

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Histopatología cervical y su relación con los linajes de VPH 16 y 18, basados en los oncogenes E6/E7

Nombre del proyecto de investigación

4.8.63.0.21

Partida presupuestaria

B22-2022

Código del proyecto de investigación

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB

Unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Coordinador del proyecto: Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
Investigador: Lic. Francisco Josué López Hun

Nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala 22/02/2023

Lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año

## **Autoridades**

Dra. Alice Burgos Paniagua  
**Directora General de Investigación**

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
**Coordinador General de Programas**

Hilda Elena Valencia de Abril, Ph.D.  
**Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud (PUIIS)**

## **Autores**

**Nombre del coordinador(a) del proyecto**  
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares. PhD

**Nombre del investigador(a)**  
Lic. Francisco Josué López Hun

**Colaboradores del Proyecto de Investigación**  
Dra. Elisa Hernández de Rodas. PhD  
Dr. Hugo Cardona

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2022. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria 4.8.63.0.21 con código B22-2022 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

## Dirección General de Investigación

### 1. Índice general

2.	Resumen y palabras clave	5
3.	Introducción	6
4.	Planteamiento del problema	7
5.	Delimitación en tiempo y espacio	9
6.	Marco teórico	9
7.	Estado del arte	16
8.	Objetivos	16
9.	Hipótesis	17
10.	Materiales y métodos	17
11.	Resultados y discusión	22
12.	Referencias	27
13.	Apéndice	36
14.	Aspectos éticos y legales	36
15.	Vinculación	36
16.	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual	37
17.	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS	37
18.	Orden de pago final	38
19.	Declaración del Coordinador del proyecto de investigación	38
20.	Aval del Director (a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario	38

21.	Visado de la Dirección General de Investigación	39
-----	---	----

## 1.1 Índice de tablas

1.	Tabla 1. Tipos de muestras para la detección de los tipos VPH 16 y VPH 18.	23
2.	Tabla 2. Resultados de detección y prevalencia de los tipos VPH 16 y VPH 18 en LEIAG y CC.	23

## 1.2 Índice de figuras

1.	Figura 1. Autorización de la Directora General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala, para realizar cambios en los objetivos de la investigación.	36
----	---	----



## 2. Resumen y palabras claves

El cáncer cervical (CC) es uno de los principales problemas de salud en el mundo. Se calculan 266,000 fallecimientos anuales a causa de esta enfermedad. A nivel nacional, el CC continúa siendo la primera

causa de morbilidad y mortalidad femenina. El CC ha sido relacionado con la infección del virus de papiloma humano (VPH), definiéndose como un agente necesario para el desarrollo de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) y CC. En Guatemala se cuenta con poca información acerca de la epidemiología del virus, y aún más reducida sobre la distribución, variación genética y prevalencia de los tipos de alto riesgo. Se conoce que la prevalencia de los tipos de VPH varía por etnia y distribución geográfica. Los oncogenes E6/E7 se encuentran vinculados con la carcinogénesis y sus variaciones genéticas, han sido asociados con la progresión de las lesiones cervicales. En el presente estudio, se analizaron muestras colectadas de pacientes, y se encontró que el 23.94% fueron positivas para tipos de VPH de alto riesgo. La prevalencia para VPH 16 y/o VPH 18 en LEIAG fue de 27.17% y para CC fue del 20%.

Palabras claves: virus de papiloma humano (VPH), lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG), cáncer cervical (CC), VPH 16 y VPH 18.

## **Abstract and keywords**

Cervical cancer (CC) is one of the main health problems in the world. There are an estimated 266,000 annual deaths due to this disease. At the national level, CC continues to be the leading cause of female morbidity and mortality. CC has been related to human papillomavirus (HPV) infection, being defined as a necessary agent for the development of high-grade squamous intraepithelial lesions (LEIAG) and CC. In Guatemala, there is little information about the epidemiology of the virus, and even less about the distribution, genetic variation, and prevalence of high-risk types. The prevalence of HPV types is known to vary by ethnicity and geographic distribution. The E6/E7 oncogenes are linked to carcinogenesis and their genetic variations have been associated with the progression of cervical lesions. In this study, we found that 23.94% of the samples collected were positive for high-risk HPV types. The prevalence for HPV 16 and/or HPV 18 in LEIAG was 27.17% and for CC was 20%.

Keywords: human papillomavirus (HPV), high-grade squamous intraepithelial lesions (LEIAG), cervical cancer (CC), HPV 16 and HPV 18.

### 3. Introducción

A pesar de los avances clínicos y moleculares en los temas relacionados con el cáncer, el cáncer cervical (CC) continúa siendo una amenaza creciente para la salud de las mujeres alrededor del mundo. Los datos calculados por diferentes organizaciones dedicadas a la salud y especialistas en este tema, estiman alrededor de 528,000 casos nuevos de CC y 266,000 muertes cada año a causa de esta patología (Berek & Hacker, 2015; Bruni et al., 2017; Global Cancer Observatory, 2012). Los países en vías de desarrollo poseen mayor incidencia de CC en comparación con los países desarrollados, presentando casi el 85% de la totalidad de los casos reportados a nivel mundial. Además, los países en vías de desarrollo tienen una mortalidad 18 veces mayor a causa de esta enfermedad que los países desarrollados (Vu et al., 2018). Entre las áreas más afectadas se encuentran Asia y América Latina. En los países latinoamericanos, representa uno de los cánceres con mayor mortalidad y es una zona con gran incidencia de esta enfermedad y con el 12% del total de muertes registradas a nivel mundial (Lopez et al., 2017). En Guatemala se presenta una alta incidencia de CC de 21.2 por cada 100,000 mujeres (Gottschlich et al., 2020). Sin embargo, el CC es una enfermedad altamente prevenible, dada la relación entre el virus del papiloma humano (VPH) y las lesiones malignas en el tracto cervical. El VPH es virtualmente participe en todos los casos de CC y se estima que el 99% de todos los casos de CC son causados, entre otros factores, por los tipos de alto riesgo del VPH (Cogliano et al., 2005; Wang et al., 2015). Los tipos de mayor prevalencia en el mundo son el VPH-16 y VPH-18. A estos dos tipos se les adjudica alrededor del 70% de las infecciones en CC, sin embargo, este valor puede variar entre países. El 30% restante, es causado por los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 (Muñoz et al., 2003). De los cuales, las proporciones pueden variar, ya que ha sido demostrado que la distribución y la proporción en la que son encontrados los diferentes tipos de alto riesgo difiere dependiendo de la localidad estudiada (Smith et al., 2007). Un estudio reciente llevado a cabo en Guatemala reportó que en lesiones de alto grado de cérvix y en CC los tipos de alto riesgo 16 y 18 fueron los más prevalentes al ser comparados con otros tipos de alto riesgo (García et al., 2019).

Los genes E6/E7, que se encuentran en el genoma del VPH, dan origen a las proteínas conocidas como E6 y E7 y han sido vinculadas directamente con la progresión de las lesiones cervicales (Mesplede et al., 2012). En estos genes se han encontrado diferentes variantes genéticas que tienen un efecto en la interacción del virus con las células humanas, haciendo más probable el desarrollo de CC (Yang & Zhang, 2016). Además, las variantes genéticas de estos varían por etnia y distribución geográfica (Zhe

et al., 2019). A partir de estas variantes, se han propuestos diferentes linajes en los que se subdividen los tipos 16 y 18 (Yang et al., 2014). Dicho esto, es necesario conocer las proporciones de cada uno de los linajes y la forma en que estos se relacionan con los diferentes tipos de lesiones del tejido cervical, estableciendo así sus diferencias en patogenicidad. Este estudio tiene como fin determinar la frecuencia en que se encuentran los tipos 16 y 18, sumado a sus variantes genéticas de los genes E6 y E7, en muestras de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) o CC almacenadas en el Hospital Roosevelt y en el laboratorio de patología médica PATMED.

Esto fue realizado a partir de tejidos cervicales embebidos en parafina y diagnosticados por un patólogo con un análisis citológico. El tejido obtenido a partir de la biopsia cervical fue procesado para su análisis con una prueba de PCR múltiple anidado que permitió conocer el tipo de VPH que presenta cada paciente. El Hospital Roosevelt es uno de los centros asistenciales más recurridos dentro del país, por lo que la información generada brinda información sobre las características del VPH y sus variantes más peligrosas. Además, el laboratorio de patología médica PATMED es un laboratorio que presta sus servicios a varios hospitales privados del país, contando con una gran cantidad de muestras.

