



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

“VARIABILIDAD GENETICA DEL GEN E6, VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO GENOTIPO 16 EN MUESTRAS AISLADAS EN EL
ECUADOR”

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

BIOLOGO

DIEGO PAUL ANGAMARCA ARMAS

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2016

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios por todas las bendiciones que me ha dado en este proceso para culminar el proyecto.

Agradezco a mi Madre, Angélica Armas, que nunca perdió la esperanza y estuvo apoyandome, retandome y queriendome.

A mi hermano, Daniel Angamarca, que con sus locuras me distraía de las preocupaciones que embargaban mi vida en algunos momentos.

A mi padre, Jorge Angamarca, que con sus consejos y guía me encaminaron hacia un buen camino.

A mis profesores, compañeros de aula y amigos, que nunca faltó sus palabras de aliento que me apoyaron

DEDICATORIA

Dedico este Proyecto Integrador a Dios y a mi familia.

EVALUADOR DEL PROYECTO

Msc. César Bedoya

Tutor Proyecto Integrador

Msc.César Bedoya

Profesor Materia Integradora

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, me (nos) corresponde exclusivamente; y doy (damos) mi (nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....
Diego Paúl Angamarca Armas

RESUMEN

El Papiloma Humano es ocasionado por los Papillomavirus, siendo estos responsables de cáncer cervico uterino (CCU), uno de los canceres con mayor incidencia en el mundo, la enfermedad también es llamada Virus del Papiloma Humano o VPH.

Para el presente estudio se analizo la secuencia E6 del genotipo 16, este genotipo de VPH esta catalogado como de alto riesgo en producir CCU. El gen E6 es uno de los genes mas utilizados en la parte filogenética, siendo asi que se lo utiliza junto LCR para su separación por linajes y junto al E7 para observar el nivel oncogénico de las muestras.

En el estudio se utilizaron iniciadores específicos para el gen E6, dando un amplicón de 220bp, estos iniciadores fueron diseñados en el laboratorio del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación del Ecuador.

Se utilizaron un total de 15 muestras y al paso de la metodología se pudieron analizar 7 muestras las cuales presentaron un alto nivel de cromatograma en su secuenciación.

En el análisis filogenético se utilizo el programa BEAST 1.8.4 con el modelo Neighbor-joining y el parámetro de Jukes Cantor (el parámetro se escogio por un estudio previo que se lo realizo en el programa MEGA 5.2)

Dando asi como resultado los linajes circundantes en el país que son el linaje Africano (28%), Europeo (28%) y Asiático Americano (44%) siendo el ultimo con mayor incidencia por la muestras analizadas.

El linaje Asiático Americano tiene una mayor nivel oncogénico en relación a los otros linajes del mismo genotipo, esto es una alerta para el Ministerio de Salud Pública ya que existirán nuevos casos de cáncer en el país y como la enfermedad del VPH es asintomático se convierte en un mayor problema.

Con este estudio se busca observar la variabilidad genética presente en el país para así tener en cuenta como va mutando la enfermedad y cuales son los linajes con mayor predominancia.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	il
DEDICATORIA.....	lii
EVALUADOR DEL PROYECTO.....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA.....	v
RESUMEN.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURA.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	2
CAPÍTULO 1.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Virus del Papiloma humano.....	3
1.1.1. Enfermedad del Virus del Papiloma Humano.....	3
1.2. Patogénesis.....	4
1.3. Biología del Virus del Papiloma humano.....	5
1.4. Filogenética de los <i>Papillomavirus</i>	6
1.5. Ciclo de Replicación del Virus del Papiloma Humano.....	9
1.6. HPV 16.....	11
1.7. Gen E6.....	13
1.8. Linajes de HPV tipo 16.....	13
CAPÍTULO 2.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Muestras y Controles.....	15

2.2. Iniciadores de Control.....	15
2.3. Amplificación del Gen E6 y Purificación.....	16
2.4. Secuenciación.....	16
2.5. Filogenia.....	16
CAPÍTULO 3.....	18
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	18
3.1. Resultados.....	18
3.1.1. Amplificación del Gen E6.....	18
3.1.2. Secuenciación.....	18
3.1.3. Análisis Filogenético del Gen E6.....	18
3.2. Discusión.....	21
CAPÍTULO 4.....	22
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	22
4.1. Conclusiones.....	22
4.2. Recomendaciones.....	22
ANEXOS.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	29

ABREVIATURA

CCU: Cáncer Cervico Uterino.

