
| Referencias Bibliográficas .....                                    | 31        |
| <b>CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....                     | <b>33</b> |
| 4.1. Caracterización de la muestra analizada. ....                  | 33        |
| <i>Estudio Descriptivo</i> .....                                    | 33        |

|  |    |
|--|----|
| <i>Caracterización de los genes E6, E7, L1 y LCR viral</i> .....               | 33 |
| 4.2. Caracterización genética de las variantes de VPH16 .....                  | 35 |
| <i>Linajes de VPH16 y Análisis Filogenético</i> .....                          | 35 |
| <i>Oncogen E6</i> .....  | 39 |
| <i>Oncogen E7</i> .....  | 42 |
| <i>Gen L1</i> .....  | 43 |
| 4.3. Implicancia clínica de las variantes de VPH16 .....                       | 46 |
| <i>Linajes de VPH16</i> .....  | 46 |
| <i>Oncogen E6</i> .....  | 47 |
| <i>Gen L1</i> .....  | 49 |
| 4.4. Caracterización de la estructura de las proteínas E6, E7 y L1 .....       | 50 |
| <i>Proteína E6</i> .....   | 50 |
| <i>Proteína E7</i> .....   | 53 |
| <i>Proteína L1</i> .....   | 55 |
| Referencias Bibliográficas .....   | 60 |
| <b>CAPITULO 5: CONCLUSIONES</b> .....  | 67 |
| Recomendaciones Para Trabajos Futuros.....                                     | 68 |
| Producción Científica .....  | 69 |
| Proyecto/s de Investigación dentro del/los Cual/Es de desarrolló la Tesis..... | 71 |
| Beca/s y Subsidio/s con los que se financió la Tesis .....                     | 71 |
| ANEXO 1. Consentimiento Informado .....  | 73 |
| ANEXO 2. PCR-VPH16 Región LCR .....  | 75 |
| ANEXO 3. PCR-HPV16 Región E6/E7 .....  | 76 |
| ANEXO 4. PCR-VPH16 Región L1 .....   | 77 |
| ANEXO 5. Templado Para Modelado Proteico .....                                 | 78 |
| ANEXO 6. Códigos de secuencias y números de accesos de GenBank.....            | 79 |
| ANEXO 7. Variación de Secuencia Nucleotídica de L1, E6 y E7 .....              | 80 |
| ANEXO 8. Comparación de las Secuencias Proteicas .....                         | 82 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 2.1. Clasificación taxonómica de los VPH del género <i>Alpha Papillomavirus</i> .....   | 11 |
| Tabla 2.2. Resumen de la función de las proteínas virales.....  | 14 |
| Tabla 4.1. Características de la población seleccionada.....  | 33 |
| Tabla 4.2. Resumen de las muestras procesadas y las secuencias obtenidas para los genes L1, E6 y E7.....  | 34 |
| Tabla 4.3. Resumen de la variabilidad en la secuencia de nucleótidos de la Región Larga de Control (LCR) del Virus Papiloma Humano tipo 16 (VPH16) de pacientes de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina..... | 36 |
| Tabla 4.4: Caracterización genética del gen E6 y la secuencia proteica del mismo en muestras de cuello uterino de Misiones.....   | 39 |
| Tabla 4.5. Caracterización genética del gen E7 y la secuencia proteica del mismo en muestras de cuello uterino de Misiones.....   | 42 |
| Tabla 4.6. Caracterización genética del gen L1 y se secuencia proteica en muestras de cuello uterino de Misiones.....   | 44 |
| Tabla 4.7. Distribución de variantes de acuerdo al diagnóstico de Pap y cálculo de razón de probabilidades (RP).....  | 46 |
| Tabla 4.8. Análisis de asociación entre el SNP E6 350G y las lesiones cervicales.....   | 48 |
| Tabla 4.9. Análisis de asociación entre el SNP L1 6434G y lesiones cervicales.....  | 50 |
| Tabla 4.10. Variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 del VPH16.....   | 51 |
| Tabla 4.11. Residuos conservados de la familia de proteínas.....  | 51 |
| Tabla 4.12. Variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína E7 del VPH16.....   | 53 |
| Tabla 4.13. Residuos conservados de la familia de proteínas E7.....   | 54 |
| Tabla 4.14. Variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína L1 del VPH16.....   | 55 |
| Tabla 4.15. Residuos conservados de la familia de proteínas L1.....   | 56 |
| Tabla Anexo 5. Secuencia de aminoácidos utilizada como templatado para obtener las estructuras terciarias de las proteínas L1, E6 y E7.....   | 78 |

---

|  |    |
|--|----|
| Tabla Anexo 6. Códigos de secuencias y números de acceso a GenBank de las regiones LCR y E6/E7.....  | 79 |
| Tabla Anexo 7. Resumen de la variación en la secuencia de nucleótidos empalmadas de los genes L1, E6 y E7 del Virus Papiloma Humano tipo 16 (VPH16) en pacientes de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina..... | 80 |
| Tabla Anexo 8. Comparación de las diferentes secuencias proteicas de la población de estudio con la base de datos NCBI .....   | 82 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1. Esquema del ciclo celular del VPH.....  | 9  |
| Figura 2.2. Mapa del Genoma viral.....  | 13 |
| Figura 2.3. Interacción entra la proteína viral E6 y la proteína celular p53.....   | 15 |
| Figura 2.4. Interacción entra la proteína viral E7 y la proteína celular pRb.....   | 17 |
| Figura 4.1. Análisis filogenético y datación molecular de las variantes de VPH16.....   | 38 |
| Figura 4.2. Relaciones evolutivas de los aislados del oncogen E6 del VPH16 de Misiones...   | 41 |
| Figura 4.3. Estructura esquemática de un modelo por homología de la proteína E6 del<br>VPH16.....                                     | 52 |
| Figura 4.4. Estructura esquemática de un modelo por homología del complejo ternario<br>VPH16 E6/E6AP/p53.....                         | 52 |
| Figura 4.5. Estructura esquemática de un modelo por homología del dímero VPH16 E7.....  | 54 |
| Figura 4.6. Estructura esquemática de un modelo por homología de la proteína L1 VPH16...  | 57 |
| Figura 4.7. Estructura esquemática de un modelo por homología de los pentámeros<br>de proteína L1 del VPH16 en vista superficial..... | 58 |
| Figura Anexo 2. Amplificación de la región LCR del VPH16.....   | 75 |
| Figura Anexo 3. Amplificación de la región E6/E7 del VPH16.....   | 76 |
| Figura Anexo 4. Amplificación de la región L1 del VPH 16.....   | 77 |
| Figura Anexo 7. Análisis Filogenético de <i>Neighbor Joining</i> de la región L1.....   | 81 |



## Lista de abreviaturas y acrónimos

|         |   |
|---------|---|
| Å       | Amstrongs.  |
| A.C.    | Antes de Cristo.  |
| aa      | Aminoácido.   |
| ADN     | Ácido Desoxirribonucleico.  |
| AKT     | <i>Protein Kinase B.</i>  |
| ANMAT   | Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. |
| ATP     | <i>Adenosine Triphosphate.</i>  |
| CC      | Cáncer cervical.  |
| CCI     | Carcinoma de Cuello Invasor.  |
| CDK     | <i>Cyclin-Dependent kinases.</i>  |
| CIS     | Carcinoma <i>in situ</i> .  |
| CR      | <i>Conserved Region.</i>  |
| E2F     | Factor de Transcripción.  |
| E6      | Oncoproteína viral E6.  |
| E6AP    | <i>E6-Associated Protein.</i>   |
| E7      | Oncoproteína viral E7.  |
| ESS     | <i>Effective Sample Sizes.</i>  |
| Fw      | <i>Forward</i> (cebador de sentido 5´-3´).                              |
| HDAC    | <i>Histone Deacetylases.</i>  |
| HLA     | <i>Human Leukocyte Antigen.</i>   |
| HPD95 % | <i>Highest Posterior Density 95 %.</i>                                  |
| HS      | Heparán sulfato.  |
| HSIL    | Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.                           |
| hTERT   | Telomerasa Transcriptasa Inversa.                                       |
| IC95 %  | Intervalo de Confianza del 95 %.  |

|            |  |
|------------|--|
| INDEC      | Instituto Nacional de Estadística y Censos.                |
| KDa        | Kilo Dalton.   |
| L1         | Proteína de la cápside viral.                              |
| LCR        | Región larga de control ( <i>Long Control Region</i> ).    |
| LSIL       | Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.              |
| MAPK       | <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> .                  |
| MCCT       | <i>Maximum Clade Credibility Tree</i> .                    |
| MCMC       | <i>Monte Carlo Markov Chains</i> .                         |
| MHC        | <i>Major Histocompatibility Complex</i> .                  |
| ML         | <i>Maximum Likelihood</i> .                                |
| NILM       | <i>Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy</i> . |
| NJ         | <i>Neighbor Joining</i> .                                  |
| NLIM       | Negativa para lesión intraepitelial o malignidad.          |
| OMS        | Organización Mundial de la Salud.                          |
| OPS        | Organización Panamericana de la Salud.                     |
| OR         | <i>Odds Ratio</i> .  |
| ORF        | Marco de Lectura Abierta ( <i>Open Reading Frame</i> ).    |
| Pap        | Papanicolau.   |
| pb         | Pares de Bases.  |
| PBS        | <i>Phosphate Buffered Saline</i> .                         |
| PCR        | <i>Polymerase Chain Reaction</i> .                         |
| PCR-E6NMPX | <i>PCR-E6-Nested-Multiplex</i> .                           |
| PI3K       | <i>Phosphoinositide-3-Kinase</i> .                         |
| QC         | <i>Query Cover</i> .                                       |
| RP         | Razón de Probabilidad.                                     |
| Rv         | <i>Reverse</i> (cebador de antisentido 5´-3´).             |
| SNP        | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> .                    |
| $t_{MRCA}$ | <i>Dating of Most Recent Common Ancestor</i> .             |

---

|        |  |
|--------|--|
| UCLN   | <i>Uncorrelated Lognormal.</i>   |
| UNESCO | <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.</i> |
| VLP    | <i>Virus Like Particles.</i>   |
| VP     | Virus del Papiloma.  |
| VPH    | Virus del Papiloma Humano.   |
| VPH16  | Virus del Papiloma Humano tipo 16.                                       |
| LCR    | <i>Long Control Region.</i>  |

# INTRODUCCIÓN



*Prevenir, curar, florecer*

*Diseño: Feder*

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo, y el segundo más frecuente en mujeres de 15 a 44 años. Actualmente, la tasa de mortalidad por cáncer cervical es sustancialmente más baja que la incidencia, con una relación entre mortalidad e incidencia del 57 % [1]. Las regiones con países en vías de desarrollo como América Latina tienen una alta incidencia de cáncer cervical, donde los programas de tamizaje y control no han tenido un gran impacto en la disminución de esta neoplasia [2, 3].

El descubrimiento de la asociación etiológica del Virus Papiloma Humano (VPH) y el cáncer de cuello de útero ha aportado nuevos elementos para el conocimiento de la biología de este cáncer, el diagnóstico temprano y más recientemente el desarrollo de vacunas [4, 5]. La incidencia mundial de mujeres infectadas con VPH es de 300 millones de casos [6]; sin embargo, sólo una pequeña fracción de las infecciones (10 en 100.000, en promedio) llega a desarrollar cáncer. En este sentido, los factores genéticos virales y del huésped parecen jugar un rol clave en el proceso oncogénico [7, 8].

El Virus Papiloma Humano tipo 16 (VPH16) es uno de los principales responsables del desarrollo de cáncer de cuello uterino. Este tipo viral se encuentra en el tracto genital del 3 % de la población femenina asintomática y el 54 % de los carcinomas a nivel mundial, con un valor estimado de riesgo entre la infección y el desarrollo de cáncer mayor a 400 [1, 9]. Desde el punto de vista clínico, existe una potencial relación entre variantes específicas de VPH16 y la agresividad del cáncer (inicio, progresión y pronóstico). Esta situación fundamenta los estudios de genética viral.

### 1.1. Hipótesis

El desarrollo del cáncer de cuello de útero responde a un modelo multifactorial que involucra la interacción de factores genéticos humanos y virales. En este contexto, la caracterización de variantes genéticas de VPH16 en los genes virales L1 (epítotope antigénico), E6 y E7 (oncogenes) permitirá identificar factores de riesgo involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.

### 1.2. Objetivo general

Identificar y caracterizar marcadores genéticos virales involucrados en el desarrollo de lesiones precursoras (LSIL, HSIL) y cáncer de cuello de útero (*in situ* e invasor) en mujeres residentes en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones.

### 1.3. Objetivos específicos

- ✦ Determinar la prevalencia general de variantes de VPH16 en una muestra de mujeres residentes de la ciudad de Posadas con y sin lesiones de cuello uterino.
- ✦ Analizar la secuencia de los genes E6, E7 y L1 de los VPH16 detectados.
- ✦ Evaluar la existencia de asociación entre los marcadores genéticos analizados (variabilidad de E6/E7 y L1) y los diferentes grados de lesión de cuello uterino.
- ✦ Identificar cambios aminoacídicos asociados a estas proteínas y modelar las estructuras proteicas de las secuencias obtenidas de los genes E6, E7 y L1.

### 1.4. Justificación

El desarrollo del cáncer responde a un modelo multifactorial que involucra la interacción de factores ambientales, predisposición genética del paciente y en algunos casos infecciones por virus. Dado que el estudio de estas múltiples variables es complejo, resulta fundamental poder identificar marcadores pronósticos que permitan definir subgrupos de alto riesgo [10, 11]. De particular interés, es el problema en el manejo médico de las pacientes con lesiones de bajo grado (LSIL). Se estima que más del 60 % de estas lesiones, aún infectadas con VPH de alto riesgo, revierten (o retrotraen) a la normalidad espontáneamente en un promedio de 9 meses, alrededor del 30 % persisten y cerca del 10 % progresan a lesiones de alto grado (HSIL) y carcinoma. No es posible conocer en base a criterios morfológicos en estudios citológicos e histológicos cuál será el curso de su evolución, por lo que la identificación de factores genéticos virales y del huésped relacionados con la distinta susceptibilidad del hospedador a la infección y desarrollo de lesiones, permitiría establecer estrategias para la caracterización, control y seguimiento de pacientes de alto riesgo de evolución maligna [2, 12].

La provincia de Misiones posee una de las tasas de mortalidad por cáncer de cuello uterino más altas del país [13, 14, 15]. Estadísticas regionales de nuestro grupo han establecido prevalencias tipo-específicas para VPH16 del 51 % de los casos de cánceres cervicales en la ciudad de Posadas [16, 17]. Con respecto a la variabilidad del VPH16, resultados preliminares de nuestro grupo indican una alta prevalencia de variantes de origen europeo (80 %) en la población urbana de la ciudad de Posadas y en comunidades indígenas guaraníes residentes del centro y norte de la provincia. Este patrón ha sido interpretado como una fuerte irrupción del virus durante la colonización española [16, 15]. Desde un punto de vista clínico, la infección por VPH16 de linajes no europeos, (linajes B, C y D) conllevan un mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras y cáncer cervical [18, 19, 20]. Estas diferencias podrían deberse a cambios nucleotídicos en los genes virales que codifican

proteínas y a la LCR viral (secuencia genómica viral asociada a la replicación y control de la transcripción), pero los polimorfismos candidatos dentro del linaje aún no han sido identificados. En este contexto, nos interesa profundizar sobre la variabilidad asociada a tres genes virales de importancia clínica de VPH16: los genes L1, E6 y E7.

Metodológicamente, se realizó la amplificación y secuenciación de los genes E6, E7 y L1, en muestras infectadas por VPH16 con y sin lesiones (diseño epidemiológico de casos y controles). Este tamizado primario permitió realizar estudios de asociación entre variantes y desarrollo de cáncer de cuello de útero.

En este trabajo se ha propuesto a la genómica viral como un nuevo enfoque para abordar el estudio de la variabilidad del VPH16 y su rol en el desarrollo del cáncer cervical, lo que posibilitará la identificación de factores regionales de riesgo. Su implementación permitirá establecer estrategias para la caracterización, control, seguimiento y terapéutica de pacientes con lesiones de alto riesgo de evolución maligna. Cabe destacar que no existen estudios de este perfil en la provincia de Misiones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] WHO/ICO, «Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Argentina,» 22 Octubre 2021. [En línea]. Available: <https://hpcvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf?t=1637264808930>. [Último acceso: Noviembre 2021].
- [2] L. Sichero, M. Picconi and L. Villa, "The contribution of Latin American research to HPV epidemiology and natural history knowledge," *Braz J Med Biol Res*, vol. 53, no. 2, pp. 1-10, 2020.
- [3] S. Arrossi, R. Sankaranarayanan y D. Parkin, «Incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino en América Latina.,» de *Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control*, 2da ed., P. Alonso de Ruiz, E. Lazcano Ponce y M. Hernández, Edits., México, Editorial Médica Panamericana, 2005, pp. 179-188.
- [4] D. Harper, E. Franco, C. Wheeler, D. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N. De Carvalho, C. Roteli-Martins, J. Teixeira, M. Blatter, A. Korn, W. Quint, G. Dubin y G. H. V. StudyGroup, «Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial,» *Lancet*, vol. 364, nº 9447, pp. 1757-65, Nov 2004.
- [5] H. zur Hausen, «Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.,» *Virology*, vol. 384, pp. 260-265, 2009.
- [6] S. de Sanjosé, M. Diaz, X. Castellsagué, G. Clifford, L. Bruni, N. Muñoz y F. Bosch, «Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.,» *Lancet Infect Dis.*, vol. 7, nº 7, pp. 453-9, Jul 2007.
- [7] E. Calhoun, R. McGovern, C. Janney, J. Cerhan, S. Iturria, D. Smith, B. Gostout y D. Persing, «Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer.,» *Clin Chem.*, vol. 48, nº 8, pp. 1218-24, Aug 2002.
- [8] A. Hildesheim, M. Schiffman, C. Bromley, S. Wacholder, R. Herrero, A. Rodriguez, M. Bratti, M. Sherman, U. Scarpidis, Q. Lin, M. Terai, R. Bromley, K. Buetow, R. Apple y R. Burk, «Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer.,» *J Natl Cancer Inst.*, vol. 93, nº 4, pp. 315-8, Feb 2001.
- [9] N. Muñoz, F. Bosch, S. De, R. Herrero, X. Castellsague, K. Shah, P. Snijders y C. Meijer, «Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer,» *N Engl J Med*, vol. 348, pp. 518-527, 2003.



- [10] P. Holowaty, A. Miller, T. Rohan y T. To, «RESPONSE: re: natural history of dysplasia of the uterine cervix.,» *J Natl Cancer Inst.*, vol. 91, nº 16, pp. 1420A-1421, 18 Aug 1999.
- [11] L. Le Marchand, «The predominance of the environment over genes in cancer causation: implications for genetic epidemiology.,» *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* , vol. 14, nº 5, pp. 1037-9, May 2005.
- [12] Y. Woo, M. van den Hende, J. Sterling, N. Coleman, R. Crawford, K. Kwappenberg, M. Stanley y S. van der Burg, «A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses.,» *Int J Cancer*, nº 1126, pp. 133-41, 1 Jan 2010 .
- [13] E. Matos, D. Loria, G. Amestoy, L. Herrera, M. Prince, J. Moreno, C. Krunfly, A. Van Den Brule, C. Meijer, N. Muñoz, R. Herrero y P. C. C. Group, «Prevalence of Human Papillomavirus Infection Among Women in Concordia, Argentina: A Population-Based Study.,» *Sexually Transmitted Diseases*, vol. 30, nº 8, pp. 593-599, August 2003.
- [14] S. Tonon, M. Picconi, J. Zinovich, D. Liotta, P. Bos, J. Galuppo, L. Alonio, J. Ferreras y A. Teyssié, «Human papillomavirus cervical infection and associated risk factors in a region of Argentina with a high incidence of cervical carcinoma.,» *Infect Dis Obstet Gynecol*, vol. 7, nº 5, pp. 237-43, 1999.
- [15] S. Tonon, J. Basiletti, I. Badano, L. Alonio, L. Villa, A. Teyssie y M. Picconi, «Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina.,» *Int J Infect Dis.*, vol. 11, nº 1, pp. 76-81, Jan 2007.
- [16] I. Badano, R. Pedrozo, L. Ruiz Diaz, J. Galuppo, M. Picconi, R. Campos y D. Liotta, «Human papillomavirus (HPV) detection and Papanicolaou cytology in low-resource women in Posadas city, Misiones, Argentina.,» *Rev Argent Microbiol*, vol. 43, nº 4, pp. 263-7, Oct-Dec 2011.
- [17] I. Badano, S. Stietz, T. Schurr, A. Picconi, D. Fekete, I. Quintero, M. Cabrera, R. Campos y J. Liotta, «Analysis of TNF $\alpha$  promoter SNPs and the risk of cervical cancer in urban populations of Posadas (Misiones, Argentina).,» *J Clin Virol.*, vol. 53, nº 1, pp. 54-9, Jan 2012.
- [18] R. Burk, A. Harari y Z. Chen, «Human papillomavirus genome variants.,» *Virology*, vol. 445, nº 1-2, pp. 232-43, Oct 2013 .
- [19] J. Hochmann, J. Sobrinho, L. Villa y L. Sichero, «The Asian-American variant of human papillomavirus type 16 exhibits higher activation of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, transformation, migration and invasion of primary human keratinocytes.,» *Virology*, vol. 492, pp. 145-54., May 2016 .

- [20] M. Martinelli, C. Villa, G. Sotgiu, N. Muresu, F. Perdoni, R. Musumeci, R. Combi, A. Cossu, A. Piana y C. Cocuzza, «Analysis of Human Papillomavirus (HPV) 16 Variants Associated with Cervical Infection in Italian Women.,» Int J Environ Res Public Health, vol. 17, nº 1, p. 306, Jan 2020.

# MARCO TEÓRICO



## CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Cáncer Cervical

El cáncer de cuello de útero es el tercero más frecuente en mujeres en el mundo con una incidencia anual de 604.127 casos nuevos y 341.831 defunciones en 2020 [1]. Aproximadamente el 80 % de casos ocurren en países en vías de desarrollo; por ejemplo en América Latina, factores como una asignación desigual de recursos económicos, una infraestructura y disponibilidad variable a servicios de salud, un número limitado de registros de cánceres basados en la población y una distribución asimétrica de los centros de salud pública, dan como resultado un escenario de desigualdad en la atención brindada a las personas afectadas por el cáncer cervical y actúan como barreras en la prevención del mismo [2]. En Argentina, cada año se diagnostican alrededor de 4.583 casos nuevos y aproximadamente 2.553 mueren a causa de la enfermedad; esta neoplasia se ubica como el tercer cáncer más frecuente en mujeres de todas las edades y el segundo más frecuente en mujeres de 15 a 44 años; además entre éstas últimas el cáncer de cuello de útero se constituye en la primera causa de muerte por cáncer [1]. Las tres provincias con mayor tasa de mortalidad son Salta (15,8/100.000), Formosa (15,6/100.000) y Misiones (15,5/100.000), mientras que la tasa media para la Argentina ha sido establecida en 7,1/100.000. Dado que la mayor tasa de incidencia ocurre entre los 35 a 55 años de edad, la enfermedad tiene un impacto social significativo afectando en particular al núcleo familiar [3].

#### ***Citopatología de las lesiones cervicales***

Las lesiones escamosas intraepiteliales conforman un espectro de anormalidades que se consideran precursoras del cáncer cervical, y se caracterizan por una proliferación de células anormales, con pérdida de la polaridad celular y de la maduración citoplasmática. El sitio de origen de las lesiones es predominantemente el labio interior del cérvix (epitelio de la zona de transformación y epitelio endocervical de la unión) [4].

En 2001 se desarrolló el Sistema Bethesda para unificar el reporte de resultados de la citología cervical: a) Negativo para Lesión Intraepitelial Maligna (NLIM), b) Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo grado (LSIL por *Low grade Squamous Intraepithelial Lesion*), c) Lesión Intraepitelial de Alto grado (HSIL por *High grade Squamous Intraepithelial Lesion*), d) Carcinoma *in situ* (CIS), y e) Carcinoma de cuello uterino invasor (CCI) [5].