#### **4. Planteamiento del problema**

En Guatemala, el CC sigue siendo la primera causa de morbimortalidad en la mujer, llegando a representar el 24% de casos de cáncer en el país. En el 2017, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó que, entre los años 2008 y 2017, Guatemala ha presentado un total de 3,339 casos, con un promedio de 371 casos de CC al año y con tasas de incidencia y mortalidad de 22.3 y 12.5 por 100,000 mujeres entre las edades de 25 y 69 años, respectivamente (Organización Panamericana de la Salud, 2018; Luciani et al., 2013; Sam, 2017). Sin embargo, estimaciones realizadas por el Observatorio Global de Cáncer (GLOBOCAN, por sus siglas en inglés) estimó para los años de 2012 y 2013, un total de 1,400 y 1,530 nuevos casos, respectivamente, lo cual son estadísticas mucho más elevadas (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2014). Los estadios 0 y 1 del CC se encuentran en mayor porcentaje en mujeres jóvenes y conforme avanza la edad aparece un mayor número de estadios más avanzados. Un análisis de mortalidad por grupo etario, revela que la mortalidad aumenta considerablemente conforme avanza la edad (Berek & Hacker, 2015). En Guatemala, a partir de los 25 años, incrementa el riesgo de desarrollar CC y su máximo riesgo se

encuentra entre los 45 y 54 años (Sam, 2018). Por ello, la investigación del VPH y su relación con las LEIAG y el CC es de interés prioritario en la problemática de la salud sexual en Guatemala. Es importante mencionar que las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) no serán incluidas dentro de este estudio, debido a la baja prevalencia de los tipos 16 y 18 en este tipo de lesiones. Esto es posible observarse, en un metanálisis realizado, donde se encontró que los tipos 16 y 18 en LEIBG poseen una prevalencia de 13 y 4%, respectivamente, representando una porción muy pequeña de la muestra tomada (Peralta-Rodríguez et al., 2012). Por lo que las LEIBG no representan una variable importante dentro de nuestros análisis y tampoco en el ámbito clínico, dado su bajo porcentaje de progresión a LEIAG y CC. Asimismo, a pesar de que se conoce que los tipos 16 y 18 son los más frecuentes en las LEIAG y el CC, poco se sabe de sus características y variantes genéticas en Guatemala. Además, el hecho de que los tipos 16 y 18 presenten diferencias en sus características genéticas entre países, demuestra la necesidad de conocer las características de los oncogenes E6 y E7 en el país (Moya-Salazar & Rojas-Zumaran, 2017). Es de suma importancia conocer las características genéticas del virus y sus variantes en los oncogenes E6 y E7 y de esa manera establecer aquellas variantes que representen un mayor riesgo en el desarrollo de las LEIAG y el CC. Así mismo, la descripción de las relaciones filogenéticas de los linajes del virus asociados a las LEIAG y el CC permitirá hacer inferencias para el manejo y control del virus en el país.



## 5. Delimitación en tiempo y espacio

### 5.1 Delimitación en tiempo

La recolección de muestras se llevó a cabo entre el mes de febrero y el mes de septiembre del año 2022. Los análisis moleculares se realizaron conforme se llevaron a cabo la recolección de la muestra y se concluyó en el mes de septiembre. Los análisis moleculares se llevaron a cabo durante los meses de noviembre 2022 a enero 2023.

### 5. Delimitación espacial

La toma de muestras se realizó en el departamento de patología del Hospital Roosevelt, ubicado en la Ciudad de Guatemala y en el laboratorio de patología médica PATMED. Los análisis moleculares y bioinformáticos se llevaron a cabo en el laboratorio de biología molecular del CUNZAC.

## 6. Marco teórico

### 6.1 Epitelio exocervical

El cuello uterino o cérvix, constituye la región inferior del útero. Está compuesto por tejido fibromuscular denso y cubierto por dos tipos de epitelio, el exocérvix y el canal endocervical. El exocérvix constituye la parte inferior del cuello uterino, se encuentra en el interior de la vagina y es visible con la ayuda de un espéculo. Éste se encuentra recubierto por epitelio escamoso no queratinizado, parecido al epitelio vaginal (Grover & Pandey, 2017). Se compone por tres estratos: el estrato basal o germinal, el estrato medio y el estrato superficial. El estrato basal está constituido por una sola hilera de células basales que se disponen de forma perpendicular a la membrana basal. Las células parabasales, son las encargadas del crecimiento y regeneración epitelial. El estrato medio se encuentra formado por células que están madurando que se caracterizan por tener un citoplasma aumentado. Por su parte, el estrato superficial, es el compartimento más diferenciado del epitelio y su función es la protección contra infecciones (Rajaram et al., 2012; Tatti, 2011).

### 6.2 Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG)

El Sistema Bethesda de nomenclatura incluye también el término de lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG). Por lo general LEIAG se caracteriza por una proliferación de células parabasales atípicas; cuando estas ocupan más de 2/3 del espesor epitelial se denominan NIC 2, mientras que si

abarcan todo el espesor se llaman NIC 3 (Flores et al., 2002). Las células se caracterizan por ser inmaduras con nula polaridad, sobreposición de los núcleos y anisonucleosis; el núcleo es oval o ligeramente alargado, orientación vertical y carente de nucléolo; además el citoplasma es escaso en las capas basales y mejor definido en las más superficiales; se pueden detectar coilocitos y disqueratocitos, principalmente en las lesiones correspondientes a una NIC 2 (DiSaia, 2002). Además, las modificaciones nucleares son muy relevantes, con un marcado incremento de la relación núcleo-citoplasma, cromatina grumosa y múltiples anomalías en la membrana nuclear (Flores et al., 2002). Además, existe una atipia moderada a intensa y una desorganización desde el estrato basal hasta el intermedio y aumentando la proliferación de células inmaduras atípicas (Jackson et al., 2012). Una característica importante es la presencia de mitosis anormales, las cuales se pueden ver tanto en la citología como en la biopsia. Muchas de las lesiones de alto grado son aneuploides y los hallazgos morfológicos que mejor se correlacionan con la aneuploidía son las figuras mitóticas anormales (DiSaia, 2002).

### 6.3 Cáncer de Cérvix

El cáncer de cérvix (CC) continúa siendo uno de los cánceres más comunes entre las mujeres alrededor de todo el mundo, solamente detrás del cáncer de mama, colorrectal y de pulmón. En los países en desarrollo es más común, siendo el segundo cáncer más común en incidencia y el tercero con mayor mortalidad (Global Cancer Observatory, 2012). En Guatemala, el 35% de la población consiste en mujeres entre los 25-54 años de edad. La falta de tamizajes en Guatemala contribuye a una alta incidencia del CC de 21.2 por cada 100,000 mujeres, lo cual es mucho mayor que en otros países en los que el tamizaje es más común, tal es el caso de Estados Unidos que posee una incidencia de 6.5 por cada 100,000 mujeres (Gottschlich et al., 2020). El CC se extiende en el parametrio, vagina, útero, órganos adyacentes (vejiga y recto) y nodos linfáticos cercanos. Además, el desarrollo de metástasis a pulmones, hígado y esqueleto por la vía hematogena es tardía (Bhatla et al., 2018). La unión escamo-columnar del epitelio cervical es la zona con mayor susceptibilidad a la infección por el VPH y la más frecuente de localización del carcinoma. El riesgo para la progresión a CC depende de la persistencia de la infección y en la integración del ADN viral en las células basales del estrato epitelial, siendo los virus de alto riesgo los que se integran al ADN hospedero (Grillo-Ardila et al., 2008). La WHO

reconoce dos principales tipos histológicos de CC que son el carcinoma de células escamosas (75% de todos los casos) y el adenocarcinoma (15-25% de los casos). De tal manera, existen diferentes tipos histológicos de cáncer cervicouterino como el carcinoma de células escamosas del cérvix, adenocarcinoma cervical, carcinoma adenoescamoso y los tumores neuroendocrinos del cérvix (Vicuña et al., 2009).

## 6.4 Virus del Papiloma Humano

### 6.4.1 *Biología del Virus del Papiloma Humano*

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a cinco de los 18 géneros de la familia Papillomaviridae, siendo los géneros alfa, beta, gamma, mu y nu. El VPH posee una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros pentaméricos y un diámetro de 55 nanómetros (Howley & Lowy, 2007). El genoma del VPH es circular y de ácido desoxirribonucleico (ADN) con un tamaño aproximado de 8,000 pares de bases (Toro-Montoya & Tapia-Vela, 2021). El genoma del virus posee un origen de replicación, de unión a factores de transcripción y control de la expresión génica conocido como LCR (Chan et al., 2019). Los genes se dividen en dos grupos: tempranos y tardíos. Los genes tempranos son E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y los tardíos L1 y L2. Algunos papilomavirus presentan dos marcos de lectura adicionales E3 y E8 (Santos-López et al., 2015). Los genes tempranos E1, E2, E4 y E5 se encargan de la replicación y transcripción del ADN viral y juegan un papel importante en la apoptosis, proliferación celular, alteración de las rutas de señalización, reconocimiento inmune y, en el caso de E2, en la inhibición de E6 y E7. El gen E6 participa en la degradación de p53, altera la regulación del ciclo celular, confiere resistencia a la apoptosis, inestabilidad cromosómica e inmortalización celular. El gen E7 está involucrado en la degradación de pRb, regula la reentrada a la fase S del ciclo celular y regula la sobreexpresión de p16 (Howley & Lowy, 2007; de Sanjosé et al., 2018). Existen más de 150 genotipos diferentes de VPH, entre los cuales solamente 40 afectan al ser humano. Los tipos que afectan al ser humano son clasificados en dos grupos, de acuerdo a su prevalencia en lesiones malignas: alto riesgo y bajo riesgo. Los denominados de alto riesgo son causantes del CC (De la Fuente-Villarreal et al., 2010). Los tipos 16 y 18 son causantes de aproximadamente el 70% de los casos de CC. Mientras que el otro 30% es repartido entre los tipos 31,

33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 66 y 68. Por otro lado, los tipos de bajo riesgo solamente causan pequeñas lesiones o verrugas (Munoz et al., 2003).

#### **6.4.2** *Ciclo de vida y carcinogénesis del Virus del Papiloma Humano*

El ciclo de vida del virus se divide en una etapa temprana y otra tardía los cuales están ligados al estado de diferenciación epitelial de las células infectadas. El VPH infecta los queratinocitos basales del conglomerado columnar-escamoso del cérvix e introduce los viriones por la interacción de la proteína L1 con la superficie celular (Day et al., 2007; Doorbar & Griffin, 2007; Smith et al., 2007). El virus entra a la célula por endocitosis dependiente de clatrina mediada por receptor. Posterior a la entrada del virus a la célula, la proteína L2 y el genoma viral migran al núcleo celular y una vez dentro del núcleo, el genoma empieza a transcribirse. Las proteínas E1 y E2 son las primeras en expresarse y regulan la replicación del genoma viral episomal. Luego, los genes E1, E2, E5, E6 y E7 al expresarse inducen la proliferación celular, incrementando el número de células susceptibles a la infección. Posteriormente, inicia la expresión del gen E4 que regula positivamente la replicación viral y, finalmente, activa la transcripción de los genes L1 y L2, los cuales son proteínas de la cápside viral y permiten la salida de nuevos viriones que podrán infectar otras células (Conway & Meyers, 2009; Doorbar et al., 2012; Howley & Lowy, 2007).