LCR: Larga región consensua

VPH: Virus del Papiloma Humano

ADN: Ácido desoxirribonucleico

PV: Papiloma virus

NIC: Neoplasias intraepiteliales cervicales

ATP: Adenosin Tri fosfato

ND10: Donante nuclear 10

G2: Glicoproteína 2

MHC: Complejo Mayor de histocompatibilidad

ORF: Marco abierto de Lectura

EAS: Linaje Europeo Asiático

E: Linaje Europeo

As: Linaje Asiático

AFR: Linaje Africano

NA/AA: Linaje Norte América/Asía Americano

G: Guanina

C: Citosina

T: Timina

A: Adenina

SNPs: Polimorfismo de un único nucleótido

INSPI: Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación

PCR: Acción en cadena de la Polimerasa

JC: Jukes Cantor

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1.1. Árbol Filogenético de la Clasificación de los <i>Papillomavirus</i>	7
Figura 1.2. Clasificación de los alphapapillomavirus en alto y bajo riesgo.....	9
Figura 1.3. Diferencia entre célula infectada por VPH y una célula normal.....	10
Figura 1.3. Diferencia entre célula infectada por VPH y una célula normal.....	11
Figura 1.5. Árbol filogenético representando las variantes/linajes del genotipo 16.....	12
Figura 1.6. Variantes/linajes del cáncer cervical del genotipo 16 en el mundo.....	12
Figura 1.7. Árbol filogenético de los linajes del genotipo 16 en base a su gen E6/LCR.....	13
Figura 3.1. Árbol filogenético realizado con el Programa BEAST modelo Neighbor-joining parámetro Jukes Cantor (2000 réplicas) valor inicial 1.27E-08, valor final 2.35E-08 con prioridad uniforme.....	20

Tablas

Tabla 1. Incidencia del Cáncer Cervical, Ecuador 2012.....	3
Tabla 2. Función de las Proteínas del VPH.....	6
Tabla 3. Breve explicación de los géneros de los <i>Papillomavirus</i>	8

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.....	24
ANEXO B.....	25
ANEXO C.....	25
ANEXO D.....	25
ANEXO E.....	26
ANEXO F.....	26
ANEXO G.....	27

INTRODUCCIÓN

El virus del Papiloma Humano también llamado VPH es una enfermedad de transmisión sexual. [1] Es transmitida por los papillomavirus [2] Produce en cáncer cervical ocupando en Ecuador el 2º lugar a nivel de cáncer en mujeres [3]

Los papillomavirus son pequeños virus de ADN circular de doble cadena. [4] Son especies altamente específica y preferentemente infectan el epitelio cutáneo o mucocutáneo teniendo una historia evolutiva que abarca más de 300 millones de años [4].

Presenta 8 genes que a su vez se los puede dividir en región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y región tardía (L1 y L2) se los nombro por la infección a la célula huésped [5]

Los genotipos de VPH existen de alto y bajo riesgo de producir cáncer cervical, el genotipo 16 pertenece al alto riesgo [6]

El gen E6 tiene un papel importante en la transformación celular siendo así que sus cambios en su cadena de aminoácidos puede afectar el potencial oncogénico [7]–[9].

OBJETIVO GENERAL

Analizar la variabilidad genética del gen E6 en el genotipo 16 en muestras aisladas en Ecuador

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar el protocolo de amplificación del Gen E6.
- Analizar los polimorfismos del gen E6
- Realizar un análisis filogenético de las muestras en un árbol filogenético comparandolo con secuencias ya existentes.

Justificación

El VPH es una de las enfermedades de transmisión sexual más común en el mundo entre hombres y mujeres, sexualmente activos, ocasionando como su principal enfermedad el cáncer cérvico uterino aunque también puede producir cáncer en el ano, vulva, vagina y pene. [1], [3]

Como es un virus de ADN de doble cadena su capacidad de mutación es muy lenta sin embargo, los polimorfismos de nucleótidos pueden ocurrir a través de mutaciones al azar y establecerse en una población. [10]

Por eso es imperativo conocer los polimorfismos que ocurren en su cadena.

El Gen E6 que es uno de sus genes más conservados, también es uno de los genes que se ocupa para separar los linajes dentro de una población por estas razones se lo utilizó para este estudio, así se podrá observar los polimorfismos presentes en las muestras y a qué linajes corresponden y su evolución en el Ecuador.

CAPITULO # I

MARCO TEORICO

1.1. Virus del Papiloma humano

1.1.1 Enfermedad del Virus del Papiloma Humano

El VPH o Virus del Papiloma Humano, es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) muy común entre hombres y mujeres, el 70% de las mujeres sexualmente activas pueden adquirir esta enfermedad [1]

El VPH es transmitido por un virus que pertenece a la familia *papillomavirus* (PV), que existen 189 de los cuales 120 son de tipo humano, 64 de mamíferos, 3 de aves y 2 de reptiles [2].