#### ***El cáncer de cérvix y su agente causal - el Virus Papiloma Humano***

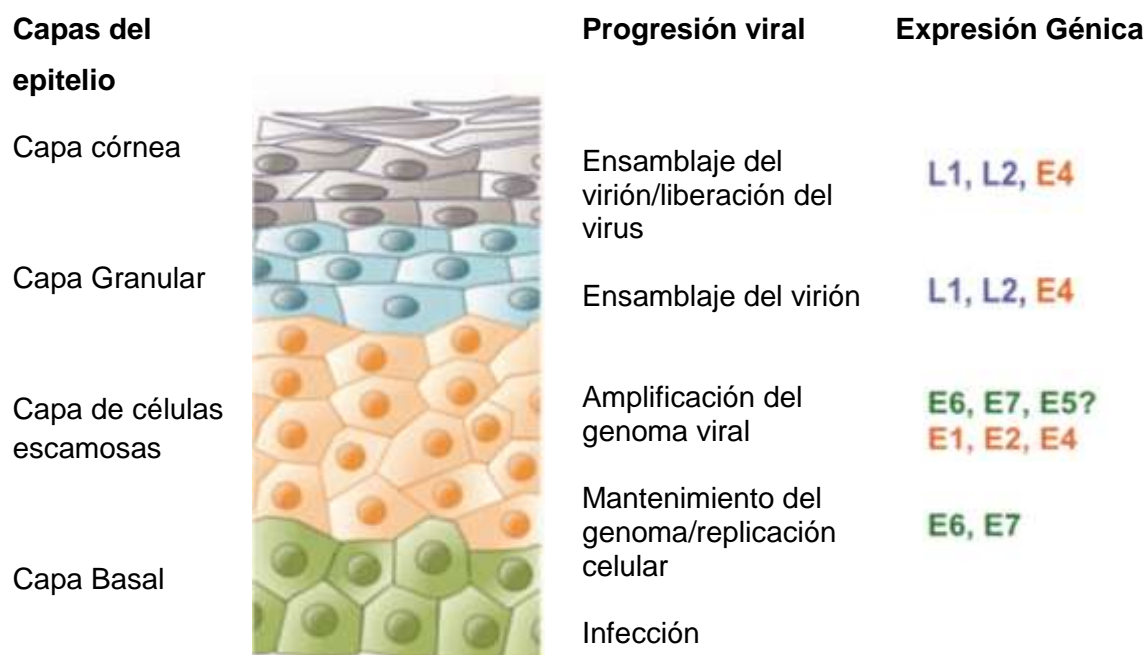
El cáncer cervical es una secuela a largo plazo de la infección persistente por algunos tipos de VPH, hecho que ha sido demostrado mediante la evidencia científica acumulada de

estudios epidemiológicos, clínicos, virológicos y moleculares [6]. Las partículas virales de VPH fueron identificadas por primera vez en 1949 y en 1965 se describió su genoma de ADN circular de doble cadena. En la década del 70 se vislumbró la heterogeneidad de los VPH y la relación de estos virus con el cáncer cervical se confirmó en la década de los 80. En la actualidad hay evidencia adicional que demuestra la asociación del VPH con los cánceres anogenitales (ano, vulva, vagina y pene), y de cuello y cabeza [7].

El VPH se considera el agente causal para el carcinoma de cuello uterino, siendo el mismo un factor necesario, pero no suficiente, dado que la manifestación clínica de la infección y la progresión hacia la malignidad dependerá también de múltiples factores incluyendo el genotipo viral, el genotipo del hospedador y factores socio-económicos [4]. La infección cervical por VPH depende de la edad y existe una relación inversa entre la edad y la prevalencia del VPH; La prevalencia es mayor por debajo de los 25 años (poco después de la iniciación sexual para la mayoría de las mujeres) y disminuye con la edad. Existe un segundo pico de infección por VPH entre mujeres mayores, que podría atribuirse posiblemente a cambios hormonales que preceden a la menopausia, un mayor número de parejas sexuales vinculado a un cambio del estado civil, o incluso tasas más altas de persistencia del VPH en edades más avanzadas [2].

La infección por VPH es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente, aunque el sistema inmunológico de la mayoría de las pacientes elimina la evidencia del virus sin desarrollar manifestaciones clínicas [8, 9]. El ciclo de multiplicación viral del VPH está íntimamente ligado al programa de diferenciación de las células en el tejido epitelial escamoso estratificado [10]. El virus infecta inicialmente las células basales inmaduras del epitelio a través de micro-abrasiones de los estratos epiteliales superiores y el genoma viral desnudo se incorpora dentro del núcleo cuando se completa un ciclo mitótico. En las lesiones invasoras el ADN viral está integrado en los cromosomas del huésped, a diferencia de las lesiones de bajo grado donde se encuentra en estado episomal [11]. La replicación viral está controlada por los mecanismos celulares y ocurre en sincronía con la replicación celular (**Figura 2.1.**). En este estadio hay pocas copias del genoma viral y sus proteínas se expresan a niveles muy bajos, motivo por el cual las células del epitelio no muestran cambios citológicos o histológicos detectables (estadio latente o subclínico). A medida que las células epiteliales infectadas se van diferenciando, la maquinaria de replicación del ADN se inactiva como consecuencia de apoptosis celular programada. En este contexto, el virus necesita reactivar el mecanismo de replicación de ADN al efecto de producir partículas virales, situación que resuelve aumentando la transcripción de genes virales que producen proteínas reguladoras de la replicación y aquellas que desregulan el control del ciclo celular, de manera de promover la hiperproliferación y en última instancia evitar la apoptosis. Como consecuencia del ciclo

celular desregulado, las células hospedadoras acumulan mutaciones, predisponiéndolas a desarrollar cáncer [9, 10, 12].



**Figura 2.1. Esquema del ciclo celular del VPH.** (Adaptado de Bravo y Feléz-Sanchez, 2015) [12].

## 2.2. El Virus Papiloma Humano

Los virus del género Papilloma (VP) son muy diversos y se encuentran presentes en una gran variedad de huéspedes: reptiles, aves, marsupiales y mamíferos, incluyendo al hombre, siendo denominado en este último hospedador Virus del Papiloma Humano (VPH) [13, 14].

Este grupo de virus son epiteliotropos que infectan la epidermis de la piel y las mucosas. Los papilomavirus son pequeños, su genoma es una molécula de ADN circular de doble cadena de unos 8000 pares de bases (pb) y poseen una cápside icosaédrica de 72 capsómeros [4].

### **Taxonomía**

El **Virus del Papiloma Humano** pertenece a la familia *Papillomaviridae*. El criterio de clasificación de estos virus se basa en la similitud de secuencia de sus genomas, en donde los géneros comparten menos del 60 % de identidad de secuencia y las especies entre 60 % y 70 % [14]. En 2004 se clasificaron los VP en 16 géneros designados con el alfabeto griego desde la letra alfa a pi; los VPH pertenecen a cinco géneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Mu-* y

*Nu-papillomavirus* [15]. El género más importante desde el punto de vista clínico es *Alphapapillomavirus*, el cual incluye al VPH tipo 16 (**Tabla 2.1.**). Se establece un nuevo tipo viral cuando la secuencia de L1 difiere en más de un 10 % con el genoma de los tipos cercanos conocidos. Por debajo del nivel de tipo, los VPH se clasifican en subtipos con diferencias de homología entre un 2 a 10 % y en variantes virales aquellos genomas que difieren por lo menos en un nucleótido (y hasta un 2 %) respecto del prototipo [13, 14].

**Tabla 2.1. Clasificación taxonómica de los VPH del género *Alpha-papillomavirus*.**

| Género       | Sp. | VPH "Tipo" | Otros tipos  | Tropismo y riesgo  |
|--------------|-----|------------|--|--|
| <i>Alpha</i> | 1   | VPH32      | VPH42  | Mucosotrópicos de bajo riesgo.   |
|              | 2   | VPH10      | VPH3, VPH28, VPH29, VPH78, VPH94, VPH117                               | Cutaneotrópicos, pero también pueden encontrarse en las mucosas, de bajo riesgo. |
|              | 3   | VPH61      | VPH72, VPH81, VPH83, VPH84, VPH62, VPH86, VPH87, VPH89, VPH102, VPH114 | Mucosotrópicos de bajo riesgo.   |
|              | 4   | VPH2       | VPH27, VPH57   | Cutaneotrópicos de bajo riesgo.  |
|              | 5   | VPH26      | VPH51, VPH69, VPH82  | Mucosotrópicos de alto riesgo, pero también en lesiones benignas.                |
|              | 6   | VPH53      | VPH30, VPH56, VPH66  | Mucosotrópicos de alto riesgo, pero también en lesiones benignas.                |
|              | 7   | VPH18      | VPH39, VPH45, VPH59, VPH68, VPH70, VPH85, VPH97                        | Mucosotrópicos de alto riesgo.   |
|              | 8   | VPH7       | VPH40, VPH43, VPH91  | Se pueden encontrar en la piel y las mucosas, de bajo riesgo.                    |
|              | 9   | VPH16      | VPH31, VPH33, VPH35, VPH52, VPH58, VPH67                               | Lesiones malignas de las mucosas, de alto riesgo                                 |
|              | 10  | VPH6       | VPH11, VPH13, VPH44, VPH74,  | Mucosotrópicos de bajo riesgo.   |
|              | 11  | VPH34      | VPH73  | Mucosotrópicos de alto riesgo.   |
|              | 13  | VPH54      |  | Mucosotrópicos de bajo riesgo.   |
|              | 14  | VPH90      | VPH106   | Mucosotrópicos de bajo riesgo.   |
|              | 15  | VPH71      |  | Mucosotrópicos de bajo riesgo.   |

Adaptado de de Villiers *et al.* 2004 [14]



### 2.3. Virus Papiloma Humano tipo 16

El VPH16 se encuentra en el tracto genital del 30 % de la población femenina asintomática y en los carcinomas en el 54 % a nivel mundial y en el 61 % en Argentina [2, 1]. La asociación de la infección por HPV16 y el desarrollo de cáncer cervical ha sido confirmada en varios estudios con una razón de probabilidades (RP) que oscila entre 5,3 (1,8-15,8) y 24,2 (9,3-62,7) [16, 17]. Desde la década de los 90, los estudios de variabilidad genética sobre diferentes regiones del genoma de VPH16 (<1500 pb) han posibilitado el desarrollo de herramientas diagnósticas eficientes y vacunas, la definición de marcadores genéticos virales para el monitoreo de la infección en poblaciones definidas y estudios evolutivos y taxonómicos [6, 14, 18, 19, 20]. El VPH16 es considerado uno de los tipos de alto riesgo más patogénico y clínicamente importante, por lo que se ha estudiado exhaustivamente a nivel de genoma completo, permitiendo una discriminación mucho más precisa en su clasificación taxonómica [13, 21].

#### ***Variantes virales***

Los VPH16 se clasifican de acuerdo a la similitud de su secuencia de ADN en “variantes virales”, las cuales han evolucionado a partir de un ancestro común, probablemente originado en África, hace más de 200.000 años. Estas variantes se clasifican en linajes cuando sus genomas completos difieren entre un 1-10 % y en sublinajes entre 0,5-1 %. Estas variantes se denominan de acuerdo a su origen geográfico y sus relaciones filogenéticas como Linaje A (europeas y asiáticas) Linajes B y C (africanas) y Linaje D (asiático-americanas); una observación interesante es el contraste entre la relativa homogeneidad del linaje A (europeo) en comparación con la heterogeneidad en los linajes "no europeos" (linajes B/C/D) [2, 13, 22].

Además de las diferencias entre variantes de los principales linajes, se han identificado hasta la fecha 16 sublinajes, el linaje A abarca 4 sublinajes: A1-3 (donde se incluyen todas las secuencias europeas) y A4 (secuencias asiáticas); los linajes B (africanos 1) y C (africanos 2) incluyen 4 sublinajes cada uno (B1-4 y C1-4, respectivamente) y el linaje D incluye 4 sublinajes: D1 (norteamericano), D2 y D3 (asiático-americano) y D4 [13, 21].

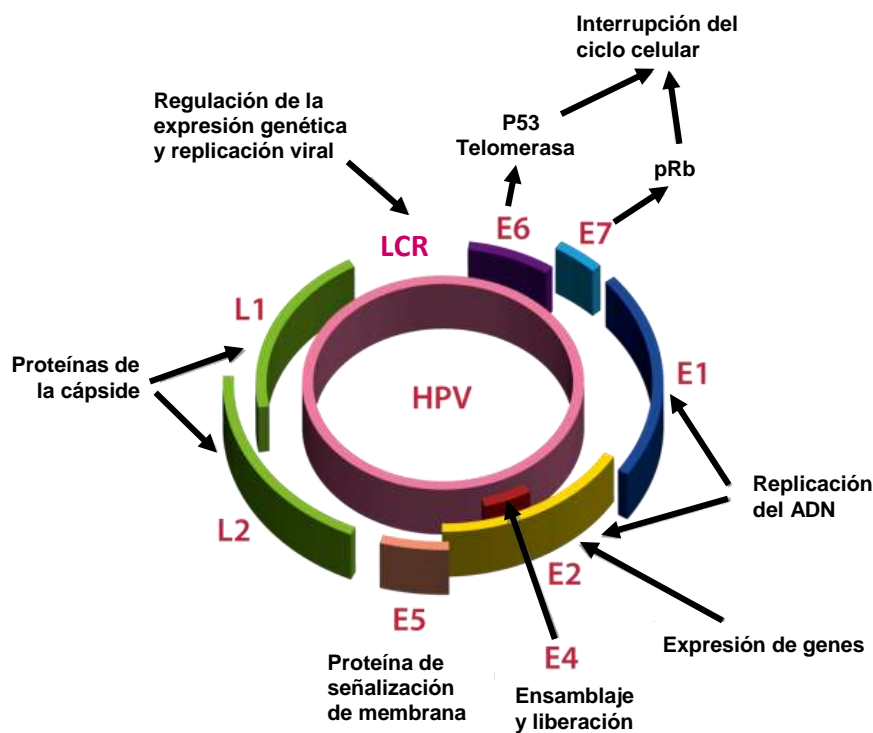
Con respecto a la importancia clínica de estos sublinajes, los estudios de asociación a nivel mundial indican que, en comunidades multiétnicas como las latinoamericanas, las variantes pertenecientes a los linajes "no europeos" son más agresivas que las pertenecientes a linajes europeos en su relación con la progresión hacia el carcinoma de cuello uterino [23, 24, 25, 26, 27, 28, 13]. Sin embargo, esta hipótesis es aún motivo de controversia [29, 30].

### Estructura del genoma viral

El genoma del VPH16 consiste en una doble cadena de ADN circular, de las cuales solo una cadena es transcripcionalmente activa y se divide en ocho marcos de lectura abierta (ORF) y 3 regiones:

1. Región temprana o E (*Early*) de aproximadamente 4.000 pb, que codifica 6 proteínas no estructurales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7);
2. Región tardía o L (*Late*) de aprox. 3.000 pb que codifica dos proteínas que al autoensamblarse forman la cápside viral (L1 y L2);
3. Región larga de control o LCR (Long Control Region) no codificante de 1.000 pb que contiene elementos en *cis* regulatorios de la expresión génica del virus [4, 11, 15].

La función de cada uno de los productos proteicos virales se detalla en la **Tabla 2.2.** y el mapa genómico viral en la **Figura 2.2.**



**Figura 2.2. Mapa del Genoma viral.** (Adaptado de <http://www.genpathdiagnostics.com/division/womens-health>)

**Tabla 2.2. Resumen de la función de las proteínas virales.**

| Proteínas | Función  |
|-----------|--|
| E1        | Helicasa dependiente de ATP, interviene en la replicación viral.   |
| E2        | Coactivador de la replicación viral; factor de transcripción, reprime E6 y E7; regula el ciclo celular y la apoptosis; interactúa con la cromatina para la segregación del genoma viral. |
| E4        | Se une a las proteínas del citoesqueleto e interrumpe la estructura en las células arrestadas en G <sub>2</sub> .  |
| E5        | Induce la proliferación celular; contribuye a la evasión de la apoptosis; regula negativamente la expresión de MHC.  |
| E6        | promueve la inmortalización celular por degradación de la p53; modifica la adhesión celular y diferenciación.  |
| E7        | promueve la degradación de pRb, permitiendo la progresión celular a fase S del ciclo celular; induce la inestabilidad cromosómica.   |
| L1        | Proteína mayor de la cápside; puede autoensamblarse en VLP.  |
| L2        | proteína menor de la cápside, recluta a L1 para el ensamblaje del virus.   |

Adaptado de Bravo y Feléz-Sanchez (2015) [12]

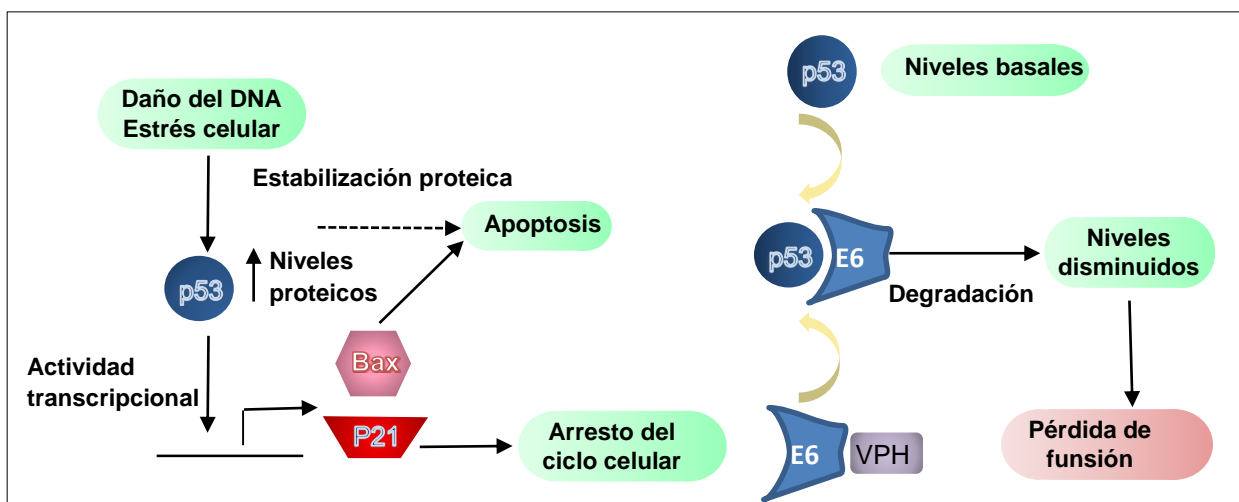
## 2.4. Oncogen E6

El gen E6 es un oncogén de 450 pares de bases (pb) que codifica para una oncoproteína de 18 KDa (151 aa) involucrada en la transformación de células humanas [31, 22]. Se han informado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en su secuencia [32, 33, 34], lo que sugiere que el gen está bajo selección divergente [35]. Los estudios epidemiológicos sobre la variación genética en E6 indican que la variante denominada E6 350G (Leucina por Valina en posición 83 de la proteína E6) se asocia a la persistencia de la infección viral y la progresión al carcinoma. Estudios *in vitro* han demostrado que esta mutación puede afectar la presentación antigénica y la inmunogenicidad, aumentando la capacidad del virus para inducir la transformación celular en comparación con el alelo E6 350T

[36, 37]. Por otro lado, la variante E6 131G (Arginina por Lisina en posición 10 de la proteína E6) presentaría una mayor capacidad de evasión del sistema inmune vinculada con la presencia de determinados haplotipos de sistema HLA, proponiendo una interacción particular entre virus-hospedador [38, 39].

La proteína E6 es una proteína citoplasmática y nuclear básica que contiene un arreglo de cuatro Cisteínas que constituyen dos dominios de zinc relativamente grandes (PDZ), los cuales son necesarios para la estabilidad de la proteína y su función como regulador transcripcional [40, 41]. La importancia de su participación en el proceso oncogénico fue observada en experimentos *in vitro* donde su sobreexpresión indujo la inmortalización de queratinocitos del tracto genital femenino [42]. E6 interacciona principalmente con la proteína supresora de tumores p53 favoreciendo el proceso de modificación del ciclo celular [43, 44, 31, 22].

La p53 es una proteína celular que se encuentra en bajas concentraciones y tiene una doble función reguladora; por un lado, reprime la duplicación celular y por otro lado induce la apoptosis cuando hay daño severo en el ADN celular, situación en la cual esta proteína se sobreexpresa [11]. E6 recluta la ubiquitina ligasa E6AP y este complejo ternario se une al supresor de tumores p53, lo que lleva a la degradación de p53 mediada por la ubiquitina (**Figura 2.3.**) [41, 45, 46].



**Figura 2.3. Interacción entre la proteína viral E6 y la proteína celular p53.** (Imagen adaptada de Pearson J.M. *et al.*, 2008) [48]

La proteína E6 se considera una proteína multifuncional, además de su interacción con proteínas celulares, es un transactivador transcripcional o coactivador y en algunos casos se

comporta como un represor transcripcional débil [40]. Se ha documentado que regula positivamente la transcripción de varios efectores de las vías MAPK (*mitogen activated protein kinase*) y PI3K/AKT (*phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B*) y de esta manera modula estrechamente las células infectadas permitiendo el proceso carcinogénico. Las vías de señalización mediadas por MAPK son fundamentales para transmitir señales extracelulares a la maquinaria celular que controla el crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. La vía de señalización mediadas por PI3K/AKT juega un papel clave en la mediación de la supervivencia y el crecimiento en respuesta a estímulos extracelulares [47]. Otro blanco de la función coactivadora de E6 es la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) que evita el acortamiento de los telómeros en las divisiones sucesivas [41].

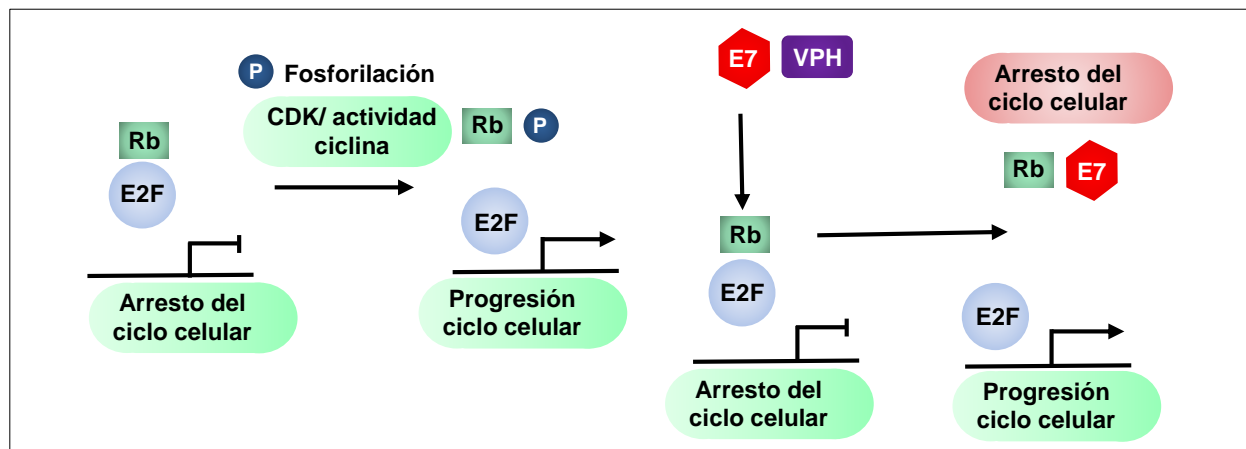
## 2.5. Oncogen E7

El gen E7 es un oncogén de 297 pb que codifica para una oncoproteína de 10 KDa (98 aa) involucrada en el proceso de transformación celular [43]. Los estudios en ratones transgénicos han demostrado que E7 es un impulsor del proceso carcinogénico más potente que E6 [49]. Por otro lado, estudios epidemiológicos recientes de gran tamaño muestral demostraron que la variación genética en este locus es muy baja en los casos de cáncer cervical en comparación con los controles, lo cual sugiere que la conservación de la secuencia E7 es crucial para el desarrollo del cáncer [50, 51]. Además, las variantes de proteínas E7 son escasas, incluso en diferentes ubicaciones geográficas y poblaciones étnicas, por lo cual se considera que tiene características de selección purificadora [51].

La proteína E7 está conformada por tres regiones altamente conservadas: CR1 en el extremo N-terminal; CR2, que contiene un motivo LxCxE y se une a la pRb; y CR3, que contiene dos motivos en forma de dedos de zinc (PDZ), siendo éstos últimos necesarios para la integridad de la proteína y la formación de dímeros o multímeros. Estas proteínas se parecen al antígeno T de Adenovirus tanto en la secuencia primaria como en las propiedades de transactivación y transformación [41, 52]. E7 interacciona principalmente con la familia de proteínas Rb (pRb, p107 y p130) las cuales se expresan diferencialmente a lo largo del ciclo celular; pRb se expresa constitutivamente en todas las fases del ciclo celular, p107 se sintetiza predominantemente durante la fase S y p130 predomina en G0 [41, 52].

La pRb es una proteína celular que regula el ciclo celular, la cual en su forma hipofosforilada impide la replicación del ADN, y a su vez se une a factores celulares activadores de la transcripción (como ser E2F) impidiendo que estos activen la transcripción [53, 11]. La proteína E7 interacciona de manera similar con las distintas proteínas de la familia Rb; en el caso de la pRb, se une a la forma activa de la misma con su consecuente inactivación

y liberación de los factores de transcripción unidos a ella; a su vez E7 media la degradación de la pRb vía ubiquitinas proteómicas (**Figura 2.4.**) [41, 11].



**Figura 2.4.** Interacción entre la proteína viral E7 y la proteína celular pRb. (Imagen adaptada de Pearson J.M. *et al.*, 2008) [48]

Además, E7 se asocia con las ciclinas A y E, con p21 y p27, que son inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (cdk) y con las histonas desacetilasas (HDAC), que son inactivadoras de E2F [41].

## 2.6. Gen de la proteína de la cápside L1

El gen L1, de 1628 pares de bases (pb) codifica para la proteína mayor de la cápside de 55 kDa (531 aa) que está involucrada en el ensamblaje de partículas virales y en el reconocimiento de receptores del huésped [54, 55]. Desafortunadamente, existe escasa información sobre las variantes de L1, aunque algunos estudios han demostrado el desarrollo de seroreactividad cruzada entre distintos tipos de HPV filogenéticamente próximos; este fenómeno no ha sido comprobado para las diferentes variantes de VPH16 [56, 57].