El genoma de los tipos de alto riesgo, suelen encontrarse integrado al genoma humano en los pacientes con CC invasivo y ha sido propuesto que este es el paso clave para la transición de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado a CC. La integración del virus ha sido un tema muy estudiado debido a que podría proporcionar información para el tratamiento de estas lesiones y detener la proliferación de las células cervicales. El virus utiliza las regiones más susceptibles de los cromosomas celulares, ya que no afectan los ciclos de división y replicación normales. Las oncoproteínas E6 y E7 interrumpen el ciclo normal de la división celular del hospedero. Inhiben los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) y degradan la proteína p53 (Longworth & Lalmins, 2004; Xiaoqun et al., 2019). Estas proteínas son descritas como supresores tumorales, debido a que son capaces de regular la división celular. La proteína p53 es encargada de detener la mitosis en la etapa entre las fases G1 y S, esto en caso de detectar alguna alteración en el ADN. Esto sugiere que una alteración o la degradación de ésta, produciría una proliferación celular descontrolada (López et al., 2001).

Un estudio reciente llevado a cabo en Guatemala reportó que en LEIAG y en CC los tipos de alto riesgo 16 y 18 fueron los más prevalentes al ser comparados con otros tipos de alto riesgo del virus (García et al., 2019). Por otra parte, las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) únicamente presentan un porcentaje de progresión a LEIAG y CC del 10 y 1%, respectivamente (Apgar et al., 2009). Además, estudios de metaanálisis han demostrado que las LEIBG presentan en menores porcentajes a los tipos 16 y 18 en comparación a lo observado en LEIAG y CC. (Peralta-Rodríguez et al., 2012).

### *6.4.3 Linajes y variantes de los genes E6 y E7 en los tipos 16 y 18 del Virus de Papiloma Humano*

Las variantes en los genes E6 y E7 han sido relacionados con la progresión de las lesiones cervicales. Las variantes de E6 y E7 presentes en los linajes asiáticos y americanos de VPH 16 han sido asociados a la persistencia de la infección y un mayor riesgo de progresión a lesiones cervicales, como lo es un mayor riesgo de NIC 3 y CC (Gheit et al., 2011). Además, se ha reportado que las variantes incrementan la habilidad de transformación de los queratinocitos in vitro, y factores de riesgo como la virulencia del virus y el escape inmunológico los cuales están asociados a la progresión de CC (Zhe et al., 2019). Por su parte, las variantes del VPH 18 han sido asociadas a la persistencia y progresión de los adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas. No obstante, se conoce que las variaciones del VPH 18 también producen diferencias en el potencial oncogénico. Por ejemplo, se ha reportado en estudios latinoamericanos que variantes no europeas incrementan la persistencia del virus y se encuentran más asociadas a las lesiones de alto grado que las variantes europeas. Finalmente, las variantes de E6 del VPH 18 representan una gran cantidad de información filogenética con la que se han apoyado las propuestas de clasificación filogenéticas del virus (Chen et al., 2015; Villa et al., 2000).

Las variantes de los genes E6 y E7 en los tipos 16 y 18 del VPH muestran una correlación con la progresión de las lesiones de cérvix y varían por etnia y origen geográfico de la paciente diagnosticada con la infección por VPH (Xi et al., 2006). Las variantes intra típicas del VPH son definidas por tener menos de un 10% de variación en la secuencia del gen L1 con respecto a una cepa de referencia. Mientras que variantes entre 0.5-2% al analizar el genoma completo entre los tipos de VPH definen

linajes distintos (De Boer et al., 2005). Las variantes intra típicas del virus son divididas y clasificadas de manera filogenética. De tal manera, el VPH 18 posee tres linajes reportados: Europeo, Africano y Asiático-Amerindio; y 8 distintos sublinajes: A1-5, B1-3 y C. Siendo los sublinajes A de origen Asiático-Amerindio y Europeo, y los sublinajes B y C de origen Africano (Burk et al., 2013; Ong et al., 1993). Así mismo, para el VPH 16 han sido propuestos los linajes Europeo, Norteamericano, Central y Sudamericano, Sureste asiático y Africano (Yamada et al., 1997). Los diferentes linajes de VPH que han sido descritos y propuestos se presentan en determinados y específicos tipos de histopatologías (LEIAG y CC). Un estudio llevado a cabo en China en el cual se evaluaron tres linajes distintos de VPH 16 basados en los genes E6/E7 reportó que los linajes se encontraron asociados a diferentes grados de lesiones cervicales (Zhe et al., 2019). En México un estudio que evaluó tres linajes de VPH 16 (Europeo, sub variante a Asiático-Americano y sub variante c Asiático-Americano) reportó que el linaje Europeo se encontró con mayor frecuencia en el CC a comparación con las LEIAG, mientras que la sub variante c solamente se encontró en CC. Así mismo, reportaron que para tres linajes del VPH 18, el Europeo se encontró únicamente en CC (Lizano et al., 2006). En Guatemala se han reportado a los linajes de VPH 16, D2 y D3 como los más frecuentes en CC y adenocarcinoma (Lou et al., 2020). No obstante, aún no se cuenta con información sobre la relación de los linajes de VPH 16 con LEIAG. Además, sobre los linajes de VPH 18 aún no se cuenta con información.

### 6.5 Presión selectiva

La presión selectiva se refiere a cualquier fenómeno externo a las poblaciones de VPH, como los antivirales o la respuesta inmune, que afecta directamente la manera en la que los alelos aparecen en la población (Stanovov et al., 2018). Los genes E6 y E7, al ser genes que se ven involucrados directamente en la oncogénesis y como consecuencia, en la proliferación viral, son genes que están sometidos a presiones selectivas (Chen et al., 2019). La importancia de realizar análisis evolutivos en agentes infecciosos, es la forma en la que permite determinar la manera en que varían las frecuencias de diferentes alelos de estos genes, que pueden hacer a los linajes de VPH más patogénicos (King et al., 2016). Un análisis muy utilizado para inferir si existe presión selectiva, es el ratio de sustituciones nucleotídicas no sinónimas y sinónimas (dN/dS). Esto es ampliamente utilizado, dado que puede inferir selección hasta el nivel de codón (King et al., 2016). Los resultados en este análisis se

interpretan como una presión selectiva positiva cuando el valor de  $dN/dS$  es mayor a 1 y se identifica como presión selectiva purificadora cuando el valor de  $dN/dS$ , es menor a 1 (Fрати et al., 2020).

## 7. Estado del arte

La manera en la que el VPH afecta las células del cérvix sigue siendo materia de estudio. La infección por los tipos de VPH de alto riesgo se encuentra relacionada con el elongamiento y el crecimiento de las células exteriores del cuello uterino en un 57% de casos y en un 18.6% de casos cuando la infección es por VPH de bajo riesgo (Iijima et a., 2019). La infección por los tipos de VPH 6/11 y 16/18 se encuentran en un 31.95% y 34.91% de casos de hiperplasia de mama, respectivamente; además los tipos de VPH 6/11 y 16/18 se encuentran en un 11.83% y 14.79% de los casos de tejido normal, respectivamente. Por lo que, las infecciones por los tipos de VPH 6/11 y 16/18 podría estar relacionada con el desarrollo de hiperplasia de mama (El-Sheikh et al., 2021).

Varios estudios actuales han sido relacionados con el tema de terapia dirigida hacia los oncogenes E6 y E7, causantes de la proliferación celular en pacientes que presentan lesiones premalignas y CC, por lo que han sido el blanco principal de los tratamientos más novedosos. Por ejemplo, ha sido comprobado que el miR330-5 es capaz de suprimir una serie de factores de transcripción tanto del hospedero como del virus y reduce la transcripción de los oncogenes E6 y E7, disminuyendo el daño a los tejidos (Cui et al., 2019).

Actualmente, diversos estudios evalúan la funcionalidad de la vacuna en diversas partes del mundo. Se ha estudiado el impacto a largo plazo que puede producir, la cobertura y el acceso que están teniendo diferentes países alrededor del mundo (Rodriguez et al., 2020; Wang et al., 2020). Con relación a las medidas tomadas para combatir el cáncer de cérvix en Guatemala, la vacuna contra el VPH fue introducida en el año 2018. No obstante, en Latinoamérica se introdujo desde el año 2006 y, junto a ello, se han implementado programas de monitoreo y cobertura de casos en países como Argentina, Brasil, México, Honduras, Puerto Rico, entre otros. A pesar de ello, en Guatemala los esfuerzos son muy reducidos para el desarrollo de un programa de monitoreo que de un seguimiento y cobertura de los datos disponibles (Luciani et al., 2018).

Por último, existen estudios moleculares con objetivos similares a los presentados en nuestro estudio, que han sido publicados recientemente por investigadores de países asiáticos y europeos (Li et al., 2020). Se han estudiado las variantes y los linajes en las proteínas E6/E7 de los tipos 16 y 18 en China, Japón, Corea del Sur, Irán, Italia, Croacia, entre otros (Dai et al., 2020; Frati et al., 2020; Hosseini et al., 2020; Karadza et al., 2020; Yamaguchi-Naka et al., 2020). En dichos estudios se ha encontrado que los distintos linajes, ubicados en regiones geográficas específicas, presentan características genéticas diferentes y que las frecuencias de las variantes genéticas de los genes E6/E7 varían entre linajes (Ferreira et al., 2021). Además, han sido descubiertas nuevas variantes en las proteínas E6/E7 en los tipos de alto riesgo del VPH, las cuales podrían estar asociadas a una mayor patogenicidad del virus (Kim et al., 2020).