La infección por VPH es responsable del cáncer cervical y también es un factor importante en otros cánceres (ano, vulva, vagina y pene) [3]. El cáncer cérvico uterino es el 4º cáncer mas común en mujeres en el mundo, se estima que existieron 527.624 nuevos casos y 265.672 muertes en el 2012 [11]

Más del 85% de la carga mundial se produce en los países en desarrollo, con mayores tasas de incidencia en África Medio (33 por cada 100.000 habitantes), en el sur (de 23 a 26,8 por cada 100.000 habitantes), Asia central y meridional (24,6 por cada 100.000) y América del Sur (23,9 por cada 100000), los niveles son mas bajo en el Oeste de Asia (4,5 por cada 100.000) Norte América (5,7 por cada 100.000) y Australia /Nueva Zelanda (5 por cada 100000). [12]

En el Ecuador el VPH tiene el 2º lugar a nivel de cáncer en mujeres y el 1º entre la edad de 15 a 44 años [3].

Indicador	Ecuador	América del Sur	Mundo
Número Anual de nuevos casos de cáncer	2,094	45,008	527,624

Tasa bruta de incidencia	28.2	22.2	15.1
Tasa de incidencia de edad	29.0	20.3	14.0
Riesgo acumulativo (%) en 75 años de edad	3.0	2.0	1.4

Tabla 1. Incidencia del Cáncer Cervical, Ecuador 2012.

Fuente: [3]

En el cáncer de cuello uterino se han identificado 100 tipos de VPH de los cuales 15 a 18, según el autor, se han relacionado con el cáncer de cuello uterino que son denominados de alto riesgo [5] y los otros son considerados de bajo riesgo.

El cáncer de cuello uterino, es un proceso degenerativo, que lleva a una transformación neoplásica, iniciando con lesiones escamosas no invasivas que progresan a etapas preinvasivas, estas están formadas por lesiones neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) que val de grado I al III, su característica es la inmadurez y desorganización celular y una actividad mitótica incrementada [13].

1.2. Patogénesis

EL VPH es una enfermedad de un alto nivel de transmisión, aunque los individuos infectados se negativizan en los 2 años siguientes a la infección no obstante los que fueron infectados con un VPH de alto riesgo pueden llegar a desarrollar cáncer cervical [5].

La infección ocurre después de la primera relación sexual, esta infección es transitoria pero debido a diversos factores incrementa la persistencia, los factores son genéticos, por la edad, inmunodepresión, tabaquismo y factores virales [5].

La infección puede ser asintomática e inofensiva, siendo el sistema inmune que acaba con la infección [5].

En una infección persistente existe evidencia que los pacientes pueden adquirir

nuevos tipos de VPH [5]

1.3. Biología del Virus del Papiloma humano

EL VPH es un virus de ADN de doble cadena de 8000bp aproximadamente, no posee envoltura y tiene un diámetro de 52-55nm, tiene 8 genes y una región regulatoria no codificante, la cual tiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales [5].

Su genoma esta formado por 2 tipos de genes, los que son codificados en la etapa temprana de la infección (E1, E2, E4, E5, E6, E7) y los que son codificados en la etapa tardía de la replicación (L1 y L2) [5].

Proteína	Función
E1	ATPase y ADN helicasa; reconoce y esta unido al origen viral de replicación de ADN; es necesario para la replicación viral [5]
E2	Regulador de la transcripción viral génica; se une al promotor viral transcripcional como un dímero; interactúa con y recluta la E1 al origen [5]
E4	Es el único E que actúa tardíamente interactúa con la queratina del citoesqueleto y los filamentos intermedios; localiza ND10; induce la detención de G2; facilita el ensamblaje del virus [5]
E5	Induce la proliferación celular no programada; interactúa con la subunidad de 16k c de ATPase vacuolar; activa los receptores de factores de crecimiento y otras proteínas quinasas; inhibe la apoptosis; inhibe el trafico de complejos de MHC a la superficie de la célula [5]
E6	Induce la síntesis del ADN; induce la telomerasa; interactúa con proteínas celulares: co-activadores, transcripcionales, proteínas de polaridad y motilidad; supresores tumorales e inductores de apoptosis como el p53 [5]
E7	Induce la proliferación celular no programada; interactúa con factores de transcripción y enzimas remodeladoras de cromatina; activa los reguladores positivos e inhibe los reguladores negativos del ciclo celular,

	como p105Rb; desestabiliza centrosomas y causa defectos mitóticos [5]
L1	Principal proteína viral estructural; se auto ensambla en capsómeros y cápsides; interactúa con L2; interactúa con los receptores de la célula; contiene epitopos neutralizadores [5]
L2	Interactúa con el ADN; interactúa con ND10S; facilita el ensamblaje del virión; codifica el virus lineal que neutraliza epitopos [5]

Tabla 2. Función de las Proteínas del VPH.