La cápside viral está constituida por 360 copias de la proteína L1 y 12 copias de la proteína L2, las cuales se agrupan en 72 capsómeros pentaméricos. La expresión de L1 en sistemas *in vitro*, genera el autoensamblaje de la misma en "Partículas Similares a Virus" (VLP). Estas partículas no infecciosas carentes de ADN genómico son morfológica e inmunológicamente muy semejantes a los viriones nativos, por lo que han constituido la base para el desarrollo de vacunas contra los VPH de alto riesgo 16 y 18 [23, 54].

La proteína L1 tiene cinco regiones inmunodominantes hipervariables denominadas bucles BC, DE, EF, FG, HI; estas regiones (de 10 a 30 aminoácidos de longitud) están

ubicadas en la superficie de las cápsides ensambladas y son accesibles a los anticuerpos circulantes. La evidencia científica ha demostrado una sustancial variación genética no sinónima en estos sitios que forman los epítopes conformacionales, afectando la producción de anticuerpos neutralizantes y sus afinidades de unión [58, 59]. Esto podría ser crucial para determinar los epítopes relevantes asociados a las estrategias de desarrollo de vacunas, el diseño de test diagnósticos y las intervenciones terapéuticas, ya que pueden afectar la antigenicidad viral y limitar la eficacia de las vacunas [60, 61].

También se ha observado una alta variabilidad en el extremo C-terminal de la proteína L1, en donde esta región parece estar involucrada en la estabilidad de la proteína; en contraste, el extremo N-terminal está relativamente bien conservado [61].

Para lograr la infección selectiva de las células epiteliales basales los viriones se unen inicialmente a los heparán sulfato (HS) en la membrana basal, expuesta por traumas o permeabilización epitelial; esta interacción es de base electrostática y es mediada por múltiples lugares en la superficie de la cápside con cargas eléctricas positivas [62, 63]. Los sitios de unión al HS son conformacionales, consistentes en residuos dispersos en más de un bucle superficial y más de una subunidad de las secuencias primarias de la proteína L1 que se juntan en la estructura tridimensional para formar los parches de unión. En la interacción con los HS ricos en cargas eléctricas negativas participan 5 Lisinas altamente conservadas (K 54, K 59, K 278, K 356 y K 361) y otros residuos polares menos conservados [63].

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] WHO/ICO, «Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Argentina,» 22 Octubre 2021. [En línea]. Available: <https://hpcvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf?t=1637264808930>. [Último acceso: Noviembre 2021].
- [2] L. Sichero, M. Picconi and L. Villa, "The contribution of Latin American research to HPV epidemiology and natural history knowledge," *Braz J Med Biol Res*, vol. 53, no. 2, pp. 1-10, 2020.
- [3] S. Arrossi, «Proyecto para el mejoramiento del Programa Nacional de Prevención de Cáncer de Cuello Uterino en Argentina: informe final: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales,» OPS, Buenos Aires, 2008.
- [4] O. Barboza Quintana y R. Garza Guajardo, «Virus del papiloma humano (VPH),» de *Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*, 2a ed., P. Alonso de Ruiz, E. Lezcano Ponce y M. Hernández Ávila, Edits., México, Médica Panamericana, 2005, pp. 57-66.
- [5] D. Solomon, D. Davey, R. Kurman, A. Moriarty, D. O'Connor, M. Prey, S. Raab, M. Sherman, D. Wilbur y T. J. & Y. N. Wright, «The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology.,» *JAMA*, vol. 287, pp. 2114-2119, 2002.
- [6] X. Castellsagué Piqué, S. de Sanjosé Llongueras y F. Bosch Jose, «Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas,» de *Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero*, R. Carreras Collado, J. Xercavins Montosa y M. Checa Vizcaino, Edits., Madrid, Médica Panamericana, 2007, pp. 1-25.
- [7] H. zur Hausen, «Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.,» *Virology*, vol. 384, pp. 260-265, 2009.
- [8] J. Baseman y L. Koutsky, «The epidemiology of human papillomavirus infections.,» *J. of Clinical Virology*, vol. 32S, pp. S16-S24, 2005.
- [9] T. J. Wright, «CHAPTER 3 . Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system,» *Int J Gynaecol Obstet.*, vol. 94 , nº Suppl 1, pp. S22-S31, Nov 2006.
- [10] G. Cardone, A. Moyer, N. Cheng, C. Thompson, I. Dvoretzky, D. Lowy, J. Schiller, A. Steven, C. Buck y B. Trus, «Maturation of the human papillomavirus 16 capsid.,» *mBio*, vol. 5, nº 4, pp. 01104-14, 5 Aug 2014.



- [11] G. Mancebo Moreno, P. Fusté Brull, M. Checa Vizcaino y R. Carreras Collado, «Papel del virus del papiloma humano en la carcinogénesis cervical,» de Virus del Papiloma Humano y Cáncer de Cuello de Útero, 2da ed., R. Carreras Collado, J. Xercavins Montosa y M. Checa Vizcaino, Edits., Madrid, Médica Panamericana, 2007, pp. 27-41.
- [12] I. Bravo y M. Félez-Sánchez, «Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine.,» *Evol Med Public Health*, vol. 28, nº 1, pp. 32-51, Jan 2015.
- [13] R. Burk, A. Harari y Z. Chen, «Human papillomavirus genome variants., » *Virology*, vol. 445, nº 1-2, pp. 232-43, Oct 2013 .
- [14] E. de Villiers, C. Fauquet, T. Broker, H. Bernard y H. zur Hausen, «Classification of papillomaviruses.,» *Virology*, vol. 324, nº 1, pp. 17-27, 20 Jun 2004.
- [15] H. Bernard, R. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen y E. de Villiers, «Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments,» *Virology*, vol. 401, nº 1, pp. 70-9, 25 May 2010.
- [16] I. Badano, R. Pedrozo, L. Ruiz Diaz, J. Galuppo, M. Picconi, R. Campos y D. Liotta, «Human papillomavirus (HPV) detection and Papanicolaou cytology in low-resource women in Posadas city, Misiones, Argentina.,» *Rev Argent Microbiol*, vol. 43, nº 4, pp. 263-7, Oct-Dec 2011.
- [17] I. Badano, D. Sanabria, M. Totaro, S. Rubinstein, J. Gili, D. Liotta, M. Picconi, R. Campos y T. Schurr, «Mitochondrial DNA ancestry, HPV infection and the risk of cervical cancer in a multiethnic population of northeastern Argentina,» *PLoS One*, vol. 13, nº 1, p. e0190966, Jan 2018.
- [18] N. Muñoz, F. Bosch, S. De, R. Herrero, X. Castellsague, K. Shah, P. Snijders y C. Meijer, «Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer,» *N Engl J Med*, vol. 348, pp. 518-527, 2003.
- [19] S. Chan, L. Ho, C. Ong, V. Chow, B. Drescher, M. Dürst, J. ter Meulen, L. Villa, J. Luande, H. Mgaya y e. al., «Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind,» *J Virol.*, vol. 66, nº 4, pp. 2057-66, Apr 1992.
- [20] L. Ho, S. Chan, V. Chow, T. Chong, S. Tay, L. Villa y H. Bernard, «Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree,» *J Clin Microbiol.*, vol. 29, nº 9, pp. 1765-72, Sep 1991.
- [21] L. Mirabello, M. Clarke, C. Nelson, M. Dean, N. Wentzensen, M. Yeager, M. Cullen, J. Boland, N. H. Workshop, M. Schiffman y R. Burk, «The Intersection of HPV

- Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis,»  
Viruses, vol. 12, nº 2, p. 80, Feb 2018.
- [22] M. Martinelli, C. Villa, G. Sotgiu, N. Muresu, F. Perdoni, R. Musumeci, R. Combi, A. Cossu, A. Piana y C. Cocuzza, «Analysis of Human Papillomavirus (HPV) 16 Variants Associated with Cervical Infection in Italian Women.,» Int J Environ Res Public Health, vol. 17, nº 1, p. 306, Jan 2020.
- [23] L. Villa, L. Sichero, P. Rahal, O. Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan y E. Franco, «Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia,» J Gen Virol., vol. 81, nº 12, pp. 2959-2968, Dic 2000.
- [24] J. Berumen, R. Ordoñez, E. Lazcano, J. Salmeron, S. Galvan, R. Estrada, E. G.-C. A. Yunes, G. Gonzalez-Lira y A. Madrigal-de la Campa, «Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study.,» J Natl Cancer Inst. , vol. 93, nº 17, pp. 1325-30, Sep 2001.
- [25] A. Hildesheim, M. Schiffman, C. Bromley, S. Wacholder, R. Herrero, A. Rodriguez, M. Bratti, M. Sherman, U. Scarpidis, Q. Lin, M. Terai, R. Bromley, K. Buetow, R. Apple y R. Burk, «Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer.,» J Natl Cancer Inst., vol. 93, nº 4, pp. 315-8, Feb 2001.
- [26] L. Xi, N. Kiviat, A. Hildesheim, D. Galloway, C. Wheeler, J. Ho y L. Koutsky, «Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence,» J Natl Cancer Inst., vol. 98, nº 15, pp. 1045-52, Aug 2006.
- [27] L. Sichero, S. Ferreira, H. Trottier, E. Duarte-Franco, A. Ferenczy, E. Franco y L. Villa, «High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18,» Int J Cancer., vol. 120, nº 8, pp. 1763-8, Apr 2007.
- [28] B. Smith, Z. Chen, L. Reimers, K. S. M. van Doorslaer, R. Desalle, R. Herrero, K. Yu, S. Wacholder, T. Wang y R. Burk, «Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies.,» PLoS One, vol. 6, nº 6, p. e21375, Jun 2011.
- [29] L. Sichero y L. Villa, «Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus.,» Braz J Med Biol Res., vol. 39, nº 6, pp. 707-17, Jun 2006.
- [30] A. Hildesheim y S. Wang, «Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review.,» Virus Res., vol. 89, nº 2, pp. 229-40, Nov 2002.
- [31] S. Vande Pol y A. Klingelutz, «Papillomavirus E6 oncoproteins,» Virology, vol. 445, nº 1-2, pp. 115-37, Oct 2013.

- [32] T. Yamada, M. Manos, J. Peto, C. Greer, N. Munoz, F. Bosch y C. Wheeler, «Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective,» *J Virol.*, vol. 71, nº 3, pp. 2463-72, Mar 1997.
- [33] I. Cornet, T. Gheit, S. Franceschi, J. Vignat, R. Burk, B. Sylla, M. Tommasino, G. Clifford y I. H. V. S. Group., «Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR,» *J Virol.*, vol. 86, nº 12, pp. 6855-61, Jun 2012.
- [34] I. Cornet, T. Gheit, G. Clifford, J. Combes, V. Dalstein, S. Franceschi, M. Tommasino y C. Clavel, «Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence,» *Infect Agent Cancer.*, vol. 8, nº 1, p. 4, Jan 2013.
- [35] Z. Chen, M. Terai, L. Fu, R. Herrero, R. DeSalle y R. Burk, «Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses,» *J Virol.*, vol. 79, nº 11, pp. 7014-23, Jun 2005.
- [36] L. Sichero, J. Sobrinho y L. Villa, «Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants,» *Virology*, vol. 432, nº 1, pp. 127-32, Oct 2012.
- [37] G. Tan, M. Duan, Y. Li, N. Zhang, W. Zhang, B. Li y P. Qu, «Distribution of HPV 16 E6 gene variants in screening women and its associations with cervical lesions progression,» *Virus Res.*, vol. 273, p. 197740, Nov 2019.
- [38] J. Ellis, P. Keating, J. Baird, E. Hounsell, D. Renouf, M. Rowe, D. D.-K. M. Hopkins, J. Bartholomew, L. Young y e. al., «The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer.,» *Nat Med.*, vol. 1, nº 5, pp. 464-70, May 1995 .
- [39] I. Zehbe, R. Tachezy, J. Mytilineos, G. Voglino, I. Mikyskova, H. Delius, A. Marongiu, L. Gissmann, E. Wilander y M. Tommasino, «Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes,» *Int J Cancer*, vol. 95, nº 5, pp. 711-6, Dec 2001.
- [40] G. Myers y E. Androphy, «E6 Protein,» Oct 1995. [En línea]. Available: <https://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/compendium/95PDF/3/e6.pdf>.
- [41] M. Longworth y L. Laimins, «Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia,» *Microbiol Mol Biol Rev.*, vol. 68, nº 2, pp. 362-72, Jun 2004.
- [42] J. Hudson, M. Bedell, D. McCance y L. Laiminis, «Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18,» *J Virol.*, vol. 64, nº 2, pp. 519-26, Feb 1990.

- [43] K. Münger, M. Scheffner, J. Huibregtse y P. Howley, «Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products,» *Cancer Surv.*, vol. 12, pp. 197-217, 1992.
- [44] K. Münger y P. Howley, «Human papillomavirus immortalization and transformation functions,» *Virus Res.*, vol. 89, nº 2, pp. 213-28, Nov 2002 .
- [45] K. Zanier, A. ould M'hamed ould Sidi, C. Boulade-Ladame, V. Rybin, A. Chappelle, A. Atkinson, B. Kieffer y G. Travé, «Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53,» *Structure*, vol. 20, nº 4, pp. 604-17, Apr 2012.
- [46] D. Martinez-Zapien, F. Ruiz, J. Poirson, A. Mitschler, J. Ramirez, A. Forster, A. Cousido-Siah, M. Masson, S. Vande Pol, A. Podjarny, G. Travé y K. Zanier, «Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53,» *Nature*, vol. 529, nº 7587, pp. 541-5, Jan 2016.
- [47] J. Hochmann, J. Sobrinho, L. Villa y L. Sicheró, «The Asian-American variant of human papillomavirus type 16 exhibits higher activation of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, transformation, migration and invasion of primary human keratinocytes,» *Virology*, vol. 492, pp. 145-54, May 2016.
- [48] J. Pearson, R. Feltman y L. Twiggs, «Association of human papillomavirus with vulvar and vaginal intraepithelial disease: opportunities for prevention,» *Womens Health (Lond)*, vol. 4, nº 2, pp. 143-50, Mar 2008.
- [49] A. Roman y K. Munger, «The papillomavirus E7 proteins,» *Virology*, vol. 445, nº 1-2, pp. 138-68, Oct 2013.
- [50] M. Safaeian, K. van Doorslaer, M. Schiffman, Z. Chen, A. Rodriguez, R. Herrero, A. Hildesheim y R. Burk, «Lack of heterogeneity of HPV16 E7 sequence compared with HPV31 and HPV73 may be related to its unique carcinogenic properties,» *Arch Virol.*, vol. 155, nº 3, pp. 367-70, Mar 2010.
- [51] L. Mirabello, M. Yeager, K. Yu, G. Clifford, Y. Xiao, B. Zhu, M. Cullen, J. Boland, N. Wentzensen, C. Nelson, T. Raine-Bennett, Z. Chen, S. Bass, L. Song, Q. Yang, M. Steinberg, L. Burdett, M. Dean, D. Roberson y *et al.*, «HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis,» *Cell*, vol. 170, nº 6, pp. 1164-1174, Sep 2017.
- [52] X. Liu, A. Clements, K. Zhao y R. Marmorstein, «Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor,» *J Biol Chem.* , vol. 281, nº 1, pp. 578-86, Jan 2006.

- [53] K. Münger y A. Halpern, «HPV16 E7: Primary Structure and Biological Properties,» Sep 1997. [En línea]. Available: <https://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/compendium/97PDF/3/E7.pdf>.
- [54] D. Lowy y J. Schiller, «Prophylactic human papillomavirus vaccines,» J Clin Invest., vol. 116, n° 5, pp. 1167-73, May 2006.
- [55] L. Villa, «Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases,» Vaccine, vol. 24, n° Suppl 1, pp. S23-8, Mar 2006.
- [56] G. Cheng, J. Icenogle, R. Kirnbauer, N. Hubbert, M. St Louis, C. Han, E. Svare, S. Kjaer, D. Lowy y J. Schiller, «Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive,» J Infect Dis., vol. 172, n° 6, pp. 1584-7, Dec 1995.
- [57] L. Oumeslakht, M. Ababou, B. Badaoui y Z. Qmichou, «Worldwide genetic variations in high-risk human papillomaviruses capsid L1 gene and their impact on vaccine efficiency,» Gene, vol. 782, p. 145533, May 2021.
- [58] J. Chansaenroj, A. Theamboonlers, P. Junyangdikul, S. Swangvaree, A. Karalak y Y. Poovorawan, «Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients,» Asian Pac J Cancer Prev., vol. 13, n° 2, pp. 599-606, 2012.
- [59] A. El Aliani, H. El Abid, Y. Kassal, M. Khyatti, M. Attaleb, M. Ennaji y M. El Mzibri, «HPV16 L1 diversity and its potential impact on the vaccination-induced immunity,» Gene, vol. 747, p. 144682, Jul 2020.
- [60] E. Frati, S. Bianchi, A. Amendola, D. Colzani, F. Petrelli, G. Zehender y E. Tanzi, «Genetic characterization of variants of HPV 16, HPV 18 and HPV 52 circulating in Italy among general and high risk populations,» Mol Med Rep. , vol. 21, n° 2, pp. 894-902, Feb 2020.
- [61] Z. Sun, G. Ren, X. Cui, W. Zhou, C. Liu y Q. Ruan, «Genetic diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 genes in women with cervical lesions in Liaoning Province, China,» Int J Gynecol Cancer, vol. 21, n° 3, pp. 551-8, Apr 2011.
- [62] J. Icenogle, «Analysis of the Sequences of the L1 and L2 Capsid Proteins of Papillomaviruses,» Oct 1995. [En línea]. Available: <https://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/compendium/95PDF/3/ice.pdf>.
- [63] J. Dasgupta, M. Bienkowska-Haba, M. Ortega, H. Patel, S. Bodevin, D. Spillmann, B. Bishop, M. Sapp y X. Chen, «Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus,» J Biol Chem., vol. 286, n° 4, pp. 2617-24, Jan 2011.

# METODOLOGÍA



## CAPITULO 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Definición operacional de las variables y categorías

Para la realización de este estudio se utilizaron los siguientes indicadores: (1) Variable Dependiente: Diagnóstico citológico de las mujeres analizadas. Se empleó la clasificación de Bethesda 2001: NLIM (Negativa para Lesión Intraepitelial o Malignidad), LSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado), HSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado), CIS (Carcinoma *in situ*) y CCI (Carcinoma de cuello invasor); (2) Variable Independiente: polimorfismo (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*) del genoma viral (E6, E7 y L1) [1].

### 3.2. Descripción del ámbito de estudio

Mujeres residentes de la ciudad de Posadas, capital de la provincia de Misiones, la cual se ubica sobre el margen izquierdo del río Paraná, al sudoeste de la provincia de Misiones (27°21'59"S 55°53'39"O).

### 3.3. Tipo de estudio y diseño

El estudio se realizó implementando dos tipos de diseño: (1) un diseño epidemiológico descriptivo de la secuencia de ADN de los genes E6, E7 y L1 de VPH16; (2) un diseño epidemiológico del tipo retrospectivo de casos y controles en mujeres estratificadas por edad infectadas con VPH16.

### 3.4. Población

#### ***Universo o población objetivo***

La población objeto de estudio se circunscribió a la ciudad de Posadas conformada por 324.756 habitantes, siendo la población femenina aproximadamente de 169.221 mujeres.

#### ***Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión***

Como criterio de inclusión en el estudio fueron consideradas aquellas pacientes infectadas con VPH16 que presentaron diagnóstico cito-histológico de NLIM (Grupo controles) y/o LSIL, HSIL o Carcinoma (Grupo casos).

#### ***Población accesible: Selección y tamaño de la muestra***

Se estimó un  $n$  de análisis de 180 muestras. Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la tasa de incidencia de cáncer de cuello de útero estandarizada por edad, establecida

como valor de referencia por la OMS para la Argentina de 17,5/100.000. En la ciudad de Posadas, la población de mujeres mayores de 30 años es de aproximadamente 167.137 mujeres [2]. De este modo, el número estimado de casos de cáncer cervical invasivo anual es de aproximadamente 29 mujeres ( $17,5 \times 167.137 / 100.000$ ). Dado que solo el 50 % de esta población estaría infectada con VPH16 [3], el número anual de mujeres esperado es de 15. Se consideró un período de 2 años de muestreo durante la ejecución del estudio, el número potencial de casos de cáncer de cuello de útero fue de 30. Para obtener comparaciones estadísticas entre los grupos de análisis, se incorporó un mismo número de lesiones de bajo y alto grado. En conjunto se seleccionó un control por cada caso (90 controles y 90 casos (30 LSIL, 30 HSIL y 30 Carcinomas).

### 3.5. Consideraciones éticas

La salvaguarda ética de este proyecto se encuentra en un todo de acuerdo con los principios éticos, legales y jurídicos para las investigaciones médicas en seres humanos descriptas en las normas bioéticas nacionales (Disp. ANMAT 5330/97) e internacionales (Código de Núremberg, Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos de la UNESCO 11/11/97), mediante un consentimiento voluntario informado, el cual fue oportunamente solicitado a las pacientes (**Anexo I**). Asimismo, se contó con el aval del Comité de Ética en Investigación (CEI) del Hospital Escuela de Agudos Dr. Ramón Madariaga

### 3.6. Genotipificación de VPH

#### ***Muestras Biológicas***

Se analizaron muestras de ADN genómico total extraído a partir de células cervicales descamadas, colectadas mediante cepillado ecto-endocervical derivadas en buffer fosfato salino (PBS) o biopsias incluidas en parafina previamente fijadas en formalina tamponada. Las muestras se seleccionaron a partir de la genoteca del LaBiMAp (FCEQyN-UNaM) constituida por más de 1500 muestras que se obtuvieron durante la ejecución de proyectos de investigación afines y 300 muestras que fueron remitidas, durante la ejecución de este trabajo, a través de una red de ginecólogos locales.

#### ***Extracción de ADN***

La extracción de ADN se realizó mediante el uso de *Kit* comercial (InBio-HW, Argentina). El ADN obtenido se cuantificó mediante el uso de Fluorómetro Qubit (Invitrogen) y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.



### **Control de calidad genómico**

Para verificar la calidad del material se realizó la amplificación de un fragmento de 286 pb del gen de la beta globina humana mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [4]. Aquellas muestras positivas fueron sometidas a detección molecular de VPH por PCR.

#### **Detección molecular de VPH**

La detección molecular de VPH se realizó mediante una PCR genérica con el set de cebadores degenerados MY09/11. Esta PCR descrita por Bernard *et al.* (1994) amplifica una región conservada del gen L1 de 450 pb [5].

#### **Tipificación viral**

Los tipos virales se detectaron utilizando el protocolo de *PCR-E6-Nested-Multiplex* (PCR-E6NMPX), que combina una PCR anidada (*Nested*) con cócteles de cebadores para varios VPH (*Multiplex*). Con esta técnica se realizó la detección rápida de 10 tipos virales [6].

### **3.7. Caracterización genética de VPH16**

#### **Variantes de VPH16**

Las variantes de VPH16 fueron determinadas mediante PCR directa con posterior secuenciación del producto amplificado según el protocolo de Chan *et al.* (1992) de la LCR viral (**Anexo 2**) [7]. Las variantes fueron descritas sobre la base de identidad de secuencia, y clasificadas según su origen geográfico (linajes A, B, C y D) mediante la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos GenBank, número de acceso: KM094931 – KM095046.

#### **Caracterización genética de los genes E6, E7 y L1**

Para la caracterización de los genes de interés se amplificaron los segmentos mediante PCR directa empleando el protocolo descrito por Totaro *et al.* (2021) (**Anexo 3 y 4**) [8]. Los productos fueron resueltos en gels de agarosa al 2 % e identificados de acuerdo a su tamaño mediante el empleo de un marcador de peso molecular de 1 Kb (E6: 456 pb; E7: 293 pb y L1: 1596 pb).

En todos los casos, los productos amplificados fueron purificados mediante el uso de *Kit Comercial* (INBIO-HW-Argentina) y aquellos cuya concentración de ADN fue mayor a 30 ng/μl fueron sometidos a secuenciación automática de ambas cadenas mediante servicios a terceros (Macrogen Inc, Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la

base de datos GenBank, número de acceso: MN053339 - MN053388; MN160917 - MN061890.

### 3.8. Plan de análisis de los resultados.

#### **Análisis de Secuencias**

Los cromatogramas se analizaron en el programa Codon Code Aligner v 3.0.1™. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante *Blast* con aquellas disponibles en GenBank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Las regiones codificantes se tradujeron a cadenas de aminoácidos mediante el uso de la herramienta bioinformática Mega 6 (<http://www.megasoftware.net/>) y comparadas con la secuencia de referencia europea (#NC\_001526) [9].

Los cambios en la secuencia del gen fueron denominados acorde a la nomenclatura estándar, de la siguiente manera: la posición dentro del gen se indica con un número, el cual es precedido por la base de referencia, y sucedido por la mutación encontrada en la secuencia. Si la mutación genera un cambio no sinónimo, éste se indica entre paréntesis.

#### **Análisis Filogenético**

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas se analizaron mediante los algoritmos de *Neighbor Joining* (NJ) y *Maximum Likelihood* (ML) del programa Mega 6 [8]. Para evaluar el soporte estadístico de cada árbol se realizó un test de *Bootstrap* de 100 repeticiones para ML y 1000 para NJ. Los árboles filogenéticos se obtuvieron mediante el método Bayesiano del programa BEAST 1.5.4. [10]

La clasificación en linajes se realizó mediante la construcción de árboles filogenéticos con secuencias de referencia: A (A1: NC001526, K02718; A2: AF536179; A3: HQ644236; A4: AF534061), B (B1: AF536180; B2: HQ644289; B3: KU053911), C (C1: AF472509; C2: HQ644244; C3: HQ644243; C4: KU053922), y D (D1: HQ644257; D2: AY686579; D3: AF402678; D4: KU053931) [11, 12].