## 12. Objetivos

### 8.1 General

Determinar los tipos de VPH 16 y 18 de 142 muestras de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) y/o cáncer de cérvix (CC).

**Nota:** Los objetivos generales y específicos fueron modificados según el acuerdo de dirección Digi P056-2022 (Figura.1)



## 12.Hipótesis

No aplica.

## 12.Materiales y métodos

### 10.1 Enfoque de la investigación

Enfoque Mixto.

### 10.2 Método

El método utilizado para la recolección de muestra fue a partir de la autorización de las autoridades del Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED, con la cual se obtuvieron las muestras cervicales que estaban almacenadas y fueron anteriormente tomadas, embebidas en bloques de parafina y diagnosticadas histo-morfológicamente por ginecólogos y patólogos del departamento de patología del Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED. Un citotecnólogo obtuvo dos scrolls para cada paciente, a partir de los bloques de parafina que contenían las muestras cervicales anteriormente diagnosticadas como LEIAG o CC, haciendo uso de un micrótopo. Cada scroll fue enviado en un tubo de microcentrífuga al Laboratorio de Inmunogenética del Hospital Roosevelt o al Laboratorio de Biología Molecular del CUNZAC.

Los laboratorios cuenta con áreas para la extracción de ADN, áreas de pre-PCR y áreas de PCR en las cuales se llevó a cabo la amplificación de los genes de interés. Además, cuenta con técnicos de laboratorio experimentados en análisis moleculares y bioinformáticos. Se cuenta con termocicladores de punto final MiniAmp y MiniAmp Plus con los cuáles se realizó la detección del VPH y su tipificación.

## 10.3 Recolección de información

Las muestras que se emplearon fueron tejidos embebidos en bloque de parafina provenientes de biopsias cervicales. Las biopsias que se utilizaron son de pacientes diagnosticadas histomorfológicamente con LEIAG o CC. El diagnóstico fue llevado a cabo por médicos ginecólogos y patólogos del Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED, y las muestras positivas para LEIAG o CC fueron incluidas en el estudio. De las biopsias embebidas en parafina seleccionadas se obtuvieron dos scrolls haciendo uso de un micrótopo para su posterior extracción de ADN. Se usó un muestreo a conveniencia y no probabilístico. El muestreo a conveniencia responde al costo elevado de las pruebas y metodologías a utilizar, lo que hace imposible trabajar con un número mayor de muestras. La extracción de ADN se realizó con un kit de extracción a partir de tejido embebido en bloque de parafina.

La tipificación de los virus de alto riesgo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunogenética del Hospital Roosevelt y el Laboratorio de Biología Molecular del CUNZAC. Fue realizado por técnicos de laboratorio de biología molecular y supervisado por un especialista. Se utilizó la metodología de PCR en punto final.

Universo o población: muestras de tejido embebido en parafina proveniente de pacientes mujeres guatemaltecas que presentaron un diagnóstico histomorfológico de LEIAG o CC.

Muestra: muestras de tejido embebido en parafina proveniente de pacientes mujeres que presentan diagnóstico histomorfológico de LEIAG y muestras de tejido embebido en parafina proveniente de pacientes que presentan diagnóstico histomorfológico de CC que acudieron a la clínica de colposcopia del Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED.

Criterios de inclusión: muestras de tejido embebido en parafina proveniente de pacientes mujeres mayores de edad que hayan presentado un diagnóstico histomorfológico de LEIAG o CC.

Criterios de exclusión: muestras de tejido embebido en parafina proveniente de pacientes mujeres mayores y menores de edad que no hayan presentado un diagnóstico histomorfológico de LEIAG o CC.

Criterios de selección de informantes: los encargados de seleccionar las muestras de tejido embebido en parafina con el mejor tejido serán especialistas en el área de colposcopia y patología que laboran en el Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED.

Instituciones: departamento de patología del Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED: selección de muestras de tejido embebido en parafina provenientes de pacientes mujeres mayores de edad que hayan presentado un diagnóstico histo-morfológico de LEIAG o CC.

Laboratorio de Inmunogenética del Hospital Roosevelt o el Laboratorio de Biología Molecular del CUNZAC: almacenamiento de muestras, realización de PCR para amplificación de genes E6/E7 y escritura de informe final. Realización de PCR para la detección y tipificación de VPH que permita determinar los tipos de alto riesgo.

## **10.4** Técnicas e instrumentos

### **10.4.1** *Recolección de muestra*

Se recolectaron muestras embebidas en bloque de parafina almacenadas en el departamento de patología del Hospital Roosevelt y del laboratorio PATMED y que poseían un diagnóstico histo-morfológico de LEIAG o CC. De los bloques de parafina se obtuvieron scrolls haciendo uso de un microtomo con una medida entre 4µm hasta 20 µm. Los scrolls fueron colocados en un tubo de microcentrífuga y se transportaron al Laboratorio de Inmunogenética del Hospital Roosevelt y al Laboratorio de Biología Molecular del CUNZAC. Se contó con dos grupos de muestras: el primero constituido por lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) y el segundo por cáncer de cérvix (CC). Fueron seleccionados estos dos tipos de lesiones debido a que en ellas se ha reportado una mayor proporción de los tipos de alto riesgo de VPH 16 y 18. Además, las LEIAG y el CC representan una mayor importancia clínica y oncológica para el médico oncólogo.

### **10.4.2** *Extracción y purificación de ácidos nucleicos (ADN)*

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir del kit GeneJET FFPE DNA Purification Kit (#K0882). Para ello se siguió el protocolo establecido por el fabricante el cual se detalla a continuación. Primero se agregó uno o más scrolls (hasta ocho máximos) de 10 µm de grosor a un tubo de microcentrífuga de 2.0 ml y se añaden 200 µl de Digestion Buffer. Se realizó una incubación a 90°C durante 3 minutos usando un bloque térmico. Durante la incubación se mezcló la muestra por agitación manual.

Finalizada la incubación se mezcló con vortex para terminar de disolver la parafina, se enfrió a temperatura ambiente y se realizó un spin corto para limpiar la tapa del tubo. Se agregó 20  $\mu$ l de la solución de Proteinasa K, se mezcló con vortex para uniformizar la suspensión y se realizó un spin corto para limpiar la tapa del tubo. Se incubó la muestra a 65°C durante 50 minutos en un bloque térmico o thermoshaker, realizando vortex ocasionalmente. Posterior a la incubación, la muestra se transfirió a un bloque térmico y se incubó a 90°C durante 40 minutos. Finalizando la incubación, la muestra se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto y se transfirió 200  $\mu$ l del lisado a un nuevo tubo de 2.00 ml, dejando todas las partículas de parafina. Se añadió 10  $\mu$ l de la solución de RNase A a la muestra, se mezcló con vortex, se realizó un spin corto para limpiar la tapa del tubo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalizados los 10 minutos, se añadió 200  $\mu$ l de Binding Buffer, se mezcló con vortex durante 10 segundos para uniformizar la suspensión y se realizó un spin corto para limpiar la tapa del tubo. Además, se añadió 400  $\mu$ l de Etanol (96-100%) a la muestra, se mezcló con vortex durante 10 segundos para uniformizar la suspensión y se realizó un spin corto para limpiar la tapa del tubo. El lisado obtenido se transfirió a una GeneJET DNA Purification Column (columna) insertada en un tubo colector, se realizó una centrifugación a 6000 x g durante 1 minuto, se descartó el tubo colector con el filtrado y la columna se colocó en un nuevo tubo colector. Se agregó 500  $\mu$ l del Wash Buffer 1, se realizó una centrifugación a 8000 x g durante 1 minuto, se descartó el filtrado y la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo colector. Se agregó 500  $\mu$ l de Wash Buffer 2, se realizó una centrifugación a máxima velocidad (12000 x g) durante 3 minutos, se descartó el filtrado y la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo colector. Se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad (12000 x g) durante 1 minuto para secar la membrana, se descartó el tubo colector con el filtrado y la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2.0 ml. Se agregó 60  $\mu$ l de Elution Buffer directamente al centro de la membrana de purificación de la columna, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos y se realizó una centrifugación a 8000 x g

durante 1 minuto. Se descartó la columna y el ADN purificado puede ser utilizado o almacenado a -20°C.

### **10.4.3** *Cuantificación de ADN*

La cuantificación de ADN genómico para cada una de las muestras se utilizó el equipo Nanodrop de ThermoFisher Scientific. Cada muestra fue agitada en el vórtex y fue centrifugada. Posteriormente se cargó al Nanodrop un 1 µl de agua ultra pura, para ser usada como blanco de lectura. Luego se cargó 1 µl de cada muestra individualmente al Nanoprop para ser cuantificada. Las muestras debieron tener una concentración mayor o igual a 10 ng/µl para ser analizadas mediante PCR en punto final.

### **10.4.4** *Detección del VPH y Genotipificación de los tipos de alto riesgo 16 y 18*

La detección del VPH y la genotipificación de los tipos de alto riesgo 16 y 18, se llevó a cabo utilizando la metodología de PCR múltiple anidado propuesto por Sotlar y colaboradores (2004). Para esto se utilizó la plataforma MiniAmp™ Plus Thermal Cycler de Applied Biosystems. La detección del ADN viral de VPH se realizó en la primera reacción del PCR múltiple anidado para esto se utilizaron los cebadores degenerados GP-E6-3F, GP-E7-5B y GP-E7-6B (Sotlar, et al., 2004). Para estas reacciones se utilizaron 25 µl de DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (2X) (KA9011, Thermofisher Scientific), 3.75 µl de cada cebador forward y reverse (0.75 uM), 10 pg o 1 µg de cada muestra y se llegó a un volumen final de 50 µl con agua ultrapura libre de nucleasas. Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 40.0°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

La genotipificación de los tipos 16 y 18 de VPH se realizó en la segunda reacción. Los cebadores forward 5'-cacagttatgcacagagctgc-3' y reverse 5'-catatattcatgcaatgtaggtgta-3' se utilizaron para la genotipificación del tipo 16 (Sotlar, et al., 2004). Para la genotipificación del tipo 18 se utilizaron los cebadores forward 5'-cacttcaactgcaagacataga-3' y reverse 5'-gttgtgaaatcgctgttttca-3' (Sotlar, et al., 2004). Para estas reacciones se utilizaron 25 µl de DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (2X) (KA9011, Thermo Fisher Scientific), 3.75 µl de cada uno de los cebador forward y reverse (0.5 uM), 10 pg o 1 µg de los amplicones de la primera reacción y se llegó a un volumen final de 50 µl con agua ultrapura libre de nucleasas. Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 40°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y 1 ciclo a 72°C por 10 minutos. Se obtuvieron amplicones con un tamaño de 457 pb para el genotipo 16 de VPH y para el genotipo 18 de VPH, amplicones de 322 pb. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular con sensibilidad de 50 pb.