Fuente: [5]

1.4. Filogenética de los *Papillomavirus*

Los *Papillomavirus* (PV) son un grupo muy diverso que se presentan en humanos, mamíferos, aves y reptiles [2], [14]

Los *Papillomavirus* tiene 5 géneros (alpha-, beta-, gamma-, mu- y nu-) de los cuales se encuentran HPV1 hasta el HPV96 (ver fig. 1.1) [2],

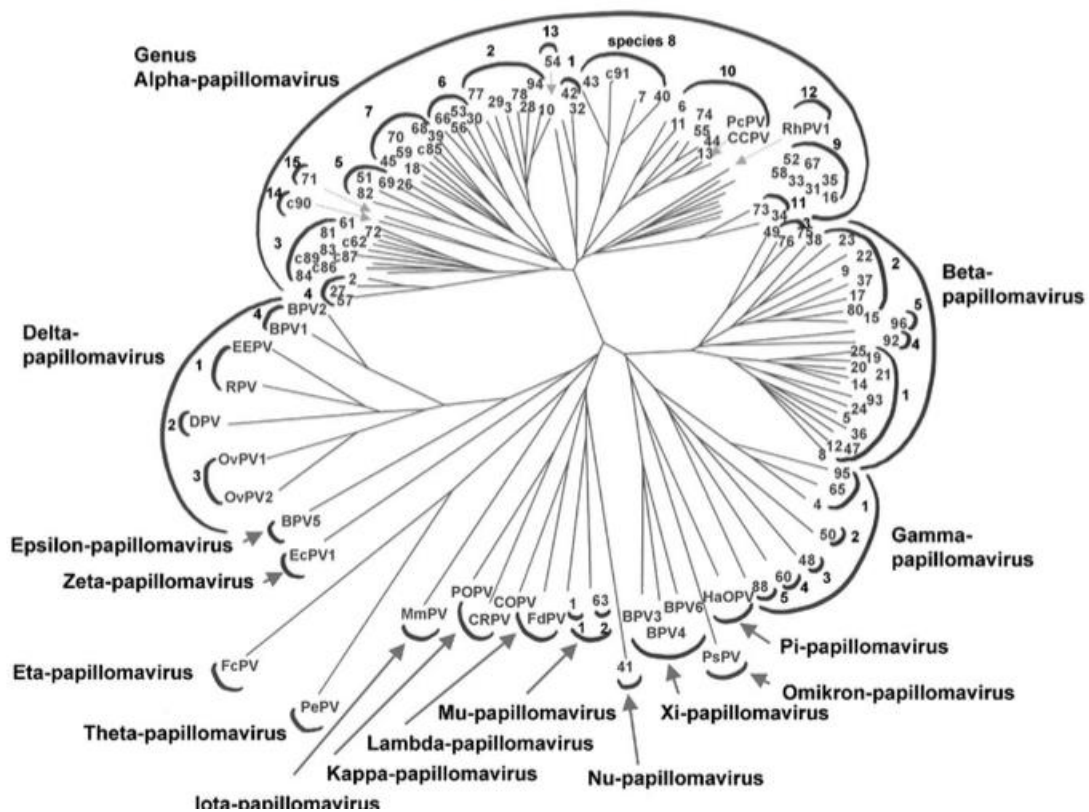


Figura 1.1. Árbol Filogenético de la Clasificación de los *Papillomavirus*.

Fuente: [6]

La evolución del virus del papiloma ha sido predominantemente asexual, aunque los eventos de recombinación extremadamente raras no pueden ser excluidas. Esto implica que múltiples mutaciones que se producen en los genomas de *papillomavirus* no están relacionados con la distancia genética como en los genomas recombinantes, es decir, desequilibrio de ligamiento, pero a la acumulación secuencial de cambios genéticos. Es decir, grupos de polimorfismos de nucleótido único y / o inserciones / supresiones (indeles) tienden a ser fijado dentro de linajes virales. Con el tiempo, la cantidad de estas variaciones linaje definir aumenta con el tiempo conducen a la especiación (entidades denomina tipos) [4]

A distintos virus del papiloma humano (HPV) "tipo" se establece y curada cuando la secuencia de ADN del marco de L1 de lectura abierto (ORF) del genoma viral clonado difiere de la de cualquier otro tipo que se caracteriza por al menos 10% [6]. Dentro de la comunidad de investigación PV, aislados del mismo tipo de VPH se conocen como variantes o subtipos cuando las secuencias de nucleótidos de la ORF L1 difieren en

menos de 10%. El criterio de los tipos de VPH ha demostrado ser extremadamente estable y útil para los investigadores básicos, clínicos, epidemiólogos e inmunólogos [4], [7], [15]