#### **Datación Molecular**

La datación molecular del Ancestro Común Más Reciente de las secuencias humanas y virales [*Dating of Most Recent Common Ancestor* ( $t_{MRC}$ )] se realizó mediante análisis de Coalescencia [*Monte Carlo Markov Chains* (MCMC) *Bayesian coalescent analysis*]. Los sets de datos se analizaron por separado bajo el modelo de reloj molecular lognormal no correlacionado (*UCLN, uncorrelated lognormal*) en el paquete de programas BEAST v1.8.2 [10, 13].

El muestreo de la distribución posterior de los parámetros, obtenido por el método de cadenas de Markov de Montecarlo, se extendió por el número de generaciones necesario para

alcanzar la convergencia. Se utilizó el programa Tracer v1.7 para visualizar los resultados. El criterio de convergencia en la fase estacionaria se basó en la obtención de valores de ESS (*effective sample sizes*) mayores a 200 y el mezclado aceptable de las cadenas para todos los parámetros estimados, después de descartar el 10 % del muestreo como *burn-in*. La incertidumbre en los parámetros estimados fue evaluada en el intervalo más corto que contiene al 95 % de la probabilidad posterior (HPD95 %, *highest posterior density 95 %*).

Finalmente, se obtuvo el árbol de máxima credibilidad de clados (MCCT, *Maximum clade credibility tree*) con el programa TreeAnnotator v1.8.2 aplicando el algoritmo de “*common ancestor heights*” [14]. La visualización se realizó con el programa FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### **Estadística descriptiva**

Para describir el conjunto de datos obtenidos de cada población se utilizaron: 1- en el caso de las variables numéricas continuas (edad): medidas de tendencia central (media, mediana y moda); 2- en el caso de las variables categóricas ordinales y nominales (presencia o ausencia de polimorfismos –SNPs-): frecuencia y porcentajes.

### **Estadística Analítica**

Las variables numéricas y categóricas fueron contrastadas mediante la prueba del  $X^2$  y el test exacto de Fisher (para  $n$  menor a 5), con un nivel de significancia  $p = 0,05$ .

### **Estudios de Asociación**

La relación existente entre las variables se realizó mediante cálculo de la razón de probabilidades (RP) e Intervalos de Confianza del 95 % (IC95 %). Los valores de RP se obtuvieron mediante la elaboración de tablas de contingencia de 2x2 (análisis univariado) o de regresión logística binaria y ordinal (cuando la variable dependiente presentó más de 2 categorías) con el programa SPSS versión 15.0.

Se establecieron los siguientes grupos de análisis: estratificado por lesiones NLIM, LSIL y HSIL+.

## **3.9. Análisis de Proteínas**

Las secuencias proteicas de L1, E6 y E7 con cambios aminoacídicos fueron seleccionadas y se comparadas con la secuencia de referencia (GenBank: K02718.1) utilizando la herramienta BLASTP de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Asimismo, se realizó el alineamiento múltiple de las mismas con el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para obtener los datos de cobertura, (QC, indica

el porcentaje de la secuencia que fue cubierta), confiabilidad (*E-value*), identidad (porcentaje de aminoácidos idénticos) y positividad (porcentaje de aminoácidos idénticos más los similares). Se analizaron las familias proteicas mediante PFAM (<https://pfam.xfam.org/>) y se anotaron los residuos conservados para cada familia.

Los cambios en la secuencia de la proteína fueron denominados acorde a la nomenclatura estándar, de la siguiente manera: la posición dentro de la proteína se indica con un número, el cual es precedido por el aminoácido de referencia, y sucedido por la mutación encontrada en la secuencia.

### ***Modelado proteico***

Mediante la plataforma RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) se obtuvieron las estructuras cristalográficas para la proteína E6 (PBD: 2LJX) [14], E7 (PBD:2EWL) [15] y L1 (PBD:1DZL) [16] y para los complejos cuaternarios de E6 (PBD: 4XR8) [17] y L1 (PBD:1DZL) [16], utilizando como templado las secuencias más representativas encontradas en pacientes de nuestra población (**Anexo 5**). El modelado de la estructuras terciarias y cuaternarias por homología se realizó empleando el programa Swiss-Model y la plataforma bioinformática ExPASy ([https://www.expasy.org/structural\\_bioinformatics](https://www.expasy.org/structural_bioinformatics)). Mediante el software VMD (Visual Molecular Dynamics) se visualizaron y analizaron las estructuras proteicas terciarias, en los casos requeridos se profundizó el análisis a las estructuras cuaternarias y las posibles interacciones entre proteínas midiendo las distancias (en Amstrongs, Å) entre los aminoácidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] D. Solomon, D. Davey, R. Kurman, A. Moriarty, D. O'Connor, M. Prey, S. Raab, M. Sherman, D. Wilbur y T. J. & Y. N. Wright, «The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology.,» JAMA, vol. 287, pp. 2114-2119, 2002.
- [2] INDEC, «Census 2010,» 2010. [En línea]. Available: <http://www.indec.mecon.ar/>..
- [3] WHO/ICO, «Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Argentina,» 22 Octubre 2021. [En línea]. Available: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf?t=1637264808930>. [Último acceso: Noviembre 2021].
- [4] R. M. Resnick, M. T. Cornelissen, D. K. Wright, G. H. Eichinger, H. S. Fox, J. ter Schegget y M. M. Manos, «Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. Journal of the National Cancer Institute,» J Natl Cancer Inst., vol. 82, n° 18, p. 1477–1484, Sep 1990.
- [5] H. Bernard, S. Chan, M. Manos, C. Ong, L. Villa, H. Delius, C. Peyton, H. Bauer y C. Wheeler, «Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms,» J Infect Dis. , vol. 170, n° 5, pp. 1077-85., Nov 1994.
- [6] K. Sotlar, D. Diemer, A. Dethleffs, Y. Hack, A. Stubner, N. Vollmer, S. Menton, M. Menton, K. Dietz, D. Wallwiener, R. Kandolf y B. Bültmann, «Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR,» J Clin Microbiol., vol. 42, n° 7, pp. 3176-84, Jul 2004.
- [7] S. Chan, L. Ho, C. Ong, V. Chow, B. Drescher, M. Dürst, J. ter Meulen, L. Villa, J. Luande, H. Mgaya y e. al., «Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind,» J Virol., vol. 66, n° 4, pp. 2057-66, Apr 1992.
- [8] M. Totaro, J. Gili, D. Liotta, T. Schurr, M. Picconi y I. Badano, «Genetic variation in the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 in northeastern Argentina,» J Med Virol., pp. 1-7, Sep 2021.
- [9] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar, «MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.,» Mol Biol Evol., vol. 30, n° 12, pp. 2725-9, Dec 2013 .

- [10] A. Drummond y A. Rambaut, «BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees,» *BMC Evol Biol.*, vol. 7, nº 214, p. 1, Nov 2007.
- [11] R. Burk, A. Harari y Z. Chen, «Human papillomavirus genome variants,» *Virology*, vol. 445, nº 1-2, pp. 232-43, Oct 2013 .
- [12] L. Mirabello, M. Clarke, C. Nelson, M. Dean, N. Wentzensen, M. Yeager, M. Cullen, J. Boland, N. H. Workshop, M. Schiffman y R. Burk, «The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis,» *Viruses*, vol. 12, nº 2, p. 80, Feb 2018.
- [13] A. Drummond, A. Rambaut, B. Shapiro y O. Pybus, «Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences,» *Mol Biol Evol.*, vol. 22, nº 5, pp. 1185-92, May 2005.
- [14] J. Heled y R. Bouckaert, «Looking for trees in the forest: summary tree from posterior samples,» *BMC Evol Biol.*, vol. 13, nº 221, Oct 2013.
- [15] K. Zanier, A. ould M'hamed ould Sidi, C. Boulade-Ladame, V. Rybin, A. Chappelle, A. Atkinson, B. Kieffer y G. Travé, «Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53,» *Structure*, vol. 20, nº 4, pp. 604-17, Apr 2012.
- [16] O. Ohlenschläger, T. Seiboth, H. Zengerling, L. Briese, A. Marchanka, R. Ramachandran, M. Baum, M. Korbas, W. Meyer-Klaucke, M. Dürst y M. Görlach, «Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7,» *Oncogene*, vol. 25, nº 44, pp. 5953-9, Sep 2006.
- [17] X. Chen, R. Garcea, I. Goldberg, G. Casini y S. Harrison, «Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16,» *Mol Cell.*, vol. 5, nº 3, pp. 557-67, Mar 2000.
- [18] D. Martinez-Zapien, F. Ruiz, J. Poirson, A. Mitschler, J. Ramirez, A. Forster, A. Cousido-Siah, M. Masson, S. Vande Pol, A. Podjarny, G. Travé y K. Zanier, «Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53,» *Nature*, vol. 529, nº 7587, pp. 541-5, Jan 2016.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de la muestra analizada.

#### *Estudio Descriptivo.*

Las características de la población analizada se muestran en la **Tabla 4.1**. Brevemente, se analizaron 160 mujeres positivas para infección por VPH16 con rango etario de 18-67 años de edad (33,8 media, 30 mediana y 29 moda).

**Tabla 4.1. Características de la población seleccionada.**

| Lesiones     | NLIM  | L-SIL | HSIL+ | Total |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| Edad (rango) | 18-67 | 18-54 | 18-65 | 18-67 |
| media        | 32,1  | 30,7  | 38,1  | 33,8  |
| mediana      | 29    | 29    | 36    | 30    |
| moda         | 22    | 20    | 30    | 29    |
| DE           | 11    | 9,8   | 12,2  | 11,5  |
| Total        | 43    | 62    | 55    | 160   |

DE: Desvío Estándar

#### ***Caracterización de los genes E6, E7, L1 y LCR viral***

De las 160 muestras de ADN extraído se obtuvieron productos amplificados de al menos uno de los genes de interés en 119 muestras (74 %). En la **Tabla 4.2** se detalla el número de secuencias amplificadas para cada gen. Brevemente, en 74 muestras (62,2 %) se analizaron las secuencias de los genes E6, E7 y L1. En conjunto, estos genes representan el 30 % del genoma viral.



**Tabla 4.2. Resumen de las muestras procesadas y las secuencias obtenidas para los genes L1, E6 y E7.**

| Gen | Total | Amplificadas             | Negativas | Positivas  | Secuenciadas             | Ilegibles  | Analizadas |
|-----|-------|--------------------------|-----------|------------|--------------------------|------------|------------|
| LCR | 160   | 156 (97,5 %)             | 37 (23 %) | 119 (74 %) | 116 (72 %)               |            | 116 (72 %) |
|     |       | 4 <sup>(1)</sup> (2,5 %) |           |            | 3 <sup>(2)</sup> (1,8 %) |            |            |
| E6  | 160   | 156 (97,5 %)             | 37 (23 %) | 119 (74 %) | 115 (71,8 %)             | 3 (1,8 %)  | 112 (70 %) |
|     |       | 4 <sup>(1)</sup> (2,5 %) |           |            | 4 <sup>(2)</sup> (2,5 %) |            |            |
| E7  | 160   | 156 (97,5 %)             | 37 (23 %) | 119 (74 %) | 115 (72 %)               | 22 (14 %)  | 93 (58 %)  |
|     |       | 4 <sup>(1)</sup> (2,5 %) |           |            | 4 <sup>(2)</sup> (2,5 %) |            |            |
| L1  | 160   | 156 (97,5 %)             | 52 (32 %) | 104 (65 %) | 99 (62 %)                | 11 (6,8 %) | 88 (55 %)  |
|     |       | 4 <sup>(1)</sup> (2,5 %) |           |            | 5 <sup>(2)</sup> (3,1 %) |            |            |

(1) Genoma almacenado insuficiente.

(2) Las muestras tenían menos de 30 ng/ul de ADN

Con respecto al desgranamiento de la muestra ocurrido, el 26,6 % de las muestras (41/160) resultaron negativas o los productos amplificados no correspondían a fragmentos únicos del tamaño esperado. Todas las muestras negativas pertenecían a ADN almacenado por más de 10 años (2004- 2006), de las cuales 15 se obtuvieron a partir de biopsias incluidas en parafina; asimismo estas muestras tenían un bajo contenido de ADN cuando se realizó la amplificación de la beta globina humana, por lo cual el resultado negativo puede atribuirse a modificaciones del ADN debidas a la hidrólisis espontánea y daño oxidativo, cantidades limitadas de ADN molde para la amplificación por PCR y desaminación de las bases de citosina [1, 2, 3].

La diferencia en la sensibilidad de los diferentes protocolos podría ser atribuido al tamaño del fragmento amplificado. En este sentido ocurrió un desgranamiento mayor de la población analizada para el gen L1 (1500 pb). La detección de mutaciones a menudo se vio obstaculizada tanto por la degradación extensa del ADN como por la presencia de artefactos de secuencia cuando se obtienen de tejidos incluidos en parafina, sobre todo para fragmentos grandes [3]; del total analizado 26 muestras correspondieron a biopsias incluidas en parafina de las cuales se pudieron obtener 2 secuencias legibles del gen L1, 10 del gen E6 y 9 del gen E7. Otra causa fue la infección mixta con diferentes variantes de VPH16, lo que resultó en cromatogramas ilegibles; en 2008 Junes-Gill *et al.* determinaron que el 10 % de las muestras positivas para VPH16 correspondían a infecciones con múltiples variantes [4].

A pesar de estas limitaciones, las secuencias obtenidas representan el primer reporte de la variación genética a nivel local (E6) y nacional (L1 y E7).

## 4.2. Caracterización genética de las variantes de VPH16

### *Linajes de VPH16 y Análisis Filogenético*

Las variantes de HPV16 se identificaron a partir de la secuencia de la LCR viral. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.3**. Se identificaron 16 sitios variables entre los nucleótidos 7526 a 7847, distribuidos en 11 combinaciones únicas, siendo la más frecuente de ellas la secuencia de Referencia.

**Tabla 4.3. Resumen de la variabilidad en la secuencia de nucleótidos de la Región Larga de Control (LCR) del Virus Papiloma Humano tipo 16 (VPH16) de pacientes de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina.**

| Sec/Ref      | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | Citología (Pap) |           |           |           |            |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------------|-----------|-----------|-----------|------------|
|              | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | Variantes       | NLIM      | LSIL      | HSIL+     | Total      |
| NEA-001      | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A               | 12        | 52        | 30        | 94         |
| NEA-008 (*)  | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | A               | 0         | 0         | 1         | 1          |
| NEA-017 (*)  | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | A | 1               | 1         | 0         | 2         |            |
| NEA-023 (*)  | . | . | C | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | A | 0               | 4         | 0         | 4         |            |
| NEA-051      | . | . | . | T | G | A | . | C | . | T | T | . | . | . | T | D | 0               | 0         | 1         | 1         |            |
| NEA-060 (*)  | . | . | C | . | . | . | G | . | . | . | . | T | . | . | . | A | 1               | 0         | 0         | 1         |            |
| NEA-073      | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | 1               | 0         | 0         | 1         |            |
| NEA-075      | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | 1               | 4         | 0         | 5         |            |
| NEA-079      | . | . | . | T | . | A | . | C | G | T | T | . | . | . | . | D | 0               | 0         | 4         | 4         |            |
| NEA-120      | . | . | . | T | . | A | . | T | G | T | T | . | . | . | . | D | 0               | 1         | 1         | 2         |            |
| NEA-122 (*)  | . | . | . | T | . | A | . | C | G | T | T | G | . | . | . | C | D               | 0         | 0         | 1         | 1          |
| <b>TOTAL</b> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                 | <b>16</b> | <b>62</b> | <b>38</b> | <b>116</b> |

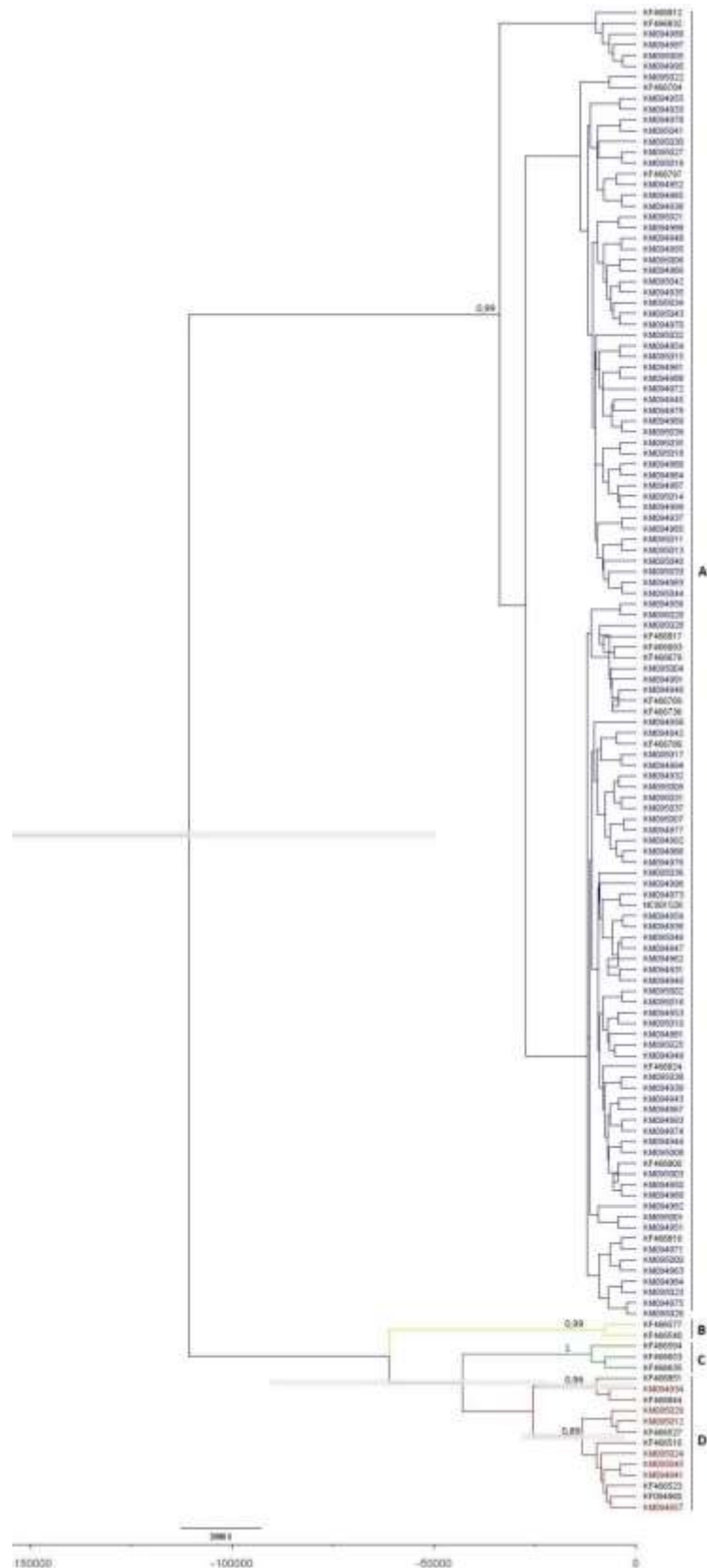
Las posiciones de los nucleótidos se designaron de acuerdo con el genoma de referencia A (NCBI # NC 001526).

(\*) Variante novel.

Número de acceso a GenBank en **Anexo 6**.

El análisis filogenético de las variantes y la datación molecular se muestra en la **Figura 4.1**. El 93,1 % (108/116) de las secuencias analizadas pertenecían al linaje A, mientras que el 6,9 % (8/116) al linaje D. La alta prevalencia observada de variantes del linaje A, es congruente con publicaciones previas de otros autores de poblaciones latinoamericanas de composición multiétnica como Uruguay (89 %) [5], Paraguay (82 %) [6] y Ecuador (85 %) [7], pero diferente a lo reportado para Brasil (entre 42 % y 54 %) [8, 9] y México (13 %) [10], países donde las otras variantes del VPH16 son más frecuentes, lo cual podría ser un reflejo de diferentes patrones migratorios ocurridos en estas regiones [8, 10, 11, 9]. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la composición étnica de esas poblaciones; por ejemplo, en Misiones, la mezcla genética medida con loci autosómicos es 13 % de nativo-americanos, 82 % europeos y 5 % africanos [12]. En el análisis de las secuencias concatenadas de los genes L1, E6 y E7 se confirmó la presencia de variantes del linaje A y D en nuestra población (**Anexo 7**).

El marco temporal para el origen de estas variantes indicó un  $t_{MCRA}$  de 119.103 años, una datación que es consistente con la aparición de humanos anatómicamente modernos (*Homo sapiens*) antes de su expansión fuera de África [13]. También se destacan dos eventos cronológicos adicionales; la emergencia del linaje D2 hace 21.421 años y el linaje A con un  $t_{MCRA}$  de 41.793 años. Los valores medios de estos  $t_{MCRA}$  fueron similares a los estimados con los linajes de ADN $mt$  de poblaciones nativo-americanas y europeas [14, 15]. Por lo tanto, las variantes de VPH16 del linaje D2 podrían haber evolucionado en asociación con las poblaciones nativo-americanas, mientras que las variantes del VPH16 del linaje A probablemente fueron introducidas a Misiones durante la colonización española (siglo XV) y la posterior inmigración europea en el siglo XIX [11].



**Figura 4.1. Análisis filogenético y datación molecular de las variantes de VPH16.** Línea de tiempo: el eje de las X indica años transcurridos. Los valores posteriores probables ( $\geq 0,89$ ) se muestran junto a las ramas. Los valores HPD 95 % para el  $t_{ACMR}$  se muestran en las áreas sombreadas. Secuencias referencia en negro.

### Oncogen E6

La caracterización genética del gen E6 se muestra en la **Tabla 4.4**. Se identificaron once secuencias diferentes, seis de las cuales presentaron cambios no sinónimos en los aminoácidos L83V, R10G, D25N, D25H y F69L. La variante más común fue E6 350G o L83V (58,9 %, 66/112), la cual se encontró en frecuencia única (57,9 %) o en combinación con los cambios de aminoácidos diagnósticos del Linaje D: Q14H, F78Y, L83V (4,5 %).