## 10.5 La Procesamiento y análisis de la información

El ordenamiento y procesamiento de datos, se llevó a cabo en los programas Microsoft Excel. Se calcularon las prevalencias de los tipos de VPH 16 y 18.

## 11. Resultados y discusión

### 11.1 Resultados

Se colectaron 142 bloques de tejido en parafina, 38 de estos provenían del Hospital Roosevelt y 104 del laboratorio de patología médica PATMED. De los bloques de tejido embebido en parafina 92 pertenecían a LEIAG y 50 de CC (Tabla 1). El 23.94% de muestras colectadas fueron positivas para VPH 16, el 0.70% para VPH 18 y 75.35 fueron negativas para VPH 16 y VPH 18. La prevalencia para VPH 16 y/o VPH 18 en LEIAG fue de 27.17% y para CC fue del 20%. La prevalencia de VPH 16 (26.08%) en LEIAG fue mayor en comparación a la de VPH 18 (1.08%). Para CC la prevalencia de VPH 16 fue del 20% sin embargo fue nula para presencia de VPH 18 para este grupo (Tabla 2).

**Tabla 1***Tipos de muestras para la detección de los tipos VPH 16 y VPH 18*

Tipo de Muestra	Cantidad
LEIAG	92
CC	50
Total	142

**Tabla 2***Resultados de detección y prevalencia de los tipos VPH 16 y VPH 18 en LEIAG y CC.*

Tipo de muestra	Positivo VPH 16	Positivo VPH 18	Prevalencia VPH 16	Prevalencia VPH 18
LEIAG	24	1	26.08	1.08
CC	10	0	20	0

## 11.2 Discusión de resultados

El presente estudio determinó la relación entre las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y cáncer de cérvix con los linajes de los tipos 16 y 18 del virus de papiloma humano basados en los genes E6 y E7. Sin embargo, por la problemática actual de la Universidad de San Carlos de Guatemala hubo un retraso importante en la compra de los insumos y reactivos más la inaccesibilidad de los laboratorios de la Universidad de San Carlos dio como resultados un retraso significativo en la implementación de metodologías y en el análisis de las muestras. Por lo que, se sustituyó el objetivo general y los objetivos específicos por determinar los tipos de VPH 16 y VPH18 de 142 muestras de lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) y/o cáncer de cérvix (CC).

Sin embargo, este estudio determinó la presencia de los tipos VPH16 y VPH18 en muestras de lesiones intraepiteliales de alto grado (LEIAG) y/o cáncer de cérvix (CC). Este es uno de los escasos estudios realizados en Guatemala en donde se determinó la prevalencia de VPH16 y VPH18 los cuales son los más prevalentes en el país. La prevalencia de VPH16 y/o VPH18 en LEIAG fue de 27.17% y

para CC fue de 20%. Se determinó que el serotipo más prevalente en LEIAG y CC fue el VPH16. Por el contrario, VPH18 se determinó en una muy baja prevalencia en LEIAG y se encontró totalmente ausente en CC. Estos resultados coinciden parcialmente con los de un estudio realizado durante el 2017 en el Instituto Nacional de Cancerología de Guatemala en donde se determinó la prevalencia de serotipos de alto riesgo de VPH en mujeres libres de cáncer cervical. Los resultados de este estudio determinaron una prevalencia del 22% para VPH16 y 11% para VPH18 (Lou, Gharzouzi, Guerra, 2018).

Sin embargo, estos resultados no coinciden con los presentados en múltiples estudios realizados en Guatemala. Durante un estudio realizado en Guatemala durante el 2007 se determinó que en 112 mujeres con cáncer cervical positivas para VPH presentaron una prevalencia de 39% para VPH16 y 16% para VPH18 (Arroyo, et al., 2008). Las prevalencias reportadas en el informe del virus del papiloma humano y enfermedades relacionadas del 2021 para Guatemala en donde se encontró que las mujeres que presentaban lesiones cervicales de alto grado positivas para VPH 16 y/o VPH 18 representaron el 56.9% y 68.2% de mujeres con cáncer cervical fueron positivas para VPH 16 y/o VPH 18 (Bruni, *et al.*, 2021). Las discrepancias entre las prevalencias de VPH16 y VPH18 en lesiones de alto grado y/o cáncer cervical reportadas en estos estudios y la reportada en la presente investigación pueden explicarse a las diferencias entre el número de muestras analizadas, el tipo de muestras analizadas y una baja representatividad de la diversidad étnica, socioeconómica y cultural del presente estudio.

Adicionalmente, los resultados reportados en este estudio no coinciden con los reportados en otros estudios a nivel mundial. En un estudio realizado en Latino América y el Caribe para determinar la prevalencia de HPV en mujeres con lesiones de alto grado y cáncer cervical en donde se incluyeron 18 países. El metaanálisis determinó una prevalencia en lesiones de alto grado para VHP16 del 46.5% y para VPH18 de 8.9%. Para mujeres con cáncer cervical se encontró una prevalencia para VPH16 de 53.2% y para VPH18 de 13.2%, estos serotipos fueron los más prevalentes para ambos grupos (Ciapponi, *et al.*, 2011). Adicional a esto las prevalencias reportadas para países Nórdicos positivos para VPH16 en lesiones de alto grado 35.2% y 6.4% para VPH18, por el contrario para mujeres con cáncer cervical la prevalencia para VPH16 fue de 50.2% y para VPH18 fue de 7.9% (Dovey, *et al.*, 2019). Estudios realizados en Israel para determinar la prevalencia de VPH16 y VPH18 en lesiones de alto grado y cáncer cervical. Se determinó que las lesiones cervicales presentaron una prevalencia



de VPH16 del 42% y para VPH18 4.9%. Para las mujeres con cáncer cervical se encontró una prevalencia para VPH16 de 57.4% y para VPH18 de 7.8% (Siegler, *et al.*, 2017). En china la prevalencia reportada en el 2021 para lesiones de alto grado positivas para VPH16 fue de 58.6 y para VPH18 fue de 10.8%, por el contrario para mujeres con cáncer cervical el 91.6% fue positiva para VPH16 (Guo, *et al.*, 2021). En un estudio realizado en Yemen se determinó que la prevalencia de los VPH16 y VPH18 en mujeres con CC fue de 37% para VPH16 y 16% para VPH18 (Ahmed, *et al.*, 2018). En Curacao la prevalencia para VPH16 y VPH18 en lesiones de alto grado fue de 30.8% y 10.3% respectivamente y para cáncer cervical fue de 38.5% y 13.5% respectivamente (Hooi, Lissenberg-Witte, Koning, 2018). Las discrepancias entre las prevalencias reportadas en este estudio y los mencionados anteriormente pueden deberse a factores culturales, socioeconómicos propias de cada región o a las diferencias entre las metodologías utilizadas.

La baja prevalencia de las muestras a VPH16 y VPH18 posiblemente se deba al método de preservación del tejido de las muestras. El formaldehído empleado en la fijación de los tejidos de las muestras pudo haber producido una degradación o fragmentación del ADN y entrecruzamiento entre las proteínas y el ADN, esto puede imposibilitar la amplificación de la región diana del ADN para la detección de VPH16 y VPH18 (Gilbert & Cohen, 1987; Wilson, 1997). El entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas producen un aumento en la sensibilidad del ADN al estrés mecánico y disminuye la accesibilidad de las enzimas, esto podría explicar en parte la baja eficiencia de la PCR lo cual dio como resultado una baja positividad (Bonin, Petrer, Niccolini, B, & Stanta, 2003). Adicional a esto la degradación y fragmentación del ADN producida por el formaldehído posiblemente limitó la disponibilidad de la región diana de 630 bp de los oncogene e6/e7 para la detección de los diferentes serotipos de VPH ya que esta degradación produce por lo general fragmentos de ADN menores a 300 pb los cuales son totalmente inadecuados para usarse como plantilla de amplificación para la PCR (Blow, 2007, Berezki, *et al.*, 2007). Estos resultados coinciden con los reportados por un estudio en donde se evaluaron diferentes protocolos de identificación mediante la reacción anidada múltiple de la cadena para VPH16 y VPH18 en muestras de tejido embebido en parafina de carcinoma de cuello uterino. Únicamente 3 de 24 (12.5%) muestras de carcinoma de células escamosas fueron positivas para VPH16, 1 de 4 (25%) muestras de neoplasias intraepiteliales grado 2 y 1 de 3 (33.3%) muestras de neoplasias intraepiteliales grado 3 fueron positivas para para VPH16. Esta baja positividad para VPH16 fue atribuida a la carente disponibilidad de la región diana de 630 pb del gen e6/e7 del VPH,

producida posiblemente a la inhibición de la PCR por la formalina o la reticulación del ADN (Prakash, *et al.*, 2016).