Género	Genotipos	Propiedades Biológicas
Alpha-papillomavirus	HPV 32, 10, 61, 2, 26, 53, 18, 7, 16, 6, 34, 54, 71, 42, 3, 28, 29, 78, 72, 81, 83, 84, 27, 57, 51, 69, 82, 30, 56, 36, 39, 45, 59, 68, 70, 40, 43, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 11, 13, 44, 74	Lesiones en la mucosa y cutáneas en humanos y primates, puede ser de alto y bajo riesgo pero es mas frecuente la asociación a tipos de alto riesgo [6]
Beta-papillomavirus	HPV 5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25	Lesiones cutáneas en humanos, se encuentra en forma latente en la población, se activa en condiciones de inmune depresión [6]
Gamma-papillomavirus	HPV 5, 9, 49, 36, 47, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80, 75, 76	Lesiones cutáneas en humanos [6]
Mu-papillomavirus	HPV 1, 63	Lesiones cutáneas, se las puede distinguir histológicamente por cuerpos de inclusión intracitoplasmáticas específicos para cada tipo [6]
Nu-papillomavirus	HPV 41	Lesiones cutáneas benignas y malignas [6]

Tabla 3. Breve explicación de los géneros de los *Papillomavirus*.

Fuente: [6]

Ya entre los genotipos de VPH se encuentran también diferenciados entre alto riesgo y

bajo riesgo (ver fig. 1.2).

HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK	HPV SPECIES (alpha)	HPV GENOTYPE	RISK
9	HPV 52	High	10	HPV 6	Low	4	HPV 57	Undetermined
	HPV 67	Undetermined		HPV 11	Low		HPV 2a	Undetermined
	HPV 33	High		HPV 13	Low		HPV 27	Undetermined
	HPV 58	High		HPV 74	Undetermined	15	HPV 71	Undetermined
	HPV 16	High		HPV 44	Low		HPV 90	Undetermined
	HPV 31	High		HPV 55	Undetermined	3	HPV 61	Low
HPV 35	High	8	HPV 91	Undetermined	HPV 72		Low	
11	HPV 34		Undetermined	HPV 7	Undetermined		HPV 62	Undetermined
	HPV 73		Probably high	HPV 40	Low		HPV 81	Low
7	HPV 59		High	HPV 43	Low		HPV 83	Undetermined
	HPV 18	High	1	HPV 32	Undetermined		HPV 89	Low
	HPV 45	High		HPV 42	Low	HPV 84	Undetermined	
	HPV 70	Low	13	HPV 54	Low	HPV 86	Undetermined	
	HPV 39	High		2	HPV 28	Undetermined	HPV 3	Undetermined
	HPV 68	Probably high			HPV 10	Undetermined	HPV 29	Undetermined
HPV 85	Undetermined	HPV 77			Undetermined	5	HPV 26	Probably high
5	HPV 26	Probably high	HPV 69		Undetermined		HPV 51	High
	HPV 69	Undetermined	HPV 51		High	HPV 82	Probably high	
	HPV 51	High	6		HPV 30	Undetermined	HPV 53	Probably high
	HPV 82	Probably high		HPV 53	Probably high	HPV 56	High	
6	HPV 30	Undetermined		HPV 56	High	HPV 66	Probably high	
	HPV 53	Probably high	HPV 66	Probably high				
	HPV 56	High						
HPV 66	Probably high							

Figura 1.2. Clasificación de los alphapapillomavirus en alto y bajo riesgo

Fuente: [16]

1.5. Ciclo de Replicación del Virus del Papiloma Humano

El VPH es un virus que infecta células basales (células Stem del epitelio cervical en la zona de transición) [13], [17], el virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -Integrina [5].

Ya infectada la célula, el virus se establece dentro del núcleo de la célula basal en ADN viral episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero (ver fig. 1.3) [5], [13].