**Tabla 4.4: Caracterización genética del gen E6 y la secuencia proteica del mismo en muestras de cuello uterino de Misiones.**

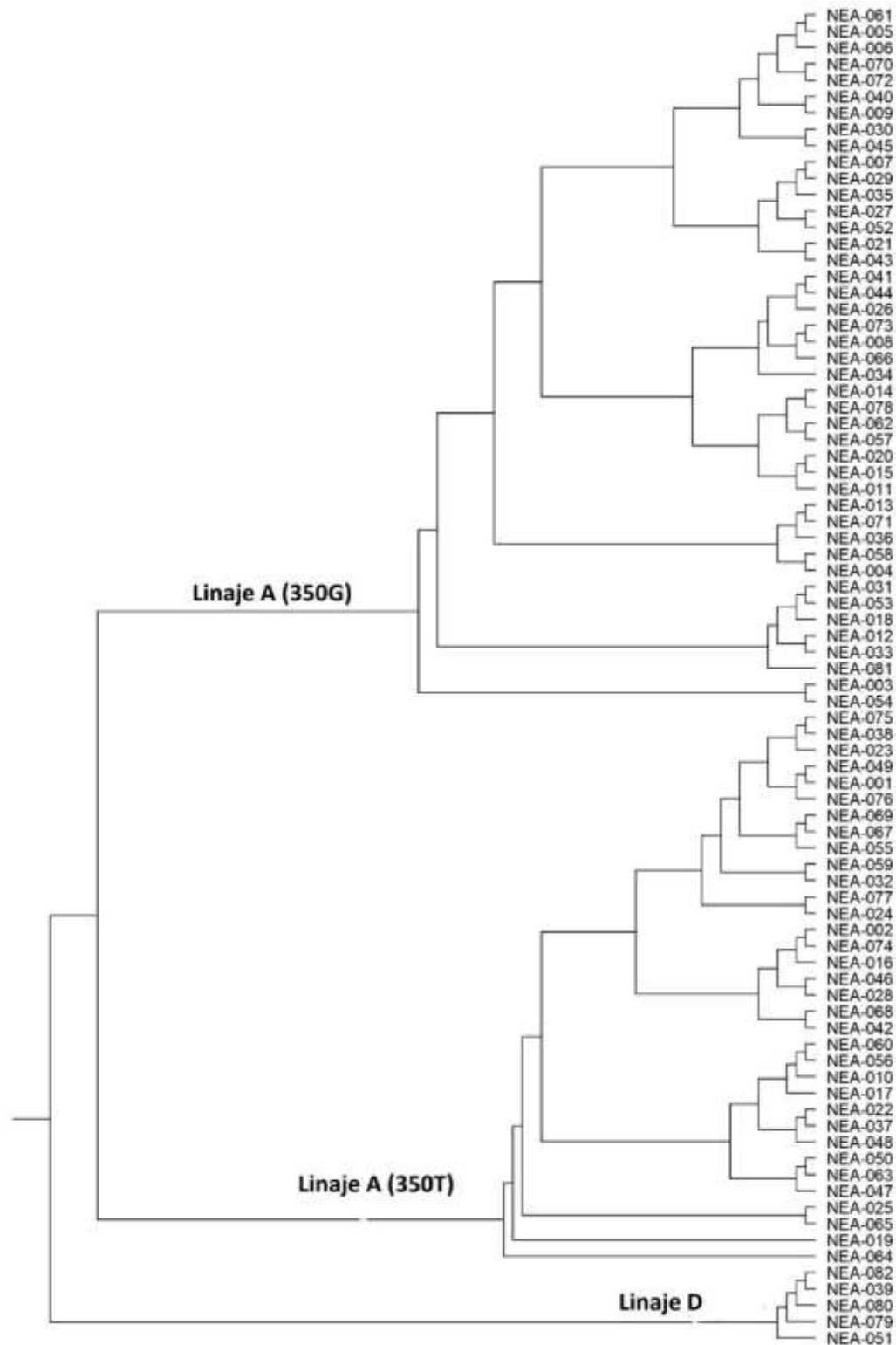
| Ref     | 1 1 1 1 2 2 2 3 3 3 4 5 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Proteína | Citología (Pap)   |      |      |       |       |
|---------|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----------|-------------------|------|------|-------|-------|
|         | T                       | A | G | G | G | T | A | T | C | T | A |          | A                 | NLIM | LSIL | HSIL+ | Total |
| NEA-001 | .                       | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .        | Prototipo         | 15   | 16   | 11    | 42    |
| NEA-003 | C                       | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | .        | L83V              | 0    | 1    | 1     | 2     |
| NEA-004 | .                       | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | .        | L83V              | 13   | 28   | 16    | 57    |
| NEA-034 | .                       | . | . | C | . | . | . | . | . | G | . | .        | D25H L83V         | 0    | 1    | 0     | 1     |
| NEA-036 | .                       | . | . | . | A | . | . | . | . | G | . | .        | L83V              | 0    | 1    | 0     | 1     |
| NEA-039 | .                       | . | T | . | . | A | G | . | T | G | . | G        | Q14H F78Y<br>L83V | 0    | 0    | 4     | 4     |
| NEA-049 | .                       | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | .        | Prototipo         | 0    | 0    | 1     | 1     |
| NEA-051 | .                       | . | T | . | . | A | G | . | T | G | . | .        | Q14H F78Y<br>L83V | 0    | 0    | 1     | 1     |
| NEA-059 | .                       | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | .        | F69L              | 1    | 0    | 0     | 1     |
| NEA-064 | .                       | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .        | R10G              | 0    | 1    | 0     | 1     |
| NEA-065 | .                       | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | .        | D25N              | 0    | 1    | 0     | 1     |
| Total   |                         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 29       | 49                | 34   | 112  |       |       |

La secuencia del prototipo se indica como referencia (NC-001526). Las posiciones de los nucleótidos para los SNPs se encuentran en la parte superior de la tabla. La posición del cambio de aminoácidos se indica numéricamente. La letra que precede a este número se refiere al aminoácido de referencia y la letra siguiente se refiere a su sustitución. Número de acceso a GenBank en **Anexo 6**.

La filogenia de E6 se muestra en la **Figura 4.2**. La topología del árbol indicó que las muestras de Misiones pertenecían a tres ramas principales, que incluyeron linaje A E6 350G (54,4 %) y E6 350T (41,1 %) y D (4,5 %). La frecuencia de E6 350G fue similar a la reportada en estudios previos en la población urbana de la ciudad de Córdoba (67 %) [16], poblaciones indígenas guaraníes de Misiones (50 %) [17] y descendientes de quechuas de Jujuy (> 60%) [18].

El polimorfismo E6 350G fue una mutación recurrente, habiendo ocurrido en paralelo en estos diferentes linajes. Desde un punto de vista evolutivo, el polimorfismo E6 350G es una homoplasia que surgió de forma independiente a lo largo de diferentes linajes de VPH16; en nuestra población ocurre en asociación con muestras de los Linajes A y D, lo cual es consistente con informes anteriores [19].

Finalmente, se identificaron otros polimorfismos no sinónimos en el gen E6 (R10G, D25N, D25H y F69L), aunque ocurrieron en baja frecuencia (<5 %); en consecuencia, la implicancia biológica o funcional de estas mutaciones sigue sin dilucidarse aún.



**Figura 4.2. Relaciones evolutivas de los aislados del oncogen E6 del VPH16 de Misiones.** La historia evolutiva del gen E6. Este cladograma se concluyó mediante inferencia bayesiana. Las muestras de Misiones tienen el prefijo “NEA” en su etiqueta. La naturaleza recurrente de la mutación E6 350G a lo largo de diferentes ramas de la evolución de VPH16 (homoplasia) se muestra en los nodos del árbol.



## Oncogen E7

La caracterización genética del gen E7 se muestra en la **Tabla 4.5**. Se identificaron cinco secuencias diferentes, de las cuales dos variantes fueron no sinónimas, H51N (4,2 %) y G88R (1,0 %), ambas anotadas previamente. La oncoproteína prototipo E7 fue la más frecuente, encontrada en el 94,6 % (88/93) de las muestras, la sustitución H51N se encontró en el 4,3 % (4/93), y la sustitución G88R en el 1,1 % (1/93).

**Tabla 4.5. Caracterización genética del gen E7 y la secuencia proteica del mismo en muestras de cuello uterino de Misiones.**

| Ref     | 6 7 7 7 7 8 |   |   |   |   |   | Proteína  | Citología (Pap) |      |       |       |
|---------|-------------|---|---|---|---|---|-----------|-----------------|------|-------|-------|
|         | G           | C | T | T | T | G |           | NLIM            | LSIL | HSIL+ | Total |
| NEA-001 | .           | . | . | . | . | . | Prototipo | 22              | 34   | 28    | 84    |
| NEA-012 | .           | . | . | . | . | C | H51N      | 2               | 0    | 2     | 4     |
| NEA-039 | .           | . | C | C | G | . | Prototipo | 0               | 0    | 3     | 3     |
| NEA-064 | .           | A | . | . | . | . | G88R      | 0               | 1    | 0     | 1     |
| NEA-114 | C           | . | . | . | . | . | Prototipo | 1               | 0    | 0     | 1     |
| Total   |             |   |   |   |   |   |           | 25              | 35   | 33    | 93    |

La secuencia del prototipo se indica como referencia (NC-001526). Las posiciones de los nucleótidos para los SNPs se encuentran en la parte superior de la tabla. La posición del cambio de aminoácidos se indica numéricamente. La letra que precede a este número se refiere al aminoácido de referencia y la letra siguiente se refiere a su sustitución. Número de acceso a GenBank en **Anexo 6**.

Debido a su baja variabilidad no se realizaron estudios filogenéticos sobre este gen. Esta baja variabilidad podría explicarse por la importancia de la función del gen E7; es fundamental en las primeras fases del ciclo viral, en particular para la amplificación del genoma cuando el ADN episomal del virus se está replicando [20, 21]. Otros estudios han sugerido que la conservación de E7 es necesaria para proseguir hacia la carcinogénesis [22]. Este es el primer estudio que presenta secuencias de E7 de poblaciones argentinas, y se encuentra en acuerdo con la hipótesis sobre su conservada función viral.

## Gen L1

La caracterización genética del gen L1 se muestra en la **Tabla 4.6**. Se identificaron 33 secuencias diferentes, de las cuales 28 presentaron cambios no sinónimos. Dos secuencias exhibieron los polimorfismos diagnósticos del linaje D: H76Y T176N N181T T266A T353P T389S L474F (3,53 %). La variante más frecuente fue L1 A6434G o T266A (71,8 %, 61/85), encontrándose sola (58,8 %) o en combinación con otros cambios de aminoácidos (12,9 %); se obtuvieron resultados similares en estudios realizados en Asia [23, 24, 25] y Europa [26]; sin embargo, en contraste King *et al.* (2016) observaron el polimorfismo L1 6434G en 22,4 % de la población de estudios en los Países Bajos [27].

En la Argentina y América Latina se han realizado escasos estudios referidos a la variabilidad en el gen L1 y los llevados adelante emplearon fragmentos cortos del mismo, por lo cual esos datos no pudieron ser contrastados con el presente trabajo [28, 18, 17, 29, 30]. En el presente estudio se identificaron 72 sitios variables a lo largo del gen L1 (1500 pb), en donde los polimorfismos no sinónimos representaron el 53,5 % (38/72) del total de polimorfismos; este porcentaje es similar al encontrado por Mane *et al.* (2020) y levemente menor al encontrado por otros investigadores [24, 31, 32].

El estudio de la variación genética del gen L1 tiene un impacto muy importante en la eficacia de la vacunación y los *tests* diagnósticos basados en anticuerpos contra L1 [33, 23, 31]; sin embargo, la información al respecto es limitada y la mayoría de los estudios anteriores presentaban algunas limitaciones, como tamaños de muestra pequeños y/o fragmentos del gen de pocos pares de bases. En este estudio, se evaluó la variación genética del gen HPV16 L1 completo y mostró un alto grado de polimorfismos no sinónimos. En los casos de cáncer de cuello uterino inducido por el VPH, al integrarse al genoma del huésped, el VPH utiliza la maquinaria de replicación del ADN de la célula huésped que se caracteriza por una alta fidelidad, capacidad de corrección de errores y mecanismos de reparación posteriores a la replicación; por lo tanto, los errores que podrían cometer estas polimerasas no pueden explicar el alto nivel de mutaciones encontradas en el genoma L1, sugiriendo por ende un mecanismo de interacción que le da al virus la oportunidad de escapar de la inmunidad del huésped [33, 31]. Así, comprender la variabilidad genética del gen L1 es de suma relevancia debido a que la presión inmunológica selectiva en una población podría resultar en el desplazamiento selectivo de algunas variantes, ya sea inducida por la vacunación y/o por la inmunidad natural de la mujer [27, 31].



Continuación Tabla 4.6.

| Ref     | Genotipo |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Citología (Pap) |   |  |      |      |       |       |
|---------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------------|---|--|------|------|-------|-------|
|         | A        | A | G | C | T | A | C | T | C | T | C | C | G | A | C | T | A | A | A | G               | A | Proteína                                 | NLIM | LSIL | HSIL+ | Total |
| NEA-002 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | REF                                      | 3    | 4    | 5     | 12    |
| NEA-009 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    | 2    |      |       | 2     |
| NEA-010 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | .               | . | REF                                      |      |      | 1     | 1     |
| NEA-013 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | G172R T193A T266A                        |      |      | 1     | 1     |
| NEA-016 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | REF                                      |      | 1    |       | 1     |
| NEA-019 | C        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    |      | 1    |       | 1     |
| NEA-024 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | N58T N285T                               |      |      | 1     | 1     |
| NEA-027 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | C | G | . | . | .               | . | K278N T266A P295R F468S L469F            |      | 1    |       | 1     |
| NEA-030 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | .               | . | T266A                                    | 1    |      |       | 1     |
| NEA-039 | .        | C | . | . | . | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A T353P T389S                        |      |      | 1     | 1     |
| NEA-040 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | N131H T266A                              |      |      | 1     | 1     |
| NEA-043 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    |      |      | 1     | 1     |
| NEA-044 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | G114C T266A                              |      |      | 1     | 1     |
| NEA-046 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    | 4    | 1    |       | 5     |
| NEA-056 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | S302Y                                    |      | 1    |       | 1     |
| NEA-057 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A S288R V300G                        |      | 1    |       | 1     |
| NEA-063 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | REF                                      |      | 1    |       | 1     |
| NEA-064 | .        | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    |      | 1    |       | 1     |
| NEA-065 | C        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T203A G204D F205S T266A                  |      | 1    |       | 1     |
| NEA-066 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A K278Q S296N                        |      | 1    |       | 1     |
| NEA-068 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | REF                                      | 2    |      |       | 2     |
| NEA-069 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    | 1    |      |       | 1     |
| NEA-074 | .        | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | R74K G114C D127N N131H R144K T266A Y418D |      |      | 1     | 1     |
| NEA-075 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    |      | 1    |       | 1     |
| NEA-077 | C        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    | 1    | 2    | 1     | 4     |
| NEA-079 | .        | C | A | . | . | T | T | . | T | . | . | T | A | . | . | . | . | . | . | T               | . | H76Y T176N N181T T266A T353P T389S L474F |      |      | 1     | 1     |
| NEA-080 | .        | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | L364V                                    |      | 1    |       | 1     |
| NEA-081 | .        | C | A | . | . | T | T | . | T | . | . | T | A | . | . | . | . | . | . | T               | . | H76Y T176N N181T T266A T353P T389S L474F |      |      | 2     | 2     |
| NEA-087 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    | 13   | 10   | 8     | 31    |
| NEA-093 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T193P S280F                              | 1    |      |       | 1     |
| NEA-095 | .        | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | D273A C379R                              |      | 1    |       | 1     |
| NEA-098 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | S288R                                    |      | 1    |       | 1     |
| NEA-119 | .        | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .               | . | T266A                                    | 1    |      | 1     | 2     |
| Total   |          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                 |   | 29                                       | 30   | 26   | 85    |       |

### Continuación Pie de Tabla 4.6

La secuencia del prototipo se indica como referencia (NC-001526). Las posiciones de los nucleótidos para los SNPs se encuentran en la parte superior de la tabla. La posición del cambio de aminoácidos se indica numéricamente. La letra que precede a este número se refiere al aminoácido de referencia y la letra siguiente se refiere a su sustitución.

## 4.3. Implicancia clínica de las variantes de VPH16

### Linajes de VPH16

Se analizaron un total de 116 secuencias de la LCR viral, que representaban 16 individuos NLIM, 62 L-SIL, 16 HSIL, 10 CIS y 12 ISCC. Las medidas de tendencia central para cada grupo fue la siguiente: NLIM = media 28,7 años (DE = 8,8; rango 19–52; mediana 27; moda 22); L-SIL = media 27,1 años (DE = 7,0; rango 187–54; mediana 26; moda 29); HSIL+ = media 39,3 años (DE = 11,6; rango 20–65; mediana 39; moda 30); y población total = media 31,5 años (DE = 10,7; rango 18-65; mediana 29).

En la **Tabla 4.7** se muestra el análisis de asociación de las variantes de VPH16 según el examen de citología de Papanicolau. El valor de RP mostró una asociación significativa con el estadio HSIL+ con una RP de 13,8 (1,6 - 117,0).

**Tabla 4.7. Distribución de variantes de acuerdo al diagnóstico de Pap y cálculo de razón de probabilidades (RP).**

|          | NLIM | L-SIL | HSIL+ <sup>(a)</sup> | R.P. <sup>(b)</sup> | 95 % IC     |
|----------|------|-------|----------------------|---------------------|-------------|
| Linaje A | 16   | 61    | 31                   | 1                   | Referencia  |
| Linaje D | 0    | 1     | 7                    | 13,8                | (1,6–117,0) |

(a) HSIL+ incluye HSIL, CIS and CCI.

(b) La categoría NLIM no fue incluida en el análisis debido a que no se registró valor para el linaje D.

Estudios anteriores sobre la variación del VPH16 en Argentina se han centrado en poblaciones nativo-americanas, y debido a los tamaños de muestra limitados, no se abordó un estudio de asociación entre las variantes del VPH16 y el desarrollo del cáncer de cuello uterino [28, 18, 17, 34]. En nuestra población, a pesar de la baja frecuencia de variantes de VPH16 del linaje D, la infección de éstas se asoció más frecuentemente con lesiones de alto grado y cáncer que las variantes de VPH16 del linaje A [RP 13,8 (1,6-117,0)]. Estas variantes

se han asociado con el riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino invasivo en otros países latinoamericanos como México [35], Costa Rica [36, 37] y Brasil [8, 38], pero no en países europeos [39, 40, 41]. La existencia de datos contradictorios sobre el vínculo entre las variantes del linaje D y el riesgo de enfermedad puede ser explicado por la composición étnica de la población objeto de estudio [39, 40, 41]. En comunidades europeas que son étnicamente homogéneas, la falta de asociación puede deberse al predominio abrumador de variantes del VPH16 del linaje A, que a su vez no permite una evaluación adecuada del riesgo asociado con las infecciones por variantes del VPH16 no europeas (Linajes B, C y D) [42].

Por otro lado, estudios en poblaciones más diversas, como las de América del Norte y América Latina, han indicado que las variantes del linaje D son más agresivas que las del linaje A, con un riesgo de 2 a 9 veces mayor de padecer lesiones precursoras de alto grado y cáncer de cuello uterino [36, 35, 38, 43]. Por lo tanto, las diferencias observadas en la distribución de las variantes del VPH16 en todo el mundo y sus riesgos relativos de cáncer de cuello uterino parecen depender en parte de la constitución genética de la población y de otros factores, incluyendo la genética viral y la coevolución viral dentro de grupos étnicos humanos [44, 36, 45, 46, 47, 48, 49, 50].

### ***Oncogen E6***

Se analizaron 112 secuencias del gen E6 procedentes de 29 individuos NLIM, 48 L-SIL y 35 HSIL+. La distribución de edad para cada grupo fue la siguiente: NLIM = media 28,6 años (DE = 7,8; rango 19-52; mediana 27; moda 22); L-SIL = media 31 años (DE = 9,9; rango 18-54; mediana 29; moda 29); HSIL+ = media 36,6 años (DE = 11,7; rango 18-61; mediana 33; moda 29); y población total = media 31,5 años (DE = 10,7; rango 18-61; mediana 29; moda 29). La distribución por edad fue estadísticamente significativa entre los grupos de estudio ( $p = 0,005$ ) y, por lo tanto, se realizó el ajuste por edad para el análisis de asociación.

En la **Tabla 4.8.** se muestra el análisis de asociación de las variantes de E6 350G según el examen de citología de Papanicolau. El valor de RP para el modelo progresivo mostró una tendencia positiva con una RP de 1,74 (0,84-3,64) y una asociación significativa con el estadio HSIL+ con una RP de 19,41 (4,95 - 76,10). Debido a sus bajas frecuencias (<5 %), no se analizaron otros polimorfismos.

**Tabla 4.8. Análisis de asociación entre el SNP E6 350G y las lesiones cervicales.**

| VPH16    | NILM | LSIL | HSIL+ | RP <sup>(1)</sup>           | 95 % IC             | RP <sup>(2)</sup>           | 95 % IC             |
|----------|------|------|-------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| E6 350 T | 16   | 18   | 12    | 1                           | Referencia          | 1                           | Referencia          |
| E6 350 G | 13   | 30   | 18    | 1,74 <sup>(a)</sup>         | (0,84–3,64)         | 1,47 <sup>(a)</sup>         | (0,69–3,10)         |
|          |      |      |       | 2,76 <sup>(b)</sup>         | (0,79 – 9,66)       | 2,92 <sup>(b)</sup>         | (0,82 – 10,32)      |
|          |      |      |       | <b>19,41 <sup>(c)</sup></b> | <b>(4,95-76,10)</b> | <b>22,72 <sup>(c)</sup></b> | <b>(5,62-91,75)</b> |

(1) Regresión logística ordinal ajustada por edad; (2) Regresión logística ordinal ajustada por edad y Linaje: (a) General para la progresión NLIM -LSIL-HISL +; (b) punto de corte: LSIL versus NLIM; (c) punto de corte: HSIL + versus NLIM.

Este valor de RP es superior al descrito por Cornet *et al.* (2013) para la Argentina (RP de 5,81; IC95 % = 1,64-21,12) y América Central y del Sur (RP de 4,69; IC95 % = 2,07-10,66), pero confirma la potencial asociación entre la variante E6 350G y el riesgo de desarrollo de cáncer cervical, concordando con los resultados de Hildesheim *et al.* (2001) y Andersson *et al.* (2000) que postularon que esta variante era más agresiva, actuando como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer de cuello de útero y agregando evidencia de apoyo para el papel de E6 350G en el desarrollo de cáncer de cuello uterino en América Latina [50, 36, 51].

Sin embargo, esta asociación no está respaldada en poblaciones de Europa y Asia Central (RP de 0,42; IC del 95% = 0,27-0,64) [50]. La razón por la cual no existe una relación entre el polimorfismo E6 350G y el riesgo de enfermedad en las poblaciones europeas y asiáticas no ha sido resulta aún, pero a pesar de ello varios autores proponen que su asociación al riesgo depende de las diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas [44, 18, 40, 52, 50, 42].

Por ejemplo, los primeros estudios mostraron que este polimorfismo no era frecuente en poblaciones de África y el sudeste asiático [53, 54]. Por lo tanto, es probable que las asociaciones descritas dependan de la población [50], lo que significa que cualquier extrapolación de nuestros resultados a otras poblaciones o regiones geográficas debe tomarse con precaución. En África y el sudeste asiático este polimorfismo no era frecuente según estudios realizados en poblaciones de esas regiones [53, 54]. Por lo tanto, es probable que las asociaciones descritas dependan de la constitución genética de la población [50], lo que implica que cualquier extrapolación de nuestros resultados a otras poblaciones debe tomarse con precaución.

Significativamente, los estudios *in vitro* han demostrado que los queratinocitos infectados con E6 350G presentan una mayor capacidad de transformación celular en comparación con el oncogen prototípico E6 350T, independientemente del linaje [52]. E6 350T activa la vía MAPK a través de *Ras*, mientras que la variante E6 350G mejora la señalización de MAPK a través de *Rap1* [26].

Finalmente, no se evaluó la asociación de los polimorfismos no sinónimos E6 A131G (R10G), E6 G176A (D25N), E6 G176C (D25H) ya que ocurrieron en baja frecuencia (<5%); estos polimorfismos si bien se encontraron en el grupo de casos, solo se localizaron en pacientes con lesiones de bajo grado. Estudios *in vitro* han encontrado que la variante E6 176T regula negativamente la E-cadherina para facilitar una transición epitelial a mesenquimal [55]. Con respecto a la mutación E6 131G ocurre en el extremo N-terminal de la proteína, la cual es crucial para la unión y degradación de p53 [56]. Otros ensayos *in vitro* sugieren que las células infectadas con variantes de VPH16 E6 131G y E6 350G muestran apoptosis tardía cuando se suspenden en un medio semisólido en relación con aquellas con solo el polimorfismo de E6 350G, pudiendo estar este hallazgo relacionado con la transmisión viral diferencial y la diseminación en el tejido [57]. Otros estudios informaron que la variante E6 131G es relativamente frecuente en el carcinoma de células escamosas de amígdalas orales en comparación con el cáncer de cuello uterino (19 % y 4 %, respectivamente), lo que plantea nuevos interrogantes sobre la inducción de tumores tisulares y el desarrollo de otros tipos de cánceres por VPH [56].

### **Gen L1**

Se analizaron 88 secuencias del gen L1 que representaron 28 individuos NLIM, 33 L-SIL y 27 HSIL+. La distribución de edad para cada grupo fue la siguiente: NLIM = media 28,1 años (DE = 7,9; rango 19-52; mediana 26; moda 20); L-SIL = media 26,8 años (DE = 7,7; rango 18-54; mediana 26; moda 22); HSIL+ = media 32,5 años (DE = 10,7; rango 18-61; mediana 30; moda 29); y población total = media 29,1 años (DE = 9,1; rango 18-61; mediana 27; moda 22).

En la **Tabla 4.9**. se observa la frecuencia de las variantes de L1 6434G en función del examen de citología de Papanicolaou y el análisis de asociación. El valor de RP no mostró una asociación significativa entre la presencia del polimorfismo L1 6434G con el estadio HSIL+ [RP= 1,54 (0,45 – 5,2)].



**Tabla 4.9. Análisis de asociación entre el SNP L1 6434G y lesiones cervicales.**

| VP16     | NLIM | LSIL | HSIL+ | RP <sup>(1)</sup>   | 95 % IC       |
|----------|------|------|-------|---------------------|---------------|
| L1 6434A | 6    | 13   | 8     | 1                   | Referencia    |
| L1 6434G | 22   | 20   | 19    | 2,38 <sup>(a)</sup> | (0,76–7,46)   |
|          |      |      |       | 1,54 <sup>(b)</sup> | (0,45 – 5,25) |

(1) Regresión logística ajustada por edad: (a) punto de corte: LSIL versus NLIM; (b) punto de corte: HSIL + versus NLIM.

La información existente en relación al riesgo entre los polimorfismos presentes en el gen L1 y el desarrollo de lesiones o cáncer es escasa o inexistente; en el presente estudio no se encontró asociación entre el polimorfismo L1 6434G y la prosecución de la enfermedad; en concordancia con nuestros datos, el estudio realizado por Mane *et al.* (2020) que evaluó la asociación de los polimorfismos de L1 con el riesgo de lesiones cervicales, obtuvo un resultado similar [RP= 2,31 (0,87 – 6,14); p=0,091] [32].

Los polimorfismos A6189C (N181T), A6695C (T353P) y A6803T (T398S) si bien ocurrieron en baja frecuencia (<5 %) solo se encontraron dentro del grupo HSIL+, impidiendo establecer un RP de asociación; sin embargo, esto podría indicar una tendencia entre estos polimorfismos y el riesgo de desarrollar lesiones precursoras y cáncer. Asimismo, la información acerca del riesgo patológico y potencial carcinogénico de estos polimorfismos no sinónimos es escasa; en este contexto Mane *et al.* (2020) observaron que las sustituciones de N181T/I [RP= 4,39 (1,16-16,67); p=0,029], T353P [RP= 3,57 (1,07-11,86); p=0,037] y T389S [RP= 3,93 (1,02-15,06); p=0,046] estaban asociadas con la enfermedad cervical de grado alto en comparación con el estado cervical normal o de bajo grado [32].