Otras de las razones las cuales podrían explicar este resultado puede deberse a los residuos de parafina en los eluidos de ADN utilizados como plantilla para la PCR y/o inhibidores producidos por el proceso de extracción de ADN, los cuales inhibieron o disminuyeron la eficiencia de la reacción de PCR (Lenze, Müller, & Hummel, 2012). Este resultado coincide con los obtenidos en un estudio donde se evaluó la eficiencia de un protocolo de eliminación de entrecruzamiento de ADN e inhibidores de PCR durante la extracción de ADN para muestra de tejido embebido en parafina. Para esto se utilizaron 150 muestras de tejido embebido en parafina de las cuales 50 corresponden a biopsias cervicales de neoplasia intraepiteliales grado 2 y 3 y 100 biopsias de carcinoma de células escamosas de cuello uterino, ano, vagina, pene cabeza y cuello, la extracción del ADN se realizó utilizando dos diferentes protocolos de extracción, ambos protocolos se diferenciaban en que uno incluyó un proceso de eliminación de inhibidores de PCR y entrecruzamiento de ADN. Se utilizó un PCR en tiempo real para la detección de VPH16. Se encontró que únicamente 94 (62.7%) muestras de las 150 las cuales no se les sometió al proceso de eliminación de inhibidores de PCR y entrecruzamiento de ADN fueron positivas para VPH16. Por el contrario 110(73.3%) muestra de 150 que se les sometió les sometió al proceso de eliminación de inhibidores de PCR y entrecruzamiento de ADN fueron positivas para VPH16 . Este resultado se le atribuyó a la reticulación de los ácidos nucleicos producida por los residuos de formaldehído e inhibidores de PCR presentes en las plantillas de amplificación usadas (Steinau, Patel, & Unger, 2011).

Por otra parte, este estudio contribuyó en la implementación de un PCR multiplex anidado el cual permite la identificación de los serotipo 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 de VPH. Esta metodología posee una gran sensibilidad para la detección y genotipificación exacta del VPH, es de bajo costo y no requiere equipo de alto costo en comparación a otras metodologías y kits comerciales (Sotlar, *et al.*, 2004).

En conclusión, el serotipo predominante en lesiones de alto grado y cáncer cervical fue VPH del tipo 16 en comparación al tipo 18 para Guatemala. Los hallazgos en este estudio pueden contribuir parcialmente a mejorar la prevención y tratamiento de infecciones por VPH16 y VPH18 y cáncer cervical. También respaldan el mejoramiento urgente y necesario del programa de vacunación contra

el VPH. Sin embargo, estos datos deben ser respaldados por futuras investigaciones en donde se tenga una población representativa de la población de mujeres con lesiones de alto grado y cáncer cervical.

## 11.3 Agradecimientos

Se agradece al Dr. Alberto García González por su contribución técnica en este proyecto.

## 12. Referencias

- Abazán, W. J., & Romero, L. (2016). Frecuencia de lesiones tempranas del cérvix uterino en mujeres guerrerenses por citología convencional de Papanicolaou. *Revista Tlamati Sabiduría*, 7(1), 863-872.
- Ahmed, H. G., Bensusaidea, S. H., Alshammari, F. D., Alenazi, F. S. H., ALmutlaq, B. A., Alturkstani, M. Z., & Aladani, I. A. (2017). Prevalence of Human Papillomavirus subtypes 16 and 18 among Yemeni Patients with Cervical Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(6), 1543–1548. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.6.1543>.
- Apgar, B. S., Kittendorf, A. L., Bettcher, C. M., Wong, J., & Kaufman, A. J. (2009). Update on ASCCP consensus guidelines for abnormal cervical screening tests and cervical histology. *American Family Physician*, 80(2), 147–155.
- Arroyo, G., Zetina, F., Villeda, M., Guerra, W., Gravitt, P., Daniel, R., Kindilien, K., Shah, K. (2008). Prevalencia del virus del papiloma humano (VPH) y otros factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical en Guatemala. *Revista Científica*. 4. 49-57.
- Berek, J. S., & Hacker, N. K. (2015). *Berek & Hacker's Gynecologic Oncology*. Wolters Kluwer. Print.
- Berezki, L., Kis, G., Bagdi, E., & Krenacs, L. (2007). Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. *Pathology oncology research: POR*, 13(3), 209–214. <https://doi.org/10.1007/BF02893501>.
- Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 143(2), 22–36. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12611>.
- Blow N. (2007). Tissue preparation: Tissue issues. *Nature*, 448(7156), 959–963. <https://doi.org/10.1038/448959a>.
- Bonin, S., Petrera, F., Niccolini, B., & Stanta, G. (2003). PCR analysis in archival postmortem tissues. *Molecular pathology : MP*, 56(3), 184–186. <https://doi.org/10.1136/mp.56.3.184>.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Bosch, F., & de Sanjosé, S. (2021). Human papillomavirus and related diseases in the world. <https://hpcvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.

- Burk, R. D., Harari, A., & Chen, Z. (2013). Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445(2), 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>.
- Chan, C. K., Aimagambetova, G., Ukybassova, T., Kongrtay, K., & Azizan, A. (2019). Human papillomavirus infection and cervical cancer: epidemiology, screening, and vaccination-review of current perspectives. *Journal of Oncology*, 2019, 3257939. <https://doi.org/10.1155/2019/3257939>.
- Chen, A. A., Gheit, T., Franceschi, S., Tommasino, M., Clifford, G. M., & IARC HPV Variant Study Group (2015). Human papillomavirus 18 genetic variation and cervical cancer risk worldwide. *Journal of Virology*, 89(20), 10680–10687. <https://doi.org/10.1128/JVI.01747-15>.
- Chen, Z., Li, Q., Huang, J., Li, J., Yang, F., Min, X., & Chen, Z. (2019). E6 and E7 gene polymorphisms in human papillomavirus type-6 identified in Southwest China. *Virology Journal*, 16(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1221-x>.
- Ciapponi, A., Bardach, A., Glujovsky, D., Gibbons, L., & Picconi, M. A. (2011). Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 6(10), e25493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025493>.
- Cogliano, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., & El Ghissassi, F. (2005). Carcinogenicity of human papillomaviruses. *The Lancet*, 6(4), 204. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70086-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70086-3).
- Conway, M. J., & Meyers, C. (2009). Replication and assembly of human papillomaviruses. *Journal of Dental Research*, 88(4), 307–317. <https://doi.org/10.1177/0022034509333446>.
- Cui, L., Nai, M., Zhang, K., Li, L., & Li, R. (2019). lncRNA WT1-AS inhibits the aggressiveness of cervical cancer cells via regulating p53 expression via sponging miR-330-5p. *Cancer Management and Research*, 11, 651–667. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S176525>.
- Dai, X., Zhu, Y., Xia, W., Ding, L., Xi, Y., Wu, L., & Yi, C. (2020). The Analysis of human papillomavirus type 16 E6/E7 genetic variability in Jingjiang, Jiangsu Province, China. *Journal of Biosciences and Medicines*, 8(3), 89-103. <https://doi.org/10.4236/jbm.2020.83009>.
- Day, P. M., Thompson, C. D., Buck, C. B., Pang, Y. Y., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2007). Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. *Journal of Virology*, 81(16), 8784–8792. <https://doi.org/10.1128/JVI.00552-07>.
- De Boer, M. A., Peters, L. A., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., Jordanova, E. S., & Fleuren, G. J. (2005). Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer*, 114(3), 422–425. <https://doi.org/10.1002/ijc.20727>.

- De la Fuente-Villarreal, D., Guzmán-López, S., Barboza-Quintana, O. & González, R. A. (2010). Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*, 12(49), 231-238.
- de Ruiz, P., Ponce, E. & Ávila, M. (2005). *Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*. Editorial Médica Panamericana.
- DiSaia, P. (2002). *Oncología ginecología clínica*. Elsevier.
- de Sanjosé, S., Brotons, M., & Pavón, M. A. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 47, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015>.
- Dovey de la Cour, C., Guleria, S., Nygård, M., Trygvadóttir, L., Sigurdsson, K., Liaw, K. L., Hortlund, M., Lagheden, C., Hansen, B. T., Munk, C., Dillner, J., & Kjaer, S. K. (2019). Human papillomavirus types in cervical high-grade lesions or cancer among Nordic women-Potential for prevention. *Cancer medicine*, 8(2), 839–849. <https://doi.org/10.1002/cam4.1961>.
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30(5), F55–F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.
- Doorbar, J., & Griffin, H. (2007). Intrabody strategies for the treatment of human papillomavirus-associated disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(5), 677–689. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.5.677>.
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. (2020). RaxmlGUI 2.0: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(2), 373-377. <http://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>.
- El-Sheikh, N., Mousa, N. O., Tawfeik, A. M., Saleh, A. M., Elshikh, I., Deyab, M., Ragheb, F., Moneer, M., Kawashti, A., Osman, A., & Elrefaei, M. (2021). Assessment of human papillomavirus infection and risk factors in egyptian women with breast cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 15, 1178223421996279. <https://doi.org/10.1177/1178223421996279>.
- Fрати, E.R., Bianchi, S., Amendola, A., Colzani, D., Petrelli, F., Zehender, G., & Tanzi, E. (2020). Genetic characterization of variants of HPV-16, HPV-18 and HPV-52 circulating in Italy among general and high-risk populations. *Molecular Medicine Reports*, 21, 894-902. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10847>.
- Ferreira, M. T., Gonçalves, M. G., López, R. V. M., & Sicheo, L. (2021). Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: a systematic review with meta-analysis. *Virology*, 558, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.007>.