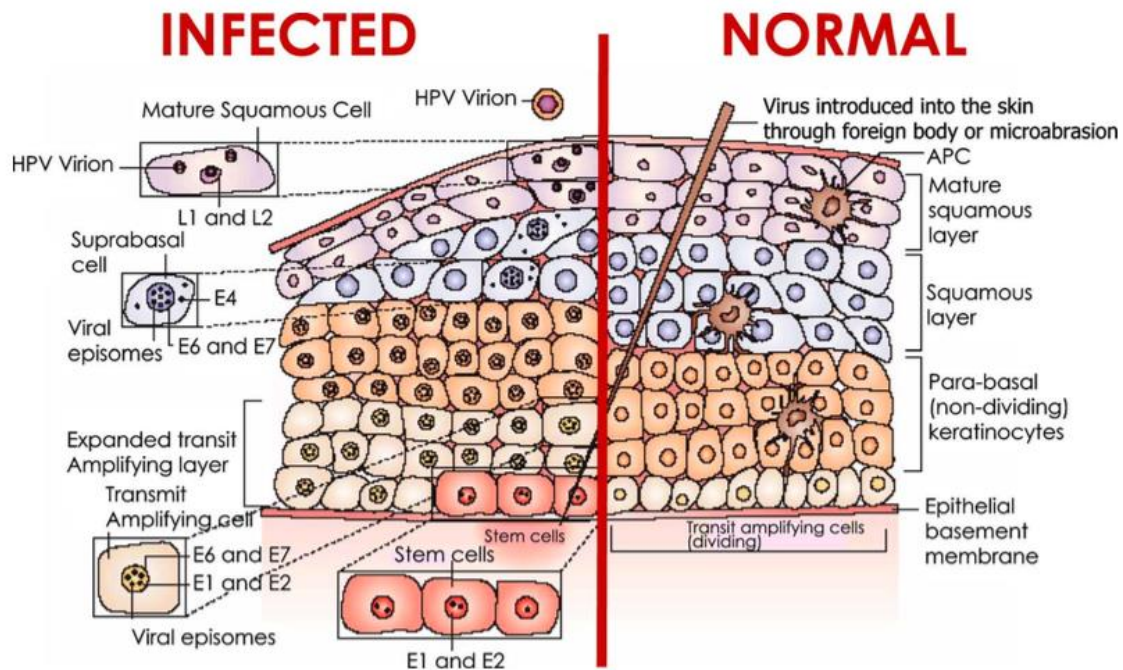


Figura 1.3. Diferencia entre célula infectada por VPH y una célula normal

Fuente: [16]

El ciclo de replicación en el epitelio se puede dividir en 2 fases: La primera se replica a niveles muy bajos en coordinación con la división celular, las proteínas E1 y E2 son importantes en la fase de replicación basal. La segunda las células basales son llevadas al compartimento suprabasal donde se altera la capacidad de dividirse y realizan la diferenciación terminal [13], [14].

Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo [5]

El VPH no presenta una fase lítica, en ese caso utiliza la célula que lo protege para propagarse y esta es liberada cuando las células terminales del estrato corneo sufren un proceso de descamación (Ver fig. 1.4) [5].

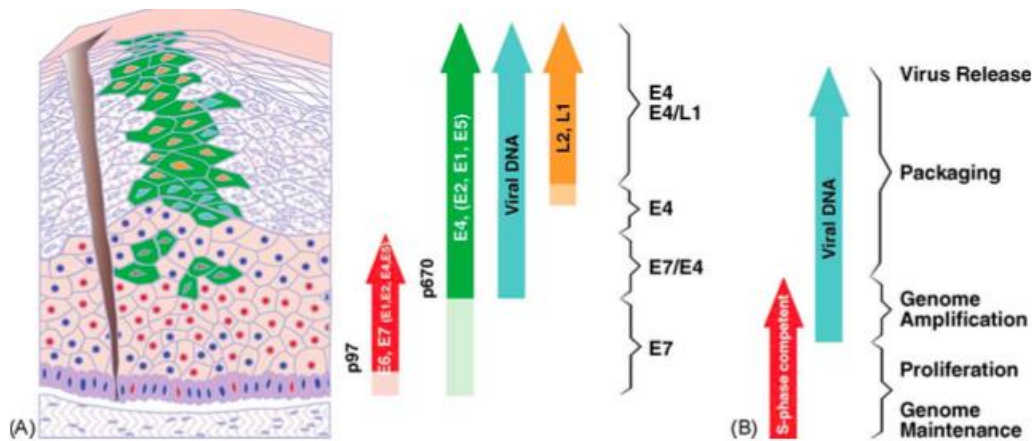


Figura 1.4. Ciclo de vida del virus en la célula huésped

Fuente: [14]

1.6. VPH 16

El VPH 16 pertenece al género alphapapillomavirus, que también pertenecen el VPH58, VPH31, VPH35, VPH52, VPH67; todos ellos representan el 75 % de los cánceres cervicales invasivos en todo el mundo [18]. Estas variantes virales de VPH difieren en la historia evolutiva y la patogenicidad [18].

VPH tipo 16 es uno de los prevalentes en términos de alto riesgo en el mundo y es encontrado en la mayoría de casos de cáncer cervical. [10] también el VPH tipo 16 es el mas persistente de VPH de alto riesgo causando progresión en CIN3 o en uno mucho peor. [19]

Para el HPV tipo 16 ha sido clasificado dentro de 4 linajes; European-Asian (EAS), incluye los sublinajes Europeo (EUR) y Asiático (As), African1 (AFR1), African 2 (AFR 2) y North-American/Asian-American (NA/AA). (ver fig. 1.5) [10], [19]