#### 4.4. Caracterización de la estructura de las proteínas E6, E7 y L1

##### **Proteína E6**

La caracterización de la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 se muestra en la **Tabla 4.10**. Se obtuvieron 7 secuencias proteicas para E6. La búsqueda en Blastp indicó que todas las proteínas caracterizadas se encontraban reportadas en base de datos (**Anexo 8**).

**Tabla 4.10. Variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 del VPH16.**

|         | 1 | 1 | 2 | 6 | 7 | 8 |
|---------|---|---|---|---|---|---|
|         | 0 | 4 | 5 | 9 | 8 | 3 |
| Sec/Ref | R | Q | D | F | H | L |
| NEA-001 | . | . | . | . | . | . |
| NEA-004 | . | . | . | . | . | V |
| NEA-034 | . | . | H | . | . | V |
| NEA-051 | . | H | . | . | Y | V |
| NEA-059 | . | . | . | L | . | . |
| NEA-064 | G | . | . | . | . | . |
| NEA-065 | . | . | N | . | . | . |

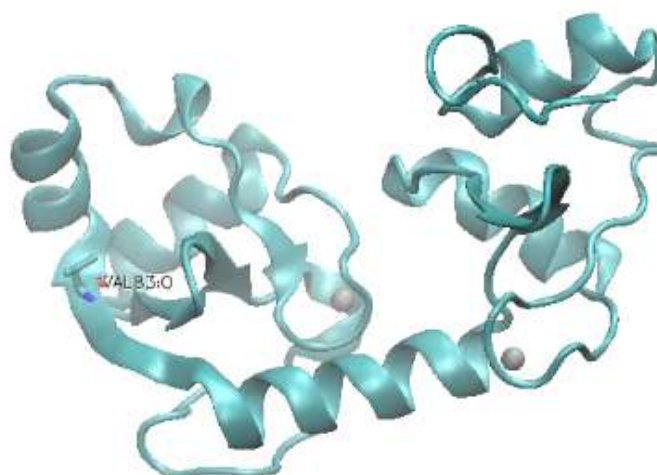
La secuencia del prototipo se indica como referencia (NC-001526). Las posiciones de las sustituciones aminoacídicas se encuentran en la parte superior de la tabla.

En la **Tabla 4.11.** se observa el resumen de los residuos conservados identificados a través PFAM. Brevemente, se confirmó la presencia de cuatro elementos CxxC que conforman dos dominios de unión al átomo de zinc [58], con sus residuos altamente conservados. Por otra parte, los polimorfismos descritos en la tabla 4.10. no afectaron estas regiones conservadas.

**Tabla 4.11. Residuos conservados de la familia de proteínas E6.**

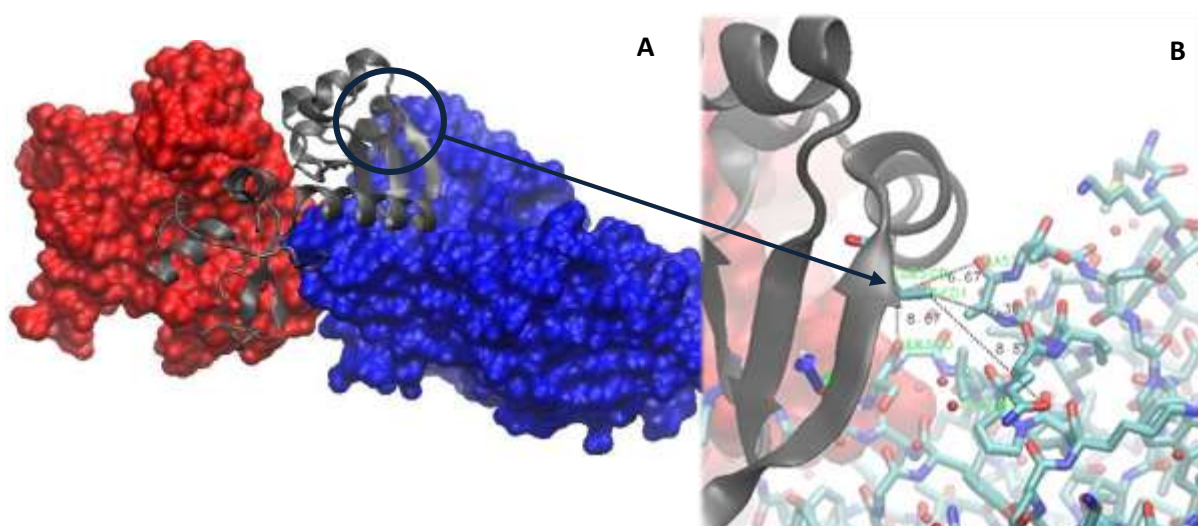
| Familia de proteína | Residuos conservados   | Dominios   |
|---------------------|--|--|
| E6                  | CxxC posiciones 1 a 4; 34 a 37; 74 a 77 y 107a 110.<br><br>Arg73 | RLR_CTR RIG-I-like receptor (RLR)<br>C-terminal regulatory (CTR) domain:<br>dominio de unión al zinc |
|                     |  | LIM_DOMAIN_2   |

El modelado de la estructura terciaria de la proteína E6 se muestra en la **Figura 4.3.** En la misma se observa el polimorfismo 83V ubicado en la proximidad de un bolsillo hidrofóbico formado por los dos dominios de unión a los átomos de zinc y una hélice alfa de enlace y descrito como el sitio de unión a E6AP [59].



**Figura 4.3. Estructura esquemática de un modelo por homología de la proteína E6 del VPH16.** VAL83, Valina en la posición 83; Gris, iones zinc.

Debido al rol de riesgo establecido entre 83V y el desarrollo de cáncer se analizaron las posibles interacciones del residuo 83 de E6 con su principal blanco la ubiquitina E6AP mediante el modelado de la estructura ternaria y se muestra en la **Figura 4.4.A**. Brevemente, las distancias en amstrong ( $\text{\AA}$ ) entre las cadenas laterales del residuo 83 y los residuos cercanos de E6AP fueron mayores a  $6 \text{\AA}$  (**Figura 4.4.B**), indicando que no se pueden establecer una interacción electrostática entre estos residuos. En este sentido el cambio de Leucina por Valina no modifica la interacción entre ambas proteínas.



**Figura 4.4. Estructura esquemática de un modelo por homología del complejo ternario VPH16 E6/E6AP/p53.** **A:** complejo ternario, Azul: E6AP; Gris: E6; Rojo: p53; Círculo: Valina en la posición 83. **B:** líneas discontinuas negras indican la distancia en  $\text{\AA}$  entre la cadena lateral de la Valina del residuo 83 y la ubiquitina E6AP.

A pesar de que la sustitución de una Leucina por una Valina en la posición 83 no afecta directamente la unión con E6AP podría aportar flexibilidad a la cadena polipeptídica en este sitio y aumentar la afinidad de unión de E6 con la ubiquitin ligasa E6AP y otras proteínas con motivos LxxLL. Al ser la Valina un aminoácido neutro apolar al igual que la Leucina esta mutación conservativa no interferiría con el ambiente hidrofóbico necesario para la interacción con el motivo ácido LxxLL, dado que por lo general en las proteínas con mutaciones conservativas siguen teniendo la misma función [60]. En su trabajo Saldaño (2018) confirmó que las mutaciones en residuos que están cercanos a los residuos claves alteran la afinidad por el sustrato y la actividad catalítica. El sitio de unión de E6 con E6AP ha sido objeto de ensayos *in silico* para el diseño de inhibidores en el tratamiento del cáncer cervical [61, 62, 63]; por lo tanto, sería de clave la evaluación de la variabilidad regional de la proteína E6 y el efecto de las sustituciones aminoacídicas en el diseño de compuestos terapéuticos.

Asimismo, la proteína E6 interactúa con muchas proteínas celulares relacionadas con las vías del cáncer interactuando con motivos ácidos LxxLL, entre ellas la ubiquitina ligasa e6Ap [59] por lo que el riesgo asociado a la variante E6 83V influir en otros blancos distintos de E6AP.

### Proteína E7

La caracterización de la secuencia de aminoácidos de la proteína E7 se muestra en la **Tabla 4.12**. Se obtuvieron 3 secuencias proteicas para E7. La búsqueda en Blastp indicó que todas las proteínas caracterizadas se encontraban reportadas en base de datos (**Anexo 8**).

**Tabla 4.12. Variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína E7 del VPH16.**

|         | 3 | 5 | 8 |
|---------|---|---|---|
|         | 3 | 1 | 8 |
| Sec/Ref | E | H | G |
| NEA-001 | . | . | . |
| NEA-012 | . | N | . |
| NEA-064 | . | . | R |

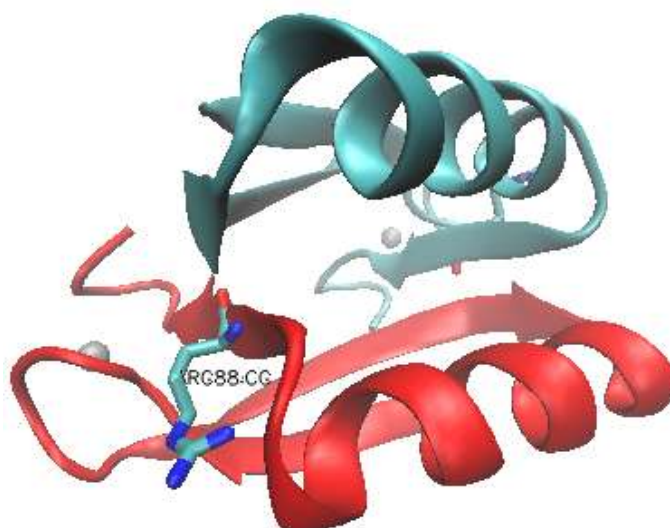
La secuencia del prototipo se indica como referencia (NC-001526). Las posiciones de las sustituciones aminoacídicas se encuentran en la parte superior de la tabla.

En la **Tabla 4.13**. se muestra el resumen de los residuos conservados identificados a través PFAM. Brevemente, se confirmó la presencia de dos elementos CxxC que conforman un dominio de unión al zinc, con sus residuos altamente conservados [64]. Por otra parte, los polimorfismos descritos en la tabla 4.12. no afectaron estas regiones conservadas.

**Tabla 4.13. Residuos conservados de la familia de proteínas E7.**

| Familia de proteína | Residuos conservados   | Dominios          |
|---------------------|--|-------------------|
| E7                  | CxxC posiciones 57 a 60 y 90 a 93<br>Gly1<br>Try51<br>Leu posiciones 81 y 86 | PDZ binding motif |

El modelado de la estructura terciaria de la proteína E7 se muestra en la **Figura 4.5**. En la misma se observa la estructura dimérica de E7.



**Figura 4.5. Estructura esquemática de un modelo por homología del dímero VPH16 E7.**

Cian: monómero A; Rojo: monómero B; Gris: ion zinc; Espirales: hélices alfa; Cintas aplanadas: láminas beta; Cordones: bucles.

La secuencia de la proteína E7 es muy conservada, y solo se observaron 2 sustituciones aminoacídicas en la población estudiada. Ninguno de los polimorfismos encontrados en las secuencias de nuestra población se corresponde a sitios conservados dentro de la familia, como ser el dominio *LxCxE* responsable de la alta afinidad de unión a la pRb, o el motivo *CxxC* responsable de la unión a átomos de Zinc esencial para la formación de la estructura dimérica o multimérica de la proteína funcional [65, 64, 66]. El repertorio limitado de proteínas E7 es consistente en diferentes ubicaciones geográficas y poblaciones

étnicas, y describe características de selección purificadora [22]. Es importante señalar que las actividades oncogénicas de las proteínas E7 de alto riesgo constituyen funciones relacionadas con el ciclo de multiplicación viral para establecer a largo plazo una infección persistente y/o producir progenie viral [66], teniendo en cuenta el pequeño tamaño de esta proteína (98 aminoácidos), la secuencia podría representar la solución óptima para su función, admitiendo limitaciones evolutivas respecto a cambios en su secuencia [67].

### Proteína L1

La caracterización de la secuencia de aminoácidos de la proteína L1 se muestra en la **Tabla 4.14**. Se obtuvieron 18 secuencias proteicas para L1. De particular interés, la búsqueda de Blastp indicó que el 83 % de las proteínas caracterizadas no se encontraban reportadas en base de datos (**Anexo 8**). Lo que demuestra que la caracterización genética y vigilancia epidemiológica de este virus debe continuar.

**Tabla 4.14. Variación en la secuencia de aminoácidos de la proteína L1 del VPH16.**

| Sec/Ref     | N | R | H | G | D | N | N | R | G | T | N | T | T | G | F | D | T | D | K | S | N | S | P | S | V | S | T | L | C | T | Y | F | L | L |   |   |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NEA-002     | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-013 (*) | . | . | . | . | . | . | . | R | . | . | A | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-024 (*) | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-027 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | N | . | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | S | F |
| NEA-039 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | P | . | . | S | . | . | . | . |   |
| NEA-040 (*) | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-044 (*) | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-056 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-057 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | R | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |   |
| NEA-065 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | D | S | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-066 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | Q | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-074 (*) | . | K | . | C | N | H | . | K | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | . | . |
| NEA-079     | . | Y | . | . | . | . | . | . | N | T | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | P | . | S | . | . | . | . | F | . |
| NEA-080 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-087     | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-093 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | P | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-095 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . |
| NEA-098 (*) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

La secuencia del prototipo se indica como referencia (NC-001526). Las posiciones de las sustituciones aminoacídicas se encuentran en la parte superior de la tabla. Las secuencias marcadas con un (\*) no se encuentran reportadas.

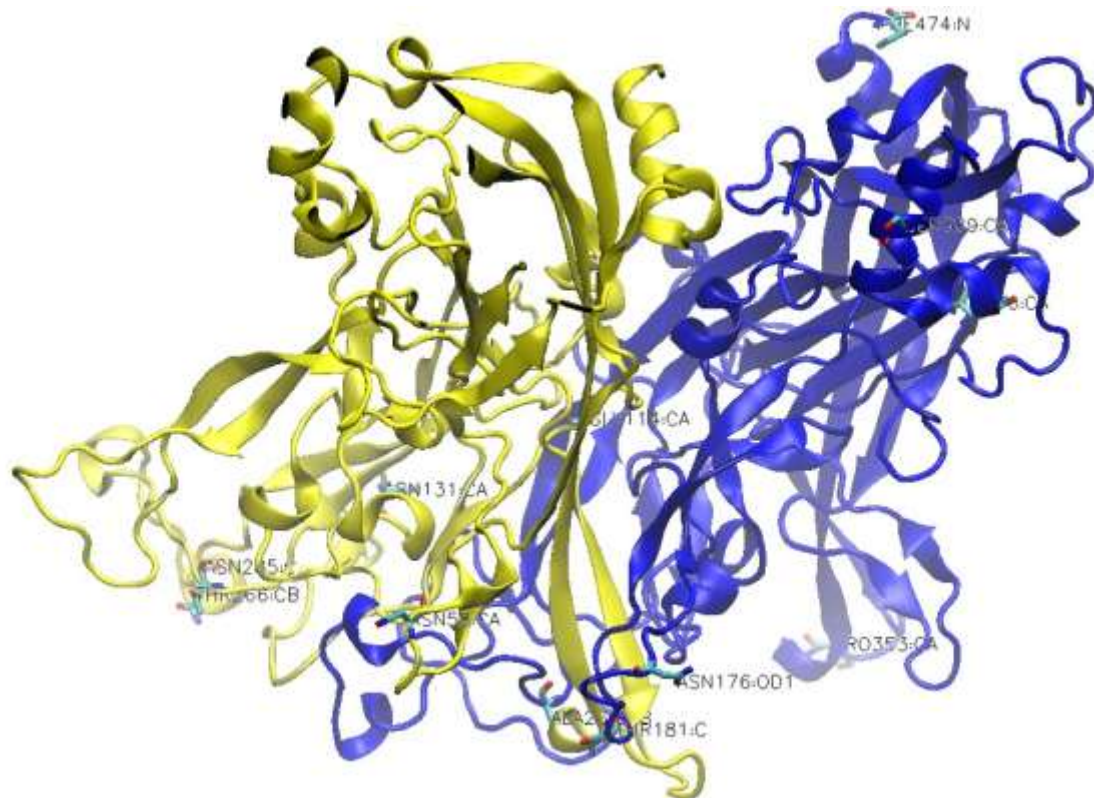
En la **Tabla 4.15.** se muestra el resumen de los residuos conservados identificados a través PFAM. Brevemente, Sólo se observaron polimorfismos en sitios conservados para los residuos en las posiciones 76 y 181 de la proteína L1, ambos pertenecientes al Linaje D.

**Tabla 4.15. Residuos conservados de la familia de proteínas L1.**

| Familia de proteína | Residuos conservados   | Dominios       |
|---------------------|--|----------------|
| L1                  | <p>Trp posiciones 1; 96; 165; 309; 322; 401 y 446</p> <p>Cys posiciones 171; 175; 181 y 428</p> <p>Pro posiciones 11; 45; 76; 108; 159; 182 y 228</p> <p>Gly Posiciones 43; 106; 110; 156; 162; 200; 202; 239; 261; 299; 315 y 319</p> <p>Tyr posición 418</p> <p>Arg posición 419</p> <p>Thr 129 y Thr340</p> | HOMEO_PROSPERO |

El modelado de la estructura terciaria de la proteína L1 se muestra en la **Figura 4.6.** En la misma se observa la interacción entre dos monómeros de la proteína L1 con las sustituciones aminoacídicas pertenecientes al linaje D, que se encuentran en los bucles superficiales y podrían funcionar como epítopes antigénicos.

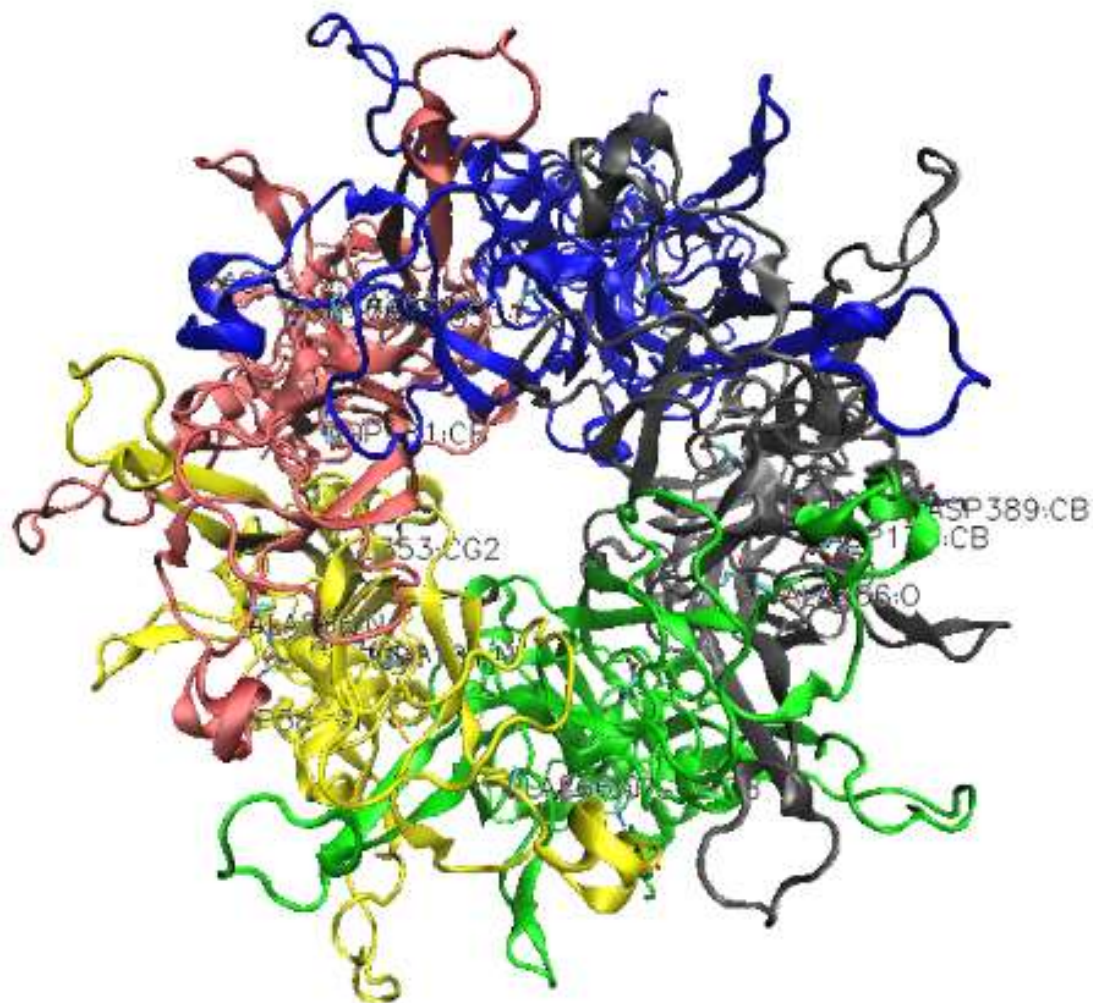
La sustitución más frecuente fue A266T ubicada en el bucle FG, seguida de las sustituciones T353P y T389S (4,7 %) ubicadas en el bucle HI y de las sustituciones H76Y, T176N, N181T (3,5 %) ubicadas en los bucles BC, EF, EF respectivamente. La sustitución H76Y reemplaza un aminoácido polar positivo por uno aromático y podría estabilizar la estructura del monómero L1 [32]. La sustitución T353P da como resultado el reemplazo de un aminoácido polar no cargado por un aminoácido alifático apolar en el bucle HI, que constituye un epítope inmunodominante. La sustitución T389S podría estabilizar la estructura del monómero L1, siendo un cambio evolutivo favorable para el VPH16 [32]; asimismo, Ning *et al.* (2017) concluyeron que se redujo la reactividad de los anticuerpos monoclonales para este polimorfismo de L1 [68].



**Figura 4.6. Estructura esquemática de un modelo por homología de la proteína L1 VPH16.** En la imagen se observa la interacción de dos monómeros de la proteína L1 con las sustituciones aminoacídicas pertenecientes al linaje D.

Debido a que la infección eficiente por HPV16 requiere la interacción de la proteína L1 con la matriz extracelular y los receptores celulares de superficie tipo heparán sulfato y que sitios de unión al receptor en la proteína L1 son conformacionales y consisten de más de un monómero de la proteína reunidos en la estructura cuaternaria [69], se analizaron mediante el modelado de las estructuras pentaméricas y se muestran en la **Figura 4.7.**





**Figura 4.7. Estructura esquemática de un modelo por homología de los pentámeros de proteína L1 del VPH16 en vista superficial.** Cada monómero de L1 está representado con un color. En la imagen pueden verse resaltados los polimorfismos pertenecientes al linaje D en los monómeros verde, amarillo y rojo.

Los residuos que se unen al receptor son 5 Lisinas altamente conservadas y varios residuos polares menos conservados; a través de estos residuos la cápside viral se une al receptor por medio de puentes de hidrógeno [69]. La Treonina 266 constituye uno de estos residuos polares, por lo cual la sustitución por Alanina, al ser apolar, participaría desfavorablemente en la unión a la matriz extracelular y a receptores celulares durante el proceso de infección, siendo protectora para el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, esta sustitución podría desestabilizar la estructura 3D y afectar la estabilidad del pentámero de L1 ya que da como resultado la pérdida de dos enlaces de hidrógeno con F360 y K361 de la cadena adyacente [32] y modificar el epítipo de las células T [70].

Los polimorfismos en los residuos 176N y 181T serían sustituciones conservativas, de un aminoácido polar a otro, no interfiriendo en las interacciones con la matriz y los receptores, considerándose que estas sustituciones podrían estabilizar la estructura del monómero L1 [32]. La sustitución 353P puede tener un efecto sobre la estructura o función de la proteína L1 al desestabilizar la estructura 3D y afectar la estabilidad del pentámero por la pérdida de un enlace de hidrógeno con el residuo E26 del pentámero adyacente [71, 32, 70].