- Flores, Y., Shah, K., Lazcano, E., Hernández, M., Bishai, D., Ferris, D. G., & Salmerón, J. (2002). Design and methods of the evaluation of an HPV-based cervical cancer screening strategy in Mexico: the Morelos HPV study. *Salud Pública de México*, 44, 335-344.
- García, A., Silva, G., Lima, A., Echeverría, M., Álvarez, J., López, C., Barrios, J. & Carías, C. (2019). Tipos de virus del papiloma humano más frecuentes en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y cáncer invasivo de cérvix: 16, 18 y 58. *REVAGOG*, 1(4), 127-136.
- Gheit, T., Cornet, I., Clifford, G. M., Iftner, T., Munk, C., Tommasino, M., & Kjaer, S. K. (2011). Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 20(7), 1315–1321. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1187>.
- Gilbert, D. M., & Cohen, S. N. (1987). Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell*, 50(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90662-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90662-3).
- Global Cancer Observatory. (2012). Cervical cancer estimated incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012. [http:// globocan.iarc.fr/Pages/fact \\_ sheets \\_ cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- Gottschlich, A., Rivera-Andrade, A., Bevilacqua, K., Murchland, A. R., Isak, E., Alvarez, C. S., Ogilvie, G., Carey, T. E., Prince, M., Dean, M., Mendoza-Montano, C., & Meza, R. (2020). Using self-collection HPV testing to increase engagement in cervical cancer screening programs in rural Guatemala: a longitudinal analysis. *BioMed Central Public Health*, 20(1), 1406. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09478-8>.
- Grillo-Ardila, C. F., Martínez-Velásquez, M. Y., & Morales-López, B. (2008). Virus del papiloma humano: aspectos moleculares y cáncer de cérvix. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(4), 310-315.
- Grover, A. & Pandey, D. (2017). Anatomy and Physiology of Cervix. In: Mehta, S. & Sachdeva, P. (Eds). *Colposcopy of Female Genital Tract*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-1705-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1705-6_1).
- Guo, C., Du, H., Belinson, J.L. et al. The prevalence and distribution of human papillomavirus among 10,867 Chinese Han women. *Infect Agents Cancer* 16, 21 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13027-021-00360-9>.
- Hooi, DJ., Lissenberg-Witte, BI., de Koning, MNC., et al. (2018). High prevalence of high-risk HPV genotypes other than 16 and 18 in cervical cancers of Curaçao: implications for choice of prophylactic HPV vaccine. *Sexually Transmitted Infections*. *BMJ*: 94, 263-267.
- Hosseini, N., Shoja, Z., Younesi, S., Shafiei-Jandaghi, N. Z., & Jalilvand, S. (2020). Lineage analysis of human papillomavirus types 31 and 45 in cervical samples of Iranian women. *Journal of Medical Virology*, 17(70), 3857-3864. <https://doi.org/10.1002/jmv.26748>.

- Howley, P. & Lowy D. (2007). Papillomaviruses. In: Knipe, D. & Howley, P. (Eds.), *Fields virology* (p. 2299-2354). Lippincott Williams and Wilkins.
- Iijima, J., Okayama, K., Teruya, K., Hata, H., Shiina, N., Yabusaki, H., & Okodo, M. (2019). A study of the relationship between nuclear contour thickening, nuclear enlargement, and human papillomavirus infection in squamous cells. *Cytopathology*, 30(6), 644-649. <https://doi.org/10.1111/cyt.12756>.
- Jackson, J. A., Kapur, U., & Erşahin, Ç. (2012). Utility of p16, Ki-67, and HPV test in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and atrophy in women older than 50 years with 3- to 7-year follow-up. *International Journal of Surgical Pathology*, 20(2), 146–153. <https://doi.org/10.1177/1066896911427703>.
- Karadža, M., Lepej, S. Ž., Planinić, A., Grgić, I., Ćorušić, A., Planinić, P., Coric, M., Hosnjak, L., Komlos, K., Poljak, M., & Vince, A. (2021). Distribution of human papillomavirus genotypes in women with high-grade cervical intraepithelial lesions and cervical carcinoma and analysis of human papillomavirus-16 genomic variants. *Croatian Medical Journal*, 62(1), 68-79. <https://doi.org/10.3325/cmj.2021.62.68>.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- Kim, N., Park, J. S., Kim, J. E., Park, J. H., Park, H., Roh, E. Y., Hyun, J., & Shin, S. (2020). Fifteen new nucleotide substitutions in variants of human papillomavirus 18 in Korea: Korean HPV18 variants and clinical manifestation. *Virology Journal*, 17, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01337-7>.
- King, A., Sonsma, J., Vriend, H., van der Sande, M., Feltkamp, M., Boot, H., & Koopmans, M. (2016). Correction: Genetic Diversity in the Major Capsid L1 Protein of HPV-16 and HPV-18 in the Netherlands. *PLOS ONE*, 11(4), e0154977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154977>.
- Lefort, V., Longueville, J. E., & Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>.
- Lenze, D., Müller, H., & Hummel, M. (2012). Considerations for the use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens for clonality analysis. *Journal of Hematopathology*, 5, 27-34.
- Li, S., Ye, M., Chen, Y., Gong, Q., & Mei, B. (2020). Genetic variation of E6 and E7 genes of human papillomavirus 52 from Central China. *Journal of Medical Virology*, 93(6), 3849-3856. <https://doi.org/10.1002/jmv.26690>.
- Lizano, M., De la Cruz-Hernández, E., Carrillo-García, A., García-Carrancá, A., Ponce de Leon-Rosales, S., Dueñas-González, A., Hernández-Hernández, D. M., & Mohar, A. (2006). Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions,

- and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecologic Oncology*, 102(2), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.12.002>.
- Lopez, M. S., Baker, E. S., Maza, M., Fontes-Cintra, G., Lopez, A., Carvajal, J. M., Nozar, F., Fiol, V., & Schmeler, K. M. (2017). Cervical cancer prevention and treatment in Latin America. *Journal of Surgical Oncology*, 115(5), 615-618. <https://doi:10.1002/jso.24544>.
- López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M., & Martínez de Pancorbo, M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta Médica de Bilbao*, 98(1), 21–27. [https://doi.org/10.1016/s0304-4858\(01\)74350-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4858(01)74350-8).
- Longworth, M. S., & Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 362–372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>.
- Lou, H., Boland, J. F., Torres-Gonzalez, E., Albanez, A., Zhou, W., Steinberg, M. K., Diaw, L., Mitchell, J., Roberson, D., Cullen, M., Garland, L., Bass, S., Burk, R. D., Yeager, M., Wentzensen, N., Schiffman, M., Freites, E. A., Gharzouzi, E., Mirabello, L., & Dean, M. (2020). The D2 and D3 sublineages of human papillomavirus 16-positive cervical cancer in Guatemala differ in integration rate and age of diagnosis. *Cancer Research*, 80(18), 3803–3809. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0029>.
- Lou, H., Gharzouzi, E., Guerra, S.P. et al. Low-cost HPV testing and the prevalence of cervical infection in asymptomatic populations in Guatemala. *BMC Cancer* 18, 562 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4438-y>.
- Luciani, S., Bruni, L., Agurto, I., & Ruiz-Matus, C. (2018). Implementación y monitoreo de la vacuna contra el VPH en América Latina. *Salud Pública de México*, 60(6), 683–692. <https://doi.org/10.21149/9090>.
- Luciani, S., Cabanes, A., Prieto-Lara, E., & Gawryszewski, V. (2013). Cervical and female breast cancers in the Americas: current situation and opportunities for action. *Bulletin of the World Health Organization*, 91(9), 640–649. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.116699>.
- Mesplède, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Sénéchal, H., Coutlée, F., & Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *Journal of Virology*, 86(1), 94-107. <https://doi.org/10.1128/JVI.00751-11>.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2014). Plan nacional de prevención, control y manejo de cáncer cervicouterino 2014-2024.
- Moya-Salazar, J. J. & Rojas-Zumaran, V. A. (2017). Tendencias en la investigación del virus de papiloma humano en Latinoamérica frente a los países de altos ingresos. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 68(3), 202-217. <https://doi.org/10.18597/rcog.2679>.



- Munoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P., & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & UGENE team. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- Ong, C. K., Chan, S. Y., Campo, M. S., Fujinaga, K., Mavromara-Nazos, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S. K., ter Meulen, J., & Villa, L. L. (1993). Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *Journal of Virology*, 67(11), 6424–6431. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.11.6424-6431.1993>.
- Organización Panamericana de la Salud. (2018). Plan de acción sobre la prevención y el control del cáncer cervicouterino 2018-2030. <https://www.isdmguatemala.org/wp-content/uploads/2021/01/OPS-plan-de-accion-cacu-2018-30.pdf>
- Prakash, P., Patne, S. C., Singh, A. K., Kumar, M., Mishra, M. N., & Gulati, A. K. (2016). PCR and Genotyping for HPV in Cervical Cancer Patients. *Journal of global infectious diseases*, 8(3), 100–107. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.188591>.
- Peralta-Rodríguez, R., Romero-Morelos, P., Villegas-Ruiz, V., Mendoza-Rodríguez, M., Taniguchi-Ponciano, K., González-Yebra, B., Marrero-Rodríguez, D., & Salcedo, M. (2012). Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infectious agents and cancer*, 7(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-7-34>.
- Rajaram, S., Chitrathara, K. & Maheshwari, A. (2012). *Cervical Cancer Contemporary Management*. Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Rodriguez, A. M., Zeybek, B., Vaughn, M., Westra, J., Kaul, S., Montealegre, J. R., Lin, Y., & Kuo, Y. F. (2020). Comparison of the long-term impact and clinical outcomes of fewer doses and standard doses of human papillomavirus vaccine in the United States: a database study. *Cancer*, 126(8), 1656-1667. <https://doi.org/10.1002/cncr.32700>.
- Sam, B. (2018). Análisis de Situación: Enfermedades No Transmisibles 2017. <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202018/Enfermedades%20No%20Trasmisibles/Analisis%20anual%20ENT%202017.pdf>
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 166–171.