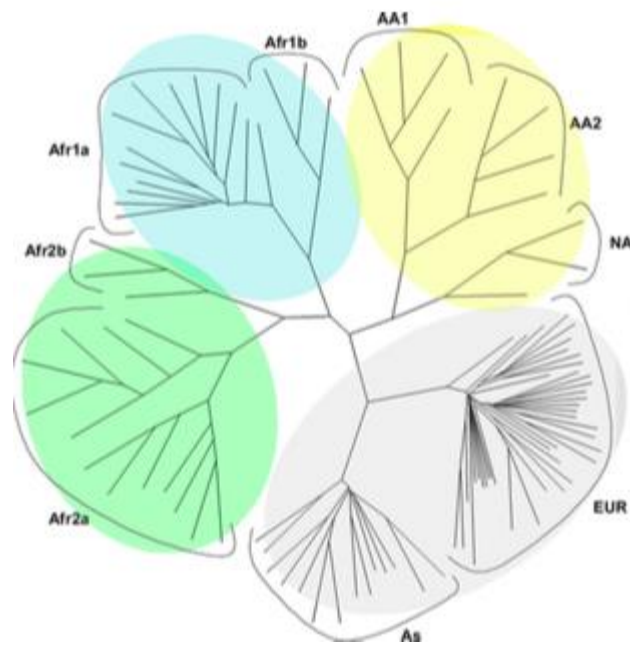


Figura 1.5. Árbol filogenético representando las variantes/linajes del genotipo 16

Fuente: [10]

Los linajes a su vez se encuentran en todo el mundo, no son endémicos de una sola región (ver fig. 1.6).

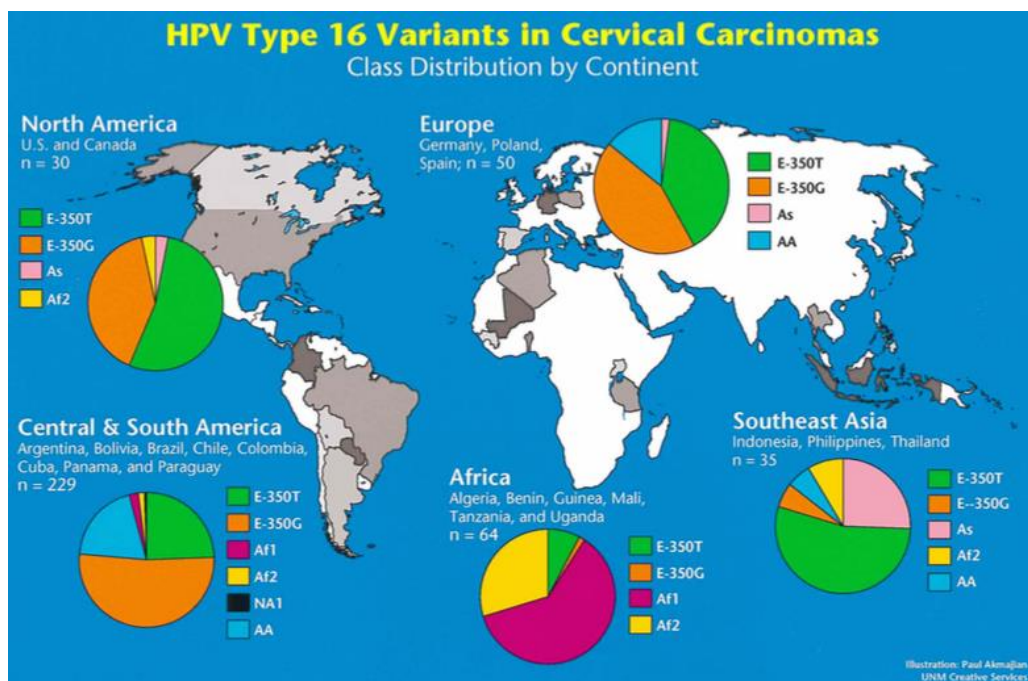


Figura 1.6. Variantes/linajes del cáncer cervical del genotipo 16 en el mundo.

Fuente: [20]

1.7. Gen E6

Las proteínas E6 y E7 son las que codifican para que exista un alto riesgo de VPH y juegan un rol importante en la transformación celular, algunos sugieren que las variaciones en las secuencias de estas regiones puede existir un alto riesgo de neoplasia cervical [7], [9], [21].

Los cambios de aminoácidos de E6 y E7 podrían afectar el potencial carcinogénico y respuestas inmunes del huésped [8]. Así que cualquier estudio acerca de los cambios en aminoácidos en estos genes podrían ayudar a la prevención y al diagnóstico del VPH.

1.8. Linajes de VPH tipo 16

En el VPH tipo 16 la clasificación de los 4 linajes se da en base a la secuenciación de los genes E6 y LCR

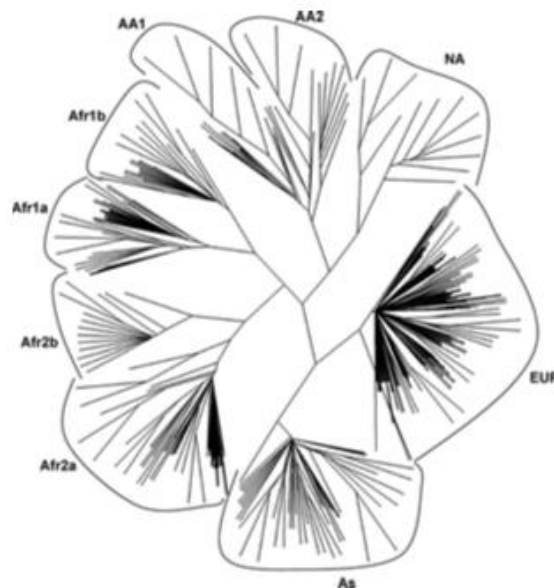


Figura 1.7. Árbol filogenético de los linajes del genotipo 16 en base a su gen E6/LCR.