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] C. Williams, F. Pontén, C. Moberg, P. Söderkvist, M. Uhlén, J. Pontén, G. Sitbon y J. Lundeberg, «A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens,» *Am J Pathol.*, vol. 155, nº 5, pp. 1467-71, Nov 1999.
- [2] P. Carbonell, M. Turpin, D. Torres-Moreno, I. Molina-Martínez, J. García-Solano, M. Perez-Guillermo y P. Conesa-Zamora, «Comparison of allelic discrimination by dHPLC, HRM, and TaqMan in the detection of BRAF mutation V600E,» *J Mol Diagn.*, vol. 13, nº 5, pp. 467-73, Sep 2011.
- [3] H. Do y A. Dobrovic, «Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase,» *Oncotarget.*, vol. 3, nº 5, pp. 546-58, May 2012.
- [4] K. Junes-Gill, L. Sichero, P. Maciag, W. Mello, V. Noronha y L. Villa, «Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil,» *J Med Virol.*, vol. 80, nº 9, pp. 1639-45, Sep 2008.
- [5] V. Ramas, S. Mirazo, S. Bonilla, D. Ruchansky y J. Arbiza, «Analysis of human papillomavirus 16 E6, E7 genes and Long Control Region in cervical samples from Uruguayan women,» *Gene*, vol. 654, pp. 103-109, May 2018.
- [6] L. Mendoza, M. Picconi, S. Mirazo, P. Mongelós, G. Giménez, J. Basiletti y J. Arbiza, «Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion,» *Int J Gynaecol Obstet.*, vol. 122, nº 1, pp. 44-7, Jul 2013.
- [7] M. Tornesello, L. Buonaguro, S. Izzo, G. Lopez, X. Vega, C. Maldonado Reyes y F. Buonaguro, «A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from Ecuadorian women,» *J Med Virol.* , vol. 80, nº 11, pp. 1959-65, Nov 2008.
- [8] L. Villa, L. Sichero, P. Rahal, O. Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan y E. Franco, «Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia,» *J Gen Virol.*, vol. 81, nº 12, pp. 2959-2968, Dic 2000.
- [9] B. da Silva, V. Santos, I. Santos, E. Araújo, M. Alves, L. Silva, M. de Aragão Batista y L. de Lemos, «Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in women living with HIV/AIDS in an area of Northeast Brazil,» *J Med Virol.* , Apr 2020.
- [10] I. Calleja-Macias, M. Kalantari, J. Huh, R. Ortiz-Lopez, A. Rojas-Martinez, J. Gonzalez-Guerrero, A. Williamson, B. Hagmar, D. Wiley, L. Villarreal, H. Bernard y H. Barrera-

- Saldaña, «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*, vol. 319, nº 2, pp. 315-23, Feb 2004.
- [11] I. Badano, M. Totaro, A. Culasso, D. Sanabria, T. Schurr, I. Balette, A. Roisman, J. Basiletti, M. Picconi, R. Campos y D. Liotta, «Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina,» *Infect Genet Evol.*, vol. 29, pp. 103-9, Jan 2015.
- [12] D. Corach, O. Lao, C. Bobillo, K. van Der Gaag, S. Zuniga, M. Vermeulen, K. van Duijn, M. Goedbloed, P. Vallone, W. Parson, P. de Knijff y M. Kayser, «Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA,» *Ann Hum Genet.*, vol. 74, nº 1, pp. 65-76, Jan 2010.
- [13] D. Behar, R. Villems, H. Soodyall, J. Blue-Smith, L. Pereira, E. Metspalu, R. Scozzari, H. Makkan, S. Tzur, D. Comas, J. Bertranpetit, L. Quintana-Murci, C. Tyler-Smith, R. Wells, S. Rosset y G. Consortium., «The dawn of human matrilineal diversity,» *Am J Hum Genet.*, vol. 82, nº 5, pp. 1130-40, May 2008.
- [14] A. Torroni, A. Achilli, V. Macaulay, M. Richards y H. Bandelt, «Harvesting the fruit of the human mtDNA tree,» *Trends Genet.*, vol. 22, nº 6, pp. 339-45, Jun 2006.
- [15] A. Achilli, U. Perego, C. Bravi, M. Coble, Q. Kong, S. Woodward, A. Salas, A. Torroni y H. Bandelt, «The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies,» *PLoS One*, vol. 3, nº 3, p. e1764, Mar 2008.
- [16] J. Mosmann, M. Monetti, M. Frutos, A. Kiguen, R. Venezuela y C. Cuffini, «Mutation detection of E6 and LCR genes from HPV 16 associated with carcinogenesis,» *Asian Pac J Cancer Prev.*, vol. 16, nº 3, pp. 1151-7, 2015.
- [17] S. Tonon, J. Basiletti, I. Badano, L. Alonio, L. Villa, A. Teyssie y M. Picconi, «Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina,» *Int J Infect Dis.*, vol. 11, nº 1, pp. 76-81, Jan 2007.
- [18] M. Picconi, L. Alonio, L. Sichero, V. Mbayed, L. Villa, J. Gronda, R. Campos y A. Teyssié, «Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina,» *J Med Virol.*, vol. 69, nº 4, pp. 546-52, Apr 2003.
- [19] I. Cornet, T. Gheit, S. Franceschi, J. Vignat, R. Burk, B. Sylla, M. Tommasino, G. Clifford y I. H. V. S. Group., «Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR,» *J Virol.*, vol. 86, nº 12, pp. 6855-61, Jun 2012.
- [20] J. Doorbar, «The papillomavirus life cycle,» *J Clin Virol.*, vol. 32, nº Suppl 1, pp. S7-15, Mar 2005.

- [21] J. Doorbar, W. Quint, L. Banks, I. Bravo, M. Stoler, T. Broker y M. Stanley, «The biology and life-cycle of human papillomaviruses,» *Vaccine*, vol. 30 , nº Suppl 5, pp. F55-70, Nov 2012.
- [22] L. Mirabello, M. Yeager, K. Yu, G. Clifford, Y. Xiao, B. Zhu, M. Cullen, J. Boland, N. Wentzensen, C. Nelson, T. Raine-Bennett, Z. Chen, S. Bass, L. Song, Q. Yang, M. Steinberg, L. Burdett, M. Dean, D. Roberson y *et al.*, «HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis,» *Cell*, vol. 170, nº 6, pp. 1164-1174, Sep 2017.
- [23] Z. Sun, G. Ren, X. Cui, W. Zhou, C. Liu y Q. Ruan, «Genetic diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 genes in women with cervical lesions in Liaoning Province, China,» *Int J Gynecol Cancer*, vol. 21, nº 3, pp. 551-8, Apr 2011.
- [24] J. Chansaenroj, A. Theamboonlers, P. Junyangdikul, S. Swangvaree, A. Karalak y Y. Poovorawan, «Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients,» *Asian Pac J Cancer Prev.*, vol. 13, nº 2, pp. 599-606, 2012.
- [25] M. Cao, Y. Chenzhang, X. Ding, Y. Zhang, Y. Jing y Z. Chen, «Genetic variability and lineage phylogeny of human papillomavirus type-16 and -53 based on the E6, E7, and L1 genes in Southwest China,» *Gene*, vol. 592, nº 1, pp. 49-59, Oct 2016.
- [26] K. Lee, I. Magalhaes, C. Clavel, J. Briolat, P. Birembaut, M. Tommasino y I. Zehbe, «Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression,» *Virus Res.*, vol. 131, nº 1, pp. 106-10, Jan 2008.
- [27] A. King, J. Sonsma, H. Vriend, M. van der Sande, M. Feltkamp, H. Boot, M. Koopmans y M. M. L. a. M. H. Services, «Genetic Diversity in the Major Capsid L1 Protein of HPV-16 and HPV-18 in the Netherlands,» *PLoS One*, vol. 11, nº 4, p. e0152782, Apr 2016.
- [28] M. Picconi, J. Gronda, L. Alonio, L. Villa, L. Sichero, S. Miranda, M. Barcena y A. Teyssie, «Virus papiloma humano en mujeres quechuas jujeñas con alta frecuencia de cáncer de cuello uterino. Tipos virales y variantes de HPV16,» *Medicina*, vol. 62, nº 3, pp. 209-20, 2002.
- [29] A. Gurgel, B. Chagas, C. do Amaral, K. Nascimento, L. Leal, C. Silva Neto Jda, M. Cartaxo Muniz y A. de Freitas, «Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil,» *Biomed Res Int.*, 2015.
- [30] I. Chiesa, M. Perez, G. Nuñez y D. Pirola, «Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina,» *Virusdisease*, vol. 27, nº 1, pp. 41-7, Mar 2016.

- [31] A. El Aliani, H. El Abid, Y. Kassal, M. Khyatti, M. Attaleb, M. Ennaji y M. El Mzibri, «HPV16 L1 diversity and its potential impact on the vaccination-induced immunity,» *Gene*, vol. 747, p. 144682, Jul 2020.
- [32] A. Mane, L. Patil, S. Limaye, A. Nirmalkar y U. Kulkarni-Kale, «Characterization of major capsid protein (L1) variants of Human papillomavirus type 16 by cervical neoplastic status in Indian women: Phylogenetic and functional analysis,» *J Med Virol.* , vol. 92, nº 8, pp. 1303-1308, Aug 2020.
- [33] E. Frati, S. Bianchi, A. Amendola, D. Colzani, F. Petrelli, G. Zehender y E. Tanzi, «Genetic characterization of variants of HPV 16, HPV 18 and HPV 52 circulating in Italy among general and high risk populations,» *Mol Med Rep.* , vol. 21, nº 2, pp. 894-902, Feb 2020.
- [34] G. Deluca, J. asiletti, J. González, N. Díaz Vásquez, R. Lucero y M. Picconi, «Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina,» *Medicina*, vol. 72, nº 6, pp. 461-6, 2012.
- [35] J. Berumen, R. Ordoñez, E. Lazcano, J. Salmeron, S. Galvan, R. Estrada, E. G.-C. A. Yunes, G. Gonzalez-Lira y A. Madrigal-de la Campa, «Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study.,» *J Natl Cancer Inst.* , vol. 93, nº 17, pp. 1325-30, Sep 2001.
- [36] A. Hildesheim, M. Schiffman, C. Bromley, S. Wacholder, R. Herrero, A. Rodriguez, M. Bratti, M. Sherman, U. Scarpidis, Q. Lin, M. Terai, R. Bromley, K. Buetow, R. Apple y R. Burk, «Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer.,» *J Natl Cancer Inst.*, vol. 93, nº 4, pp. 315-8, Feb 2001.
- [37] M. Schiffman, A. Rodriguez, Z. Chen, S. Wacholder, R. Herrero, A. Hildesheim, R. Desalle, B. Befano, K. Yu, M. Safaeian, M. Sherman, J. Morales, D. Guillen, M. Alfaro, M. Hutchinson, D. Solomon, P. Castle y R. Burk, «A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia,» *Cancer Res.*, vol. 70, nº 8, pp. 3159-69, Apr 2010.
- [38] L. Sichero, S. Ferreira, H. Trottier, E. Duarte-Franco, A. Ferenczy, E. Franco y L. Villa, «High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18,» *Int J Cancer.*, vol. 120, nº 8, pp. 1763-8, Apr 2007.
- [39] A. Hildesheim y S. Wang, «Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review.,» *Virus Res.*, vol. 89, nº 2, pp. 229-40, Nov 2002.
- [40] L. Sichero y L. Villa, «Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus.,» *Braz J Med Biol Res.*, vol. 39, nº 6, pp. 707-17, Jun 2006.

- [41] R. Burk, A. Harari y Z. Chen, «Human papillomavirus genome variants.,» *Virology*, vol. 445, nº 1-2, pp. 232-43, Oct 2013 .
- [42] L. Marongiu, A. Godi, J. Parry y S. Beddows, «Human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants stratified by cervical disease stage,» *Infect Genet Evol.*, vol. 26, nº 100, pp. 8-13., Aug 2014.
- [43] B. Smith, Z. Chen, L. Reimers, K. S. M. van Doorslaer, R. Desalle, R. Herrero, K. Yu, S. Wacholder, T. Wang y R. Burk, «Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies.,» *PLoS One*, vol. 6, nº 6, p. e21375, Jun 2011.
- [44] I. Zehbe, R. Tachezy, J. Mytilineos, G. Voglino, I. Mikyskova, H. Delius, A. Marongiu, L. Gissmann, E. Wilander y M. Tommasino, «Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes,» *Int J Cancer*, vol. 95, nº 5, pp. 711-6, Dec 2001.
- [45] A. Beskow, A. Josefsson y U. Gyllensten, «HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ.,» *Int J Cancer*, vol. 93, nº 6, pp. 817-22, Sep 2001.
- [46] R. Burk, M. Terai, P. Gravitt, L. Brinton, R. Kurman, W. Barnes, M. Greenberg, O. Hadjimichael, L. Fu, L. McGowan, R. Mortel, P. Schwartz y A. Hildesheim, «Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix,» *Cancer Res.* , vol. 63, nº 21, pp. 7215-20, Nov 2003.
- [47] L. Xi, N. Kiviat, A. Hildesheim, D. Galloway, C. Wheeler, J. Ho y L. Koutsky, «Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence,» *J Natl Cancer Inst.*, vol. 98, nº 15, pp. 1045-52, Aug 2006.
- [48] P. de Araujo Souza, P. Maciag, K. Ribeiro, M. Petzl-Erler, E. Franco y L. Villa, «Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer,» *BMC Cancer*, vol. 8, p. 246, Aug 2008.
- [49] R. Zuna, W. Moore, R. Shanesmith, S. Dunn, S. Wang, M. Schiffman, G. Blakey y T. T., «Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population,» *Int J Cancer*, vol. 125, nº 11, pp. 2609-13, Dec 2009.
- [50] I. Cornet, T. Gheit, M. Iannacone, J. Vignat, B. Sylla, A. Del Mistro, S. Franceschi, M. Tommasino y G. Clifford, «HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide,» *Br J Cancer*, vol. 108, nº 1, pp. 240-4, Jan 2013.
- [51] S. Andersson, M. Alemi, E. Rylander, A. Strand, B. Larsson, J. Sällström y E. Wilander, «Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions,» *Br J Cancer*, vol. 83, nº 3, pp. 307-10, Aug 2000.

- [52] L. Slichero, J. Sobrinho y L. Villa, «Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants,» *Virology*, vol. 432, nº 1, pp. 127-32, Oct 2012.
- [53] T. Yamada, M. Manos, J. Peto, C. Greer, N. Munoz, F. Bosch y C. Wheeler, «Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective,» *J Virol.*, vol. 71, nº 3, pp. 2463-72, Mar 1997.
- [54] G. Tan, M. Duan, Y. Li, N. Zhang, W. Zhang, B. Li y P. Qu, «Distribution of HPV 16 E6 gene variants in screening women and its associations with cervical lesions progression,» *Virus Res.*, vol. 273, p. 197740, Nov 2019.
- [55] H. Cai, C. Chen y X. Ding, «Human papillomavirus type 16 E6 gene variations in Chinese population,» *Eur J Surg Oncol.*, vol. 36, nº 2, pp. 160-3, Feb 2010.
- [56] J. Du, C. Nordfors, A. Näsman, M. Sobkowiak, M. Romanitan, T. Dalianis y T. Ramqvist, «Human papillomavirus (HPV) 16 E6 variants in tonsillar cancer in comparison to those in cervical cancer in Stockholm, Sweden,» *PLoS One*, vol. 74, p. e36239, 2012.
- [57] I. Zehbe, H. Lichtig, A. Westerback, P. Lambert, M. Tommasino y L. Sherman, «Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential,» *Mol Cancer*, vol. 10, p. 77, Jun 2011.
- [58] G. Myers y E. Androphy, «E6 Protein,» Oct 1995. [En línea]. Available: <https://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/compendium/95PDF/3/e6.pdf>.
- [59] K. Zanier, A. ould M'hamed ould Sidi, C. Boulade-Ladame, V. Rybin, A. Chappelle, A. Atkinson, B. Kieffer y G. Travé, «Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53,» *Structure*, vol. 20, nº 4, pp. 604-17, Apr 2012.
- [60] J. Lozano, J. Galindo, J. García-Borrón, J. Martínez, R. Peñafiel y F. Solano, *Bioquímica y Biología molecular para ciencias de la salud*, 3ª ed. ed., McGRAW-HILL - Interamericana de España, S.A.U., 2005, p. 692.
- [61] A. Choudhury, M. Choudhury, P. Chetia y A. T. A. Chowdhury, «An in silico appraisal of azoic and disulphide derivatives for anticancer activity against HPV E6 oncoprotein to medicate cervical cancer,» *Comb Chem High Throughput Screen*, vol. 17, nº 1, pp. 38-46, Jan 2014.
- [62] S. Kumar, L. Jena, K. Mohod, S. Daf y A. Varma, «Virtual screening for potential inhibitors of high-risk human papillomavirus 16 E6 protein,» *Interdiscip Sci.*, vol. 7, nº 2, p. 136–142, Feb 2015.



- [63] M. Celegato, L. G. L. Messa, B. Mercorelli, C. Bertagnin, F. Spyrakis, I. Suarez, A. Cousido-Siah, G. Travé, L. Banks, G. Cruciani, G. Palù y A. Loregian, «A novel small-molecule inhibitor of the human papillomavirus E6-p53 interaction that reactivates p53 function and blocks cancer cells growth,» *Cancer Lett.*, vol. 470, pp. 115-125, Feb 2020.
- [64] X. Liu, A. Clements, K. Zhao y R. Marmorstein, «Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor,» *J Biol Chem.* , vol. 281, nº 1, pp. 578-86, Jan 2006.
- [65] O. Ohlenschläger, T. Seiboth, H. Zengerling, L. Briese, A. Marchanka, R. Ramachandran, M. Baum, M. Korbass, W. Meyer-Klaucke, M. Dürst y M. Görlach, «Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7,» *Oncogene*, vol. 25, nº 44, pp. 5953-9, Sep 2006.
- [66] A. Roman y K. Munger, «The papillomavirus E7 proteins,» *Virology*, vol. 445, nº 1-2, pp. 138-68, Oct 2013.
- [67] M. Safaeian, K. van Doorslaer, M. Schiffman, Z. Chen, A. Rodriguez, R. Herrero, A. Hildesheim y R. Burk, «Lack of heterogeneity of HPV16 E7 sequence compared with HPV31 and HPV73 may be related to its unique carcinogenic properties,» *Arch Virol.*, vol. 155, nº 3, pp. 367-70, Mar 2010.
- [68] T. Ning, A. Wolfe, J. Nie, W. Huang, X. Chen y Y. Wang, «Naturally Occurring Single Amino Acid Substitution in the L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16: Alteration of Susceptibility to Antibody-Mediated Neutralization,» *J Infect Dis.*, vol. 216, nº 7, pp. 867-876, Oct 2017.
- [69] J. Dasgupta, M. Bienkowska-Haba, M. Ortega, H. Patel, S. Bodevin, D. Spillmann, B. Bishop, M. Sapp y X. Chen, «Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus,» *J Biol Chem.*, vol. 286, nº 4, pp. 2617-24, Jan 2011.
- [70] L. Oumeslakht, M. Ababou, B. Badaoui y Z. Qmichou, «Worldwide genetic variations in high-risk human papillomaviruses capsid L1 gene and their impact on vaccine efficiency,» *Gene*, vol. 782, May 2021.
- [71] S. Pande, N. Jain, B. Prusty, S. Bhambhani, S. Gupta, R. Sharma, S. Batra y B. Das, «Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India,» *J Clin Microbiol.*, vol. 46, nº 3, pp. 1060-6, Mar 2008.

# CONCLUSIONES



## CAPITULO 5: CONCLUSIONES

Se confirmó la hipótesis planteada: “El desarrollo del cáncer de cuello de útero responde a un modelo multifactorial que involucra la interacción de factores genéticos humanos y virales. En este contexto, la caracterización de variantes genéticas de VPH16 en los genes virales L1 (epítipo antigénico), E6 y E7 (oncogenes) permitirá identificar factores de riesgo involucrados en el desarrollo de esta enfermedad”.

Se determinó la alta prevalencia de variantes de VPH16 del linaje A en la región, estos resultados apoyarían la hipótesis de la introducción del virus durante la inmigración europea a la región y es congruente con publicaciones previas de otras poblaciones latinoamericanas de composición multiétnica.

Se evaluó la diversidad genética de E6, E7 y L1 del VPH16 en mujeres del Noreste de Argentina, la variación más alta se observó en el gen L1, mientras el gen E7 se encontraba altamente conservado. El polimorfismo E6 350G fue una mutación recurrente, habiendo ocurrido en paralelo en los linajes A y D. En este estudio se analizó la secuencia de L1 completa, el polimorfismo L1 6434G fue el más prevalente y se observó una gran variabilidad en las regiones correspondientes a los bucles superficiales de la proteína L1, donde se encuentran los epítipes antigénicos.

Nuestros resultados confirmaron la asociación del linaje D y la variante E6 350G con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical en la población de estudio y la variabilidad de las regiones superficiales de la proteína L1. Estos datos contribuyen a comprender las bases biológicas de la incidencia de cáncer cervical en la región, identificar marcadores genéticos para una mejor definición de los grupos de riesgo en la era de la vacuna y generar en el ámbito local una base de datos de secuencias para el diseño de nuevos fármacos en la terapia contra el cáncer asociado al VPH16.

# RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

#### BECAS



## RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Complementar la información sobre la variabilidad genética de las proteínas virales del HPV16 y generar para el ámbito local una base de datos de secuencias.

Generar y actualizar información primaria epidemiológica propia de la región, de utilidad para la diagramación de políticas sanitarias provinciales y nacionales en relación con la salud ginecológica y reproductiva.

Diseñar y ensayar *in silico* modelos de inhibidores farmacológicos contra las variantes de E6 propias de la región para el tratamiento del cáncer cervical.

Evaluar *in silico* la eficacia de test diagnósticos basados en L1 utilizando las variantes circulantes en la región.

Fortalecer y continuar con estrategias de vigilancia epidemiológica en la era de la vacunación contra el VPH.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### Revistas

I. Badano, **M.E. Totaro**, A.C.A. Culasso, D.J. Sanabria, T.G. Schurr, I.C. Balette, A. Roisman, J. Basiletti, M.A. Picconi, R.H. Campos y D.J. Liotta, Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina, *Infection, Genetics and Evolution*, 29 (2015) 103-109 doi: 10.1002/jmv.27359

I. Badano, D.J. Sanabria, **M.E. Totaro**, S. Rubinstein, J.A. Gili, D.J. Liotta, M.A. Picconi, R.H. Campos, T.G. Schurr, 2018. Mitochondrial DNA ancestry, HPV infection and the risk of cervical cancer in a multiethnic population of northeastern Argentina. *PLoS One.*, 13(1), e0190966. doi: 10.1371/journal.pone.0190966.

J.V. González, G.D. Deluca, D.J. Liotta, R.M. Correa, J.A. Basiletti, M.C. Colucci, N. Katz, C. Vizzotti, M.A. Picconi, **MALBRAN HPV Surveillance Study Group**, Baseline prevalence and type distribution of Human papillomavirus in sexually active non-vaccinated adolescent girls from Argentina, *Rev Argent Microbiol.* 53(1) (2021) 11-19. doi: 10.1016/j.ram.2020.06.004.

J.V. González, G.D. Deluca, R.M. Correa, D.J. Liotta, J.A. Basiletti, M.D. Fellner, M.C. Colucci, O.G. Alzogaray, N. Katz, J.J. Carmona, N.F. Tappari, E. Berner, , V. Cramer, P. Real, , C.V. López Kaufman, G.J. Kosoy, L. Katabian, M.S. Severino, R.E. Aboslaiman, C. Chami, **M.E. Totaro**, C. Rogoski, A.J. Giurgiovich, G.L. Martínez, L.M. Plana, C. Vizzotti, M.A. Picconi, Strong reduction in prevalence of HPV16/18 and closely related HPV types in sexually active adolescent women following the introduction of HPV vaccination in Argentina, *Papillomavirus Res.* 10 (2020) 100208. doi: 10.1016/j.pvr.2020.100208.

**M.E. Totaro**, J.A. Gili, D.J. Liotta, T.G. Schurr, M.A. Picconi, I. Badano, Genetic variation in the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 in northeastern Argentina, *J Med Virol.* (2021) doi: 10.1002/jmv.27359..

### Congresos

**M.E. Totaro**, Análisis de los oncogenes E6 y E7 del Virus Papiloma Humano en el desarrollo de lesiones de cuello de útero. **Mesa redonda:** Utilidad del análisis bioinformático y filogenético de secuencias virales: Epidemiología, Clínica y Evolución del Virus Papiloma Humano en la provincia de Misiones. Libro de resúmenes de las IX Jornadas Científico Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (2015) Posadas, Misiones, Argentina.

D.J. Sanabria, **M.E. Totaro**, T.G. Schurr, D.J. Liotta, R.H. Campos, I. Badano, Análisis de variantes de HPV-16 y background genético del hospedador en el desarrollo de lesiones de cuello de útero en la provincia de Misiones. Libro de resúmenes del XI Congreso Argentino de

Virología y II Congreso Latinoamericano de Virología, Junio-2015, Sociedad Argentina de Virología, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

D.J. Sanabria, J. Basiletti, **M.E. Totaro**, G. Deluca, M. Ovejero, P. Yachelini, K. Marinic, L. Caeiro, C. Sijvarger, M. Acuña, A. Suarez, J. Gonzalez, L.V. Alonio, M.A. Picconi, R.H. Campos, D.J. Liotta, I. Badano, Filogeografía de Virus Papiloma Humano tipo 16 en Argentina. Libro de resúmenes de las XII Jornadas Nacionales de Antropología Biológica, Sept-2015, Asociación de Antropología Biológica Argentina. Corrientes. Argentina.

**M.E. Totaro**, I. Badano, R.H. Campos, D.J. Liotta, Prevalencia de la variante de riesgo HPV 16 E6-360G en mujeres de la provincia de Misiones. Libro de resúmenes de las Jornadas Regionales de Genética Agosto-2016 Sociedad Argentina de Genética (SAG). SAG sede NEA. UNNE Corrientes Argentina. Primer Premio de la “Sesión: Genética Humana y Médica”

I. Badano, C.H. Bedoya, **M.E. Totaro**, E. Parrales, A. Zhingre, S. Sánchez, Karool España, M. Garcia, D.J. Liotta, Caracterización de la variación genética de los oncogenes E6 Y E7 de Virus Del Papiloma Humano Tipo 16 en mujeres de Argentina y del Ecuador, Libro de resúmenes del XII Congreso Argentino de Virología, Septiembre-2017, Sociedad Argentina de Virología (SAV), CABA, Argentina.