- Siegler, E., Sharir, K., Lavie, O., Saked-Misan, P., Machulki, L., Auslender, R., & Segev, Y. (2017). The prevalence of HPV types in women with CIN 2-3 or cervical cancer in Haifa district, Israel. *Minerva ginecologica*, 69(3), 211–217. <https://doi.org/10.23736/S0026-4784.16.03980-0>.
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., & Bültmann, B. (2004). Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3176–3184. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>.
- Stanovov, V., Akhmedova, S., & Semekin, E. (2019). Selective pressure strategy in differential evolution: exploitation improvement in solving global optimization problems. *Swarm and Evolutionary Computation*, 50, 100463. <https://doi.org/10.1016/j.swevo.2018.10.014>.
- Steinau, M., Patel, S. S., & Unger, E. R. (2011). Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 13(4), 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.03.007>.
- Sun, Z., Liu, J., Wang, G., Zhou, W., Liu, C., & Ruan, Q. (2012). Variant lineages of human papillomavirus type 18 in Northeast China populations characterized by sequence Analysis of E6, E7, and L1 regions. *International Journal of Gynecological Cancer*, 22(6), 930–936. <https://doi/10.1097/igc.0b013e318253a994>.
- Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., & Clifford, G. M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International Journal of Cancer*, 121(3), 621–632. <https://doi.org/10.1002/ijc.22527>.
- Tatti, S. (2011). Colposcopia y patologías del tracto genital inferior/Colposcopy and lower genital tract pathologies: en la era de la vacunación/in the Era of Vaccination. *Médica Panamericana*.
- Toro-Montoya, A., & Tapia-Vela, L. (2021). Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer. *Medicina y Laboratorio*, 25(2), 467–483.
- Vicuña, N. C., Hernández, G. A., Alcázar, L. F., Garrón, G. W. M., & Zúñiga, I. P. (2009). Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología, México*, 8(1), 61–79.
- Villa, L. L., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., & Franco, E. L. (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *The Journal of General Virology*, 81, 2959–2968. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2959>.
- Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 965–968. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>.
- Vu, M., Yu, J., Awolude, O. A., & Chuang, L. (2018). Cervical cancer worldwide. *Current Problems in Cancer*, 42(5), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2018.06.003>.

- Wang, R., Pan, W., Jin, L., Huang, W., Li, Y., Wu, D., Gao, C., Ma, D., & Liao, S. (2020). Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge. *Cancer Letters*, 471, 88-102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.039>.
- Wang, H. Y., Park, S., Lee, D., Kim, S., Kim, G., Park, K. H., & Lee, H. (2015). Prevalence of type-specific oncogenic human papillomavirus infection assessed by HPV E6/E7 mRNA among women with high-grade cervical lesions. *International Journal of Infectious Diseases*, 37, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.018>.
- Weaver, S., Shank, S. D., Spielman, S. J., Li, M., Muse, S. V., & Kosakovsky Pond, S. L. (2018). Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Molecular Biology and Evolution*, 35(3), 773–777. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx335>.
- Wilson I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>.
- Xi, L. F., Kiviat, N. B., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Ho, J., & Koutsky, L. A. (2006). Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(15), 1045–1052. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj297>.
- Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X., & Wheeler, C. M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *Journal of Virology*, 71(3), 2463–2472. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.3.2463-2472.1997>.
- Yang, L., Yang, H., Wu, K., Shi, X., Ma, S., & Sun, Q. (2014). Prevalence of HPV and variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 genes in cervical cancer in women in South West China. *Journal of Medical Virology*, 86(11), 1926–1936. <https://doi.org/10.1002/jmv.24043>.
- Yang, Y., Ren, J., & Zhang, Q. (2016). Distribution of human papillomavirus type 16 E6/E7 gene mutation in cervical precancer or cancer: a case control study in Guizhou Province, China. *Journal of Medical Virology*, 88(2), 345-350. <https://doi.org/10.1002/jmv.24333>.
- Yamaguchi-Naka, M., Onuki, M., Tenjimbayashi, Y., Hirose, Y., Tasaka, N., Satoh, T., Morisada, T., Iwata, T., Sekizawa, A., Matsumoto, K., & Kukimoto, I. (2020). Molecular epidemiology of human papillomavirus 18 infections in Japanese women. *Infection, Genetics and Evolution*, 83, 104345. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104345>.
- Zhe, X., Xin, H., Pan, Z., Jin, F., Zheng, W., Li, H., Zhang, C., Fu, S., Shao, R., & Pan, Z. (2019). Genetic variations in E6, E7 and the long control region of human papillomavirus type 16 among patients with cervical lesions in Xinjiang, China. *Cancer Cell International*, 19(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0774-5>.

## 13. Apéndice



### ACUERDO DE DIRECCIÓN DIGI P056-2022

LA DIRECTORA GENERAL DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA con base en las atribuciones que se le confieren al haber sido nombrada por el Consejo Superior Universitario según 2. **Considerando:** La situación derivada de la pandemia del Coronavirus, su enfermedad asociada Covid-19. **Considerando:** La situación que atraviesa la Universidad de San Carlos de Guatemala por el cierre del Campus Central, entre otros, por los estudiantes en resistencia. **Considerando:** Los *Procedimientos para redefinición de objetivos y metodología, y solicitud de prórroga DIGI-2022*, autorizado por el Consejo Coordinador e Impulsor de la Investigación en la Universidad de San Carlos de Guatemala, Concusac, en el punto Séptimo del acta 07-2022 de fecha 16 de agosto de 2022. **Considerando:** Los motivos expuestos por el Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares, coordinador del proyecto de investigación *Histopatología cervical y su relación con los linajes de VPH 16 y 18 basados en los oncogenes E6/E7*, en la carta de fecha 11 de noviembre de 2022, con los avales correspondientes. **ACUERDA:** Primero: Autorizar la solicitud de redefinición de objetivos específicos del proyecto de investigación *Histopatología cervical y su relación con los linajes de VPH 16 y 18 basados en los oncogenes E6/E7*, partida presupuestaria 4.8.63.0.21 del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud, avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Segundo: Encargar a la Coordinadora del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud, Dra. Hilda Valencia de Abril el cumplimiento de este acuerdo. Tercero: Notificar este acuerdo a los involucrados (Coordinador del proyecto, unidad avaladora, Coordinación General de Programas, Coordinadora del Programa Universitario de Investigación). **COMUNÍQUESE:** Dado en la ciudad de Guatemala, el veintiuno de noviembre de dos mil veintidós.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

  
Dra. Alice Patricia Burgos Paniagua  
Directora General de Investigación



Adjunto: documentos electrónicos descritos  
c.c. archivo  
/elmd

**Figura 1.** Autorización de la Directora General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala, para realizar cambios en los objetivos de la investigación.

## 14. Aspectos éticos y legales

En la investigación se garantizó la confidencialidad de los datos de carácter personal de las muestras congeladas utilizadas, la investigación produjo información de calidad, tuvo pertinencia en el abordaje del problema de salud a investigar y contribuyó al aporte de conocimiento dirigido a la promoción de la salud de la persona y a la salud pública, por lo que tuvo valor social y científico.

## 15. Vinculación

La investigación estableció un vínculo directo entre el Hospital Roosevelt, Laboratorio de Patología Médica PATMED, Laboratorio de Biología Molecular del CUNZAC y la Escuela de Biología de la

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para futuras investigaciones biomédicas relevantes para el país.

## **16. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual**

Las actividades que se realizarán para dar a conocer los resultados parciales y finales de la investigación consisten en la presentación de un informe final de investigación a las autoridades correspondientes, la publicación de los resultados en una revista indexada, nacional o internacional y la participación como ponencia o la presentación de póster en congresos, seminarios, simposios, entre otras actividades académicas y de divulgación científica.

## **17. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:**


**17.1** La investigación aportará en el eje temático de salud, específicamente en el tema de salud sexual y reproductiva, generando información epidemiológica y genética del VPH asociado a las LEIAG y CC. La investigación permitirá conocer las variantes genéticas de los genes E6 y E7, así como la manera en la que se relacionan con las LEIAG y el CC, determinando cuales son de mayor riesgo oncogénico. También se describirán los linajes de los tipos de VPH 16 y 18, basados en los genes E6 y E7, que se encuentran en el país y se conocerá los linajes que presentan un mayor vínculo con las LEIAG y CC. A partir de los análisis filogenéticos y evolutivos se podrán tomar medidas cautelares en el área de salud pública, los cuales pueden contribuir con la disminución del riesgo de la población guatemalteca ante el VPH.

**17.2** Esto permitirá establecer una relación institucional entre la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y el Hospital Roosevelt, que permitirá futuras investigaciones biomédicas. Lo planteado anteriormente será de beneficio para las futuras pacientes que consulten el Hospital Roosevelt y necesiten asistencia médica relacionada con la salud reproductiva, contribuyendo con un problema de sumo interés de salud en Guatemala.

# Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

## 18. Orden de pago final (incluir únicamente al personal con contrato vigente)

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Francisco Josué López Hun	Investigador	20220546	si	

## 19. Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.



<b>Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares</b>	 <b>Firma</b>
Fecha: 22/2/2023	

## 20. Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgó el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: Director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.


# Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

<p><b>Vo.Bo. Dra. María Eunice Enríquez Cotton</b> <b>Directora Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas</b></p>	  <p>Dra. María Eunice Enríquez Cotton Directora <b>Firma</b></p>
<p>Fecha: 22/02/2023</p>	

## 21. Visado de la Dirección General de Investigación

<p><b>Vo.Bo. Dra. Hilda E. Valencia de Abril, PhD</b> <b>Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud (PUIIS)</b></p>	 <p><b>Firma</b></p>
<p>Fecha: 22/02/2023</p>	

<p><b>Vo.Bo. Ing. Agr. MARN Julio Rufino</b> <b>Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</b></p>	 <p><b>Firma</b></p> <p><small>Ing. MARN Julio Rufino Sotomayor Pérez Coordinador General de Programas de Investigación, Digi-Usac</small></p>
<p>Fecha: 22/02/2023</p>	