**M.E. Totaro** (Becaria), I. Badano (Director), D.J. Liotta, (Colaborador), Analysis of complete genomes of human papilloma virus type 16 and its relationship with cervical cancer progression, Anuario 2014 - Becas de Investigación “Ramón Carrillo - Arturo Oñativia”, Dic. 2017, Direcc. de Investigación para la Salud, Ministerio de Salud de la Nación, pp- 122. ISSN 2362-5708 – en línea.

**M.E. Totaro**, I. Badano, M. Avalos, y D.J. Liotta, Infección por Virus Papiloma Humano (HPV) en lesiones genitales externas de pacientes diagnosticados en la ciudad de Posadas, Mayo-2018, Libro de resúmenes: Jornadas científico-tecnológicas / compilado por Ana Isabel Honfi. - 1a ed. - Posadas: Edunam - Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones, 740 p. ISBN 978-950-579-495-9.

J.V. González, G.D. Deluca, R.M. Correa, D.J. Liotta, J.A. Basiletti, M.C. Colucci, G. Alzogaray, N. Katz, C. Vizzotti, M.A. Picconi, EN REPRESENTACION DEL, **Grupo Estudio Vigilancia HPV**, Primera medición del impacto de la vacunación contra Virus Papiloma Humano (HPV) en Argentina: marcada disminución de la prevalencia de los HPV 16 Y 18 en adolescentes vacunadas, Libro de resúmenes del XV Congreso Argentino de Microbiología, Septiembre-2019, CABA, Argentina. ISBN 978-987-46701-5-1

### **Bases de Datos**

Secuencias Depositadas en GenBank: 116 (Numero de Acceso KM094931 - KM095046). I. Badano, **M.E. Totaro**, A.C. Culasso, D.J. Sanabria, T.G. Schurr, I.C. Balette, A. Roisman, J. Basiletti, M.A. Picconi, R.H. Campos, and D.J. Liotta, Human papillomavirus type 16 isolate ARG001-ARG116 long control region genomic sequence.

Secuencias Depositadas en GenBank: 78 (Número de Acceso MN053339-MN053388 y MN061890-MN061917). **M.E. Totaro**, I. Badano, and D.J. Liotta, Human Papillomavirus type 16 isolate NEA001-NEA050 E6 and E7 partial genomic sequence.

### **PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN DENTRO DEL/LOS CUAL/ES SE DESARROLLÓ LA TESIS**

**01/2018 - 12/2021.** Proyecto 16Q655: *Virus Papiloma Humano: epidemiología molecular y genética de los tipos vacunales (HPV16 y HPV18) en la Provincia de Misiones.* Dirección: Liotta, Domingo Javier, Co-Dirección: Badano, Inés. Ejecutado en: Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp); FCEQyN; UNaM. Financiado por: Universidad Nacional de Misiones (UNAM).

**03/2013 - 06/2017.** Proyecto PICTO – UnaM: *Virus Papiloma Humano (HPV): Factores genéticos virales y humanos asociados al desarrollo de lesiones precursoras y cáncer de cuello uterino en la provincia de Misiones.* Dirección: Domingo Javier Liotta. Ejecutado en: Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp); FCEQyN; UNaM Financiado por: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT); Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.

**01/2013 – 12/2015.** Proyecto 16Q540: *Virus Papiloma Humano (HPV) tipo 16: Factores genéticos virales y humanos asociados al desarrollo de lesiones precursoras y cáncer de cuello uterino en la provincia de Misiones.* Dirección: Liotta, Domingo Javier. Ejecutado en: Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp); FCEQyN; UNaM. Financiado por: Universidad Nacional de Misiones (UNAM).

### **BECA/S Y SUBSIDIO/S CON LOS QUE SE FINANCIÓ LA TESIS**

Becas de Posgrado CIN-PERHID, 2017, Consejo Interuniversitario Nacional. *Análisis de los genes E6 y E7 del Virus Papiloma Humano tipo 16 como marcadores pronósticos tempranos de la progresión de lesiones de cuello uterino.*

Beca del Sistema Nacional de Datos Genómicos, 2020-21, Consejo Interinstitucional de



Ciencia y Tecnología. *Anotación de genomas completos de Virus Papiloma Humano tipo 16 (HPV16).*

PICTO-UNaM -2011-0106-ANPCyT “*Virus Papiloma Humano (HPV): Factores genéticos virales y humanos asociados al desarrollo de lesiones precursoras y cáncer de cuello uterino en la provincia de Misiones*”

# ANEXOS



## ANEXO 1. Consentimiento Informado

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales, *doy mi consentimiento y me ofrezco voluntariamente* para participar de la investigación **ANÁLISIS DE LOS GENES E6, E7 y L1 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16 y TIPO 18 COMO MARCADORES PRONÓSTICOS TEMPRANOS DE LA PROGRESIÓN DE LESIONES DE CUELLO UTERINO**, bajo la dirección del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) con domicilio en la Av. Mariano Moreno 1375 de la ciudad de Posadas (CP3300), Provincia de Misiones, Argentina.

Entiendo que este estudio empleará muestras biológicas de hisopados cervicales para la obtención de ADN genómico total, el cual será utilizado para la detección y secuenciación de Virus Papiloma Humano tipo 16. Sé que la información que sobre mí se obtenga como producto de la participación de este estudio podrá ser empleada en ámbitos científicos para favorecer el adelanto de las ciencias biomédicas bajo la condición de que se preservará el carácter de confidencialidad de mi persona y de cualquier dato vinculante a la identidad de la misma.

Tengo conocimiento que los investigadores responsables de este proyecto están en un todo de acuerdo y adoptan los principios éticos, legales y jurídicos para las investigaciones médicas en seres humanos descriptas en las normas bioéticas nacionales (*Disp. ANMAT 5330/97*) e internacionales (*Código de Nüremberg, Declaración de Helsinski de la Asociación Médica Mundial y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos de la UNESCO 11/11/97*), destacando el derecho a la privacidad genética, incluyendo el derecho a prevenir la toma o almacenamiento de muestras corporales para información genética sin el voluntario consentimiento informado.

Dejo explícito que se me ha puesto en conocimiento del significado de mi participación voluntaria, la duración y finalidad del estudio, los métodos diagnósticos a ser empleados y el alcance de los resultados a ser obtenidos, tomando conocimiento de este último a través de mi médico tratante el cual será informado por el laboratorio. Así mismo he tenido la oportunidad de realizar preguntas referidas a este estudio y las respuestas recibidas han sido todas satisfactorias.

Sé que dispongo de plena libertad de discontinuar mi participación en este estudio en el momento que así lo desee, debiendo por ello notificar por escrito al Dr. Domingo Javier Liotta, Director del LaBiMAp a la dirección postal previamente citada. Sé que mi exclusión del presente estudio se realizará sin cuestionamiento alguno y se concretará una vez que la mencionada persona se notifique de mi decisión. Mi participación en el presente estudio no implicará gratificación financiera alguna.

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA FIRMA

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales, *doy mi consentimiento y me ofrezco voluntariamente* para participar de la investigación médica **ANÁLISIS DE LOS GENES E6, E7 y L1 DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 16 y TIPO 18 COMO MARCADORES PRONÓSTICOS TEMPRANOS DE LA PROGRESIÓN DE LESIONES DE CUELLO UTERINO**, bajo la dirección del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (LaBiMAp) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) con domicilio en la Av. Mariano Moreno 1375 de la ciudad de Posadas (CP3300), Provincia de Misiones, Argentina.

#### Voluntario

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| Apellido y Nombre: |                    |
| Firma:             | Lugar y Fecha      |
| Aclaración:        | Nro. de Documento: |

**Testigo 1:** Doy fe de la participación Voluntaria de: (Apellido y Nombre del voluntario), de la originalidad de su firma y de sus datos personales.

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| Apellido y Nombre: |                    |
| Firma:             | Lugar y Fecha      |
| Aclaración:        | Nro. de Documento: |

**Testigo 2:** Doy fe de la participación Voluntaria de: (Apellido y Nombre del voluntario), de la originalidad de su firma y de sus datos personales.

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| Apellido y Nombre: |                    |
| Firma:             | Lugar y Fecha      |
| Aclaración:        | Nro. de Documento: |

## ANEXO 2. PCR-VPH16 Región LCR

**Utilidad:** Se emplea para amplificar la región LCR del virus de HPV 16.

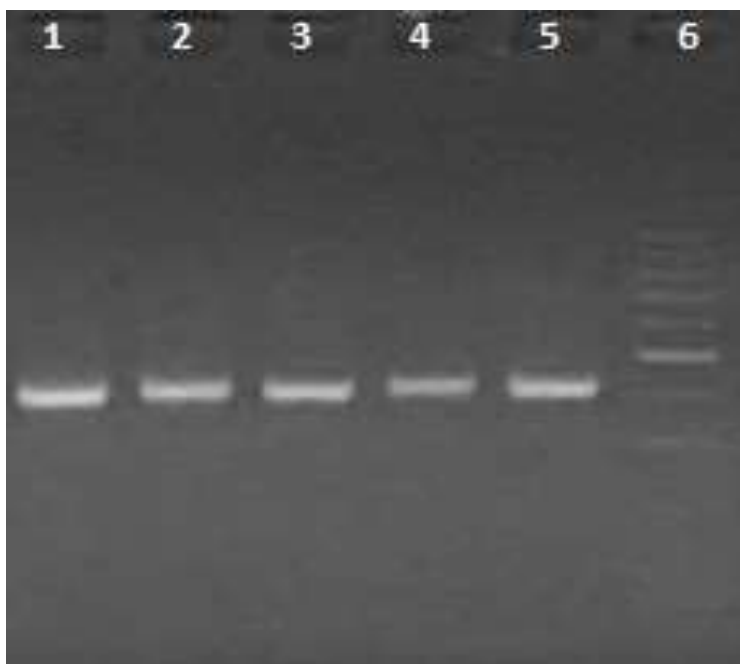
**Referencia:** Chan *et al.*, 1992.

| PRIMER FW: LCR Fw  | PRIMER RV: LCR Rv               |
|--|---------------------------------|
| 5'TCG GTT GCA TGC TTT TTG GC 3'                                | 5'CGG TTT GCA CAC ACC CAT GT 3' |
| Blanco de amplificación: 364 pb Posición Del Genoma: 7458-7861 |                                 |

**Condiciones de PCR:** Buffer PCR 1X (10 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 uM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, y 2 U de Taq polimerasa, en un volumen final de 20 µl.

**Condiciones de Ciclado:** desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min. y 35 ciclos de: 95 °C por 1 min., 55 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; y una extensión final de 72 °C por 3 min.

**Resultado:** Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, una banda de 364 pb indica amplificación positiva (Figura Anexo 2).



**Figura Anexo 2. Amplificación de la región LCR del VPH16.** Electroforesis en gel de agarosa 2 %. Productos amplificados por PCR para la región LCR (364 pb). Calles 1-5: Muestras positivas. Calle 6: Marcador de peso molecular 1 Kb (Cada banda representa 100 pb).

### ANEXO 3. PCR-HPV16 Región E6/E7

**Utilidad:** Se emplea para amplificar la región E6/E7 del virus de HPV 16.

**Referencia:** Totaro M.E. *et al.*, 2021.

**PRIMER FW: E6 Fw**

5' ATG CAC CAA AAG AGA ACT GC 3'

**PRIMER RV: E7 Rv**

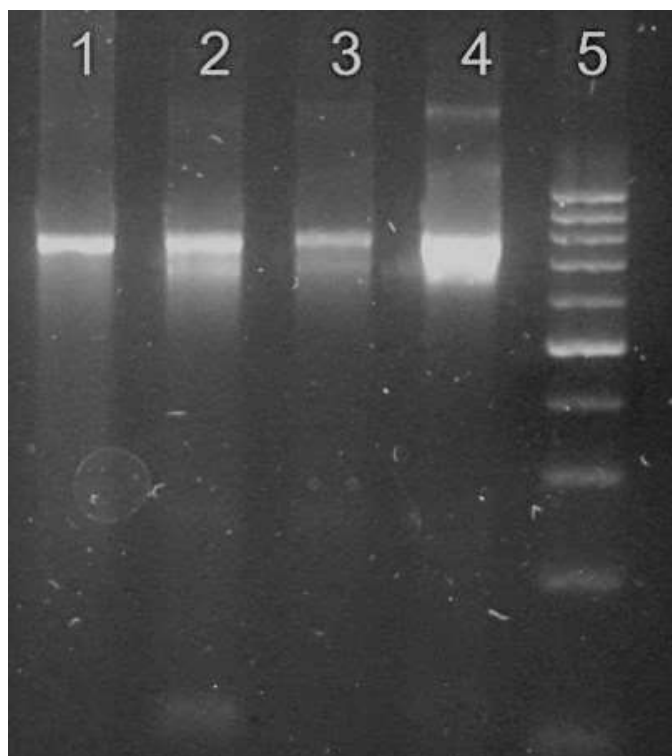
5' TGG TTT CTG RGA ACA GAT GG 3'

Blanco de amplificación: 749 pb Posición Del Genoma: 83-102/836-855

**Condiciones de PCR:** Buffer PCR 1X (10 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de cada primer, 200 μM de cada dNTP, y 2 U de Taq polimerasa, en un volumen final de 75 μl.

**Condiciones de Ciclado:** desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min. y 40 ciclos de: 95 °C por 1 min., 61 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; y una extensión final de 72 °C por 3 min.

**Resultado:** Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2 % teñidos con *Syber safe*, una banda de 749 pb indica amplificación positiva (Figura Anexo 3).



**Figura Anexo 3. Amplificación de la región E6/E7 del VPH16.** Electroforesis en gel de agarosa 2 %. Productos amplificados por PCR para la región E6/E7 (749pb). Calles 1 a 4: Muestras Positivas para E6/E7. Calle 5: Marcador de peso molecular 1Kb (Cada banda representa 100 pb).

#### ANEXO 4. PCR-VPH16 Región L1

**Utilidad:** Se emplea para amplificar la región L1 del virus de HPV 16.

**Referencia** Totaro M.E. *et al.*, 2013.

**PRIMER FW: L1 Fw**

**PRIMER RV: L1 Rv**

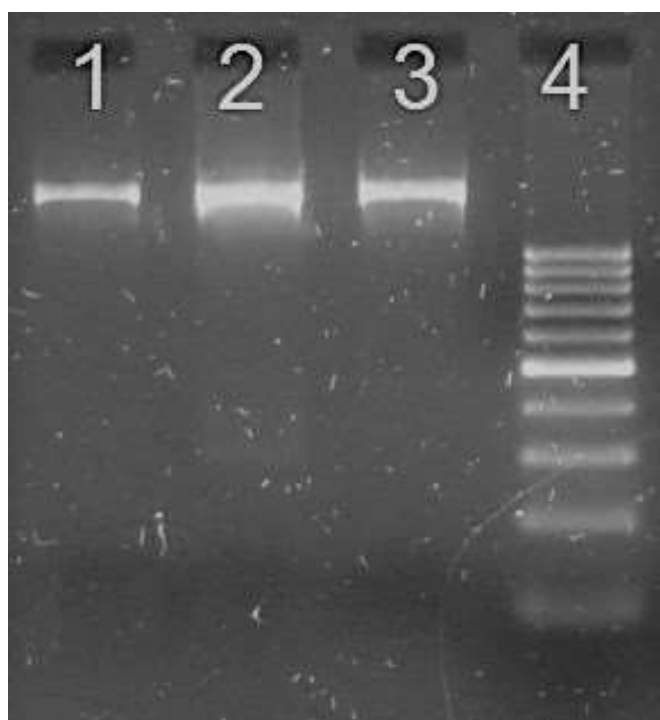
5'ATG SAG GTG ACT TTT ATT TAC ATC 3' 5'CAG CTT ACG TTT TTT GCG TTT AG 3'

Blanco de amplificación: 1596 pb Posición Del Genoma: 5570-5593/ 7140-7162

**Condiciones de PCR:** Buffer PCR 1X (10mM Tris-HCL pH 8.3, 50mM KCl), 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM de cada primer, 200 μM de cada dNTP, y 2U de Taq polimerasa, en un volumen final de 75 μl.

**Condiciones de Ciclado:** desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. y 40 ciclos de: 95°C por 1 min, 61°C por 1 min, 72°C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 3 min.

**Resultado:** Los amplicones se resuelven en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, una banda de 1596 pb indica amplificación positiva (Figura Anexo 4).



**Figura Anexo 4. Amplificación de la región L1 del VPH16.** Electroforesis en Gel de Agarosa 2%. Productos amplificados por PCR para la región L1 (1596pb). Calles 1 y 3: Muestras Positivas. Calle 4: Marcador de Peso Molecular 1Kb (Cada banda representa 100 pb).

## ANEXO 5. Templados Para Modelado Proteico

**Tabla Anexo 5. Secuencia de aminoácidos utilizada como templado para obtener las estructuras terciarias de las proteínas L1, E6 y E7**

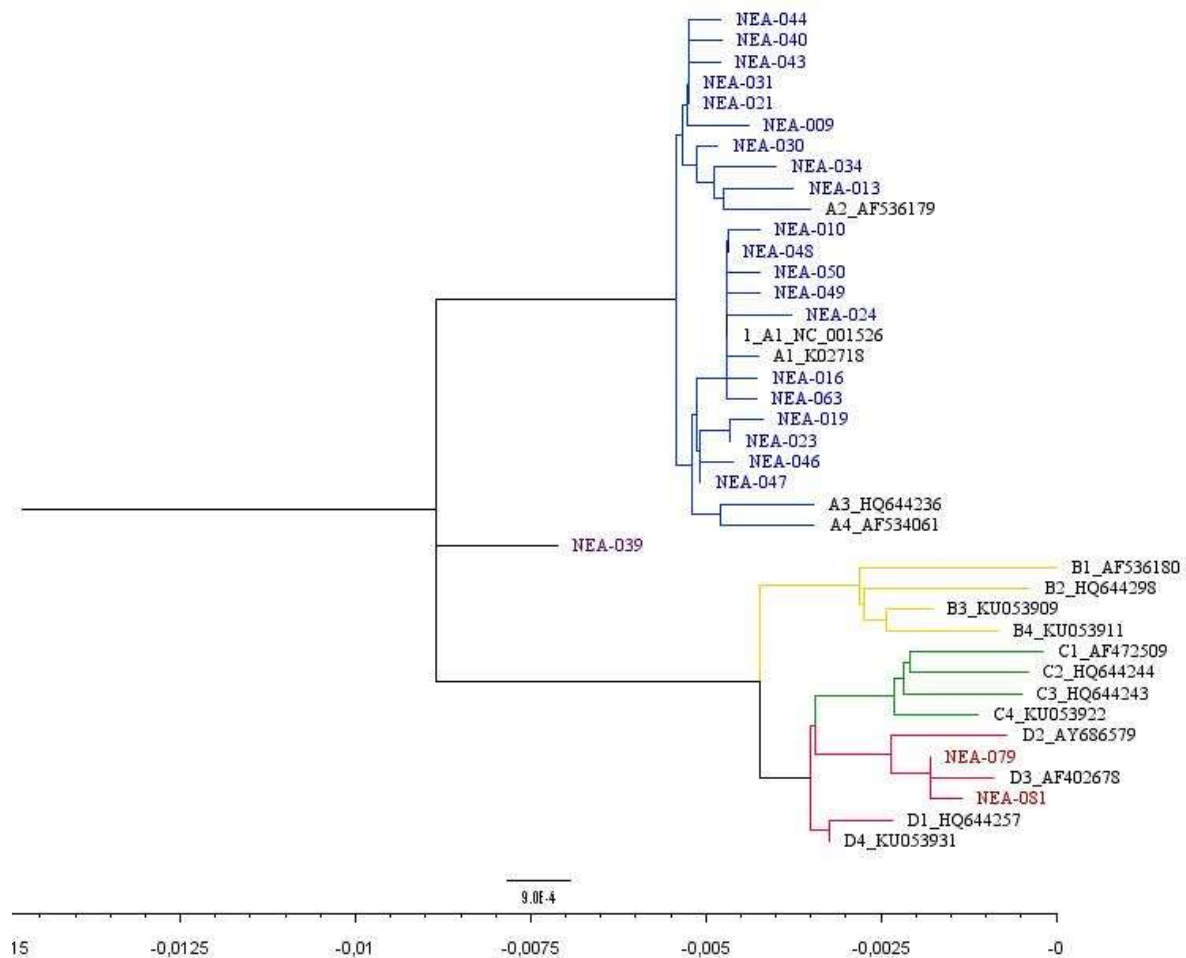
| Proteína | Templado  |
|----------|---|
| E6       | > NEA-004<br>MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREYDFAFRDLICV<br>YRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSVYGTTLQYKPLCDLLIRCIN<br>CQKPLCPEEKQRHLDDKKQRFHNIRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQL  |
| E7       | > NEA-064<br>MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRA<br>HYNIVTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRLTLEDLLMGTGLGIVCPIC   |
| L1       | > NEA-079<br>MSLWLPSEATVYLPVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPYFPI<br>KKPNNTKILVPKVSGLQYRVFRIHLPDPNKFGFPDTSFYNPDTQRLVWACV<br>GVEVGRGQPLGVGISGHPLLKLDNENASAYAANAGVDNRECISMDYKQ<br>TQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTNVAVNPGDCCPLELINTVIQDGMVDTG<br>FGAMDFTTLQANKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMF<br>VRHLFNAGTVGENVPDDLYIKGSGSTATLASSNYFPTPSGSMVTSDAQIF<br>NKPWYLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVVDTRSTNMSLCAAISTSETTYKNT<br>NFKEYLRHGEEYDLQFIFQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPP<br>GGTLEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVNLKEKFSADLDQ<br>FPLGRKFLQAGLKAKPKFTLGRKATPTTS |



**ANEXO 6. Código de secuencias y números de accesos de GenBank****Tabla Anexo 6. Códigos de secuencias y números de acceso a GenBank de las regiones LCR y E6/E7**

| Región | Código  | N° de Acceso |
|--------|---------|--------------|
| LCR    | NEA-001 | KM094931     |
|        | NEA-008 | KM094945     |
|        | NEA-017 | KM094975     |
|        | NEA-023 | KM094989     |
|        | NEA-051 | KM094934     |
|        | NEA-060 | KM094997     |
|        | NEA-073 | KM095025     |
|        | NEA-075 | KM094944     |
|        | NEA-079 | KM094941     |
|        | NEA-120 | KM095012     |
|        | NEA-122 | KM094960     |
| E6/E7  | NEA-001 | MN053339     |
|        | NEA-003 | MN053341     |
|        | NEA-004 | MN053342     |
|        | NEA-034 | MN053372     |
|        | NEA-036 | MN053374     |
|        | NEA-039 | MN053377     |
|        | NEA-049 | MN053387     |
|        | NEA-051 | MN061890     |
|        | NEA-059 | MN061898     |
|        | NEA-064 | MN061903     |
|        | NEA-065 | MN061904     |
|        | NEA-012 | MN053350     |





**Figura Anexo 7. Análisis Filogenético de Neighbor Joining de la región L1.** Reconstrucción filogenética de NJ, con el modelo T92+G y 1000 réplicas de bootstrap. El análisis involucró 40 secuencias de 2258 nucleótidos de longitud, correspondientes a la región L1, E6 y E7. Los diferentes linajes han sido coloreados en Azul (linaje A), Naranja (linaje B), Verde (linaje C) y Rojo (linaje D). Las muestras de Misiones se indican con la nomenclatura NEA. Secuencias referencia en negro.

## ANEXO 8. Comparación de las Secuencias Proteicas

**Tabla Anexo 8. Comparación de las diferentes secuencias proteicas de la población de estudio con la base de datos NCBI**

|         | Proteína | QC % | E-value | Identidad % | Positivos % |
|---------|----------|------|---------|-------------|-------------|
| E6      | NEA-001  | 100  | 4e-117  | 100         | 100         |
|         | NEA-059  | 100  | 3e-116  | 100         | 100         |
|         | NEA-064  | 100  | 3e-116  | 100         | 100         |
|         | NEA-065  | 100  | 2e-116  | 100         | 100         |
|         | NEA-034  | 100  | 1e-115  | 100         | 100         |
|         | NEA-051  | 100  | 5e-115  | 100         | 100         |
|         | NEA-004  | 100  | 1e-116  | 100         | 100         |
| E7      | NEA-001  | 100  | 1e-72   | 100         | 100         |
|         | NEA-012  | 100  | 9e-72   | 100         | 100         |
|         | NEA-064  | 100  | 2e-71   | 100         | 100         |
| L1      | NEA-002  | 100  | 0,0     | 100         | 100         |
|         | NEA-013  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-024  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-027  | 100  | 0,0     | 99          | 98          |
|         | NEA-039  | 100  | 0,0     | 99          | 100         |
|         | NEA-040  | 100  | 0,0     | 99          | 100         |
|         | NEA-044  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-056  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-057  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-065  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-066  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-074  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-087  | 100  | 0,0     | 100         | 100         |
|         | NEA-080  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-079  | 100  | 0,0     | 100         | 100         |
|         | NEA-093  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
|         | NEA-095  | 100  | 0,0     | 99          | 99          |
| NEA-098 | 100      | 0,0  | 99      | 99          |             |

QC: % de cobertura, indica el porcentaje de la secuencia que fue cubierta. E-value: confiabilidad. Identidad: % de aminoácidos idénticos. Positivos: % de aminoácidos idénticos más los similares