Fuente: [10]

Linaje European-Asian. Se puede diagnosticar específicamente por tres posiciones de nucleótidos en E6 (145G, 286T, y 289A) y tres en el LCR (7489G, 7764C, 7786C). [10]

Otro común (□10%) SNPs en As aislados son A7289C (93,1%), T7384G (11,4%), G7429A (23,7%), T7781C (16,0%), y C7874G (22,1%). [10]

Linaje Africano. La principal rama AFR se puede diagnosticar específicamente por la presencia de C143G en E6 y C31T en el LCR. Todo AFR muestra un patrón común de cinco SNPs en E6, C143G, G145T, T286A, A289G, C335T y, que dan lugar a dos cambios de aminoácidos, Q14D y H78Y. [10]

Otros SNPs comunes (10% de cualquier sublinaje) en AFR aislados son T7293G (12,3%), A7611G (17,3%), y T7714A (43,2%) en AFR1a; G7868A (37,5%) en AFR1b; T7282G (45,9%), G7372C (46,6%), G7387C (45,6%), y G7868A (35,6%) en AFR2a; y T7282G (10,4%), A7348G (10,4%), T7450G (17,2%), T7643G (24,1%), A7688T (24,1%), y A7688G (13,8%) en AFR2b. [10]

Linajes North-American y Asian-American. Todos los aislados NA/AA muestran un patrón común de cinco SNPs en E6, nombrados G145T, T286A, C335T y T350G (los cuales dan un cambio en aminoácidos Q14H, H78Y y L83V). [10]

Otros SNPs comunes (10% de cualquier sublinaje) se produjeron sólo en NA aislados: T183G (78,6%) (que resulta en el cambio I27R amino ácido), T271C (21,4%) (un SNP en silencio), G7359A (70,0%), G7360A (70,0%), T7441G (70,0%), y C7784T (70,0%). [10]

CAPITULO #2

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto de la materia de Integradora fue realizado en el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI), bajo el Proyecto del SENESCYT PIC-12-INH-11 “Epidemiología Molecular del Virus de Papiloma Humano para la Prevención del Cáncer Cérvico Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador”. (ANEXO A).

2.1. Muestras y controles

Las muestras que se utilizaron para la Materia Integradora son de Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, Guayas, El Oro y Santa Elena. Se utilizaron 15 muestras.

La colección y la extracción de las muestras lo realizaron el personal del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, según los protocolos establecidos por los mismos para una buena practica.

2.2. Iniciadores de control

Para conocer si existía carga viral de VPH en las muestras se realizo una PCR de control interno con los iniciadores de *β -globina* que son:

5'- ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3' (PC03; forward) y

5'- CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' (PC04; reverse) (InvitrogenTM) (ver ANEXO B).

Estos iniciadores generan un amplicón de 110pb.

2.3. Amplificación del Gen E6 y Purificación

Las muestras que dieron positivas para la prueba de *β-globina* se las separo para la amplificación del Gen E6

Para la amplificación se utilizo el siguiente juego de iniciadores:

5´-CAGCAATACAACAAACCGTTG-3´(E6(e) forward) y

5´-TCATGCAATGTAGGTGTATCTCC-3´(E6(e) reverse)

Dando como resultado un amplicón de 220bp.

Las condiciones de la master mix (ver ANEXO C), se tuvo como referencia las condiciones ofrecidas por la empresa dueña de la enzima (Taq DNA Polymerase de Invitrogen) [22].

Las condiciones del ciclado para las muestras (ver ANEXO D)

Se realiza una purificación del los amplicones obtenidos con QIAquick PCR Purification Kit, se sigue el protocolo del fabricante (ver ANEXO E) [23], para una respuesta confiable de los resultados se realiza un gel de agarosa al 2% para corroborar que existan los amplicones purificados.

Se realiza una cuantificación de la carga viral de las muestras purificadas para su secuenciación (ver ANEXO F)

2.4. Secuenciación

Las muestras que fueron purificadas se las envía a secuenciar a la empresa Genewiz [24].

2.5. Filogenia

Análisis filogenéticos fueron realizados a partir de las secuencias del VPH16 que presentaban gran calidad, obtenidas por secuenciamiento.

El árbol filogenético fue realizado en BEAST 1.8.4 con el método de Neighbor-joining con 2000 réplicas y el modelo de parámetro Jukes Cantor, obtenido en base al programa Mega 5.2 (ver ANEXO G)

Para la realización del árbol del VPH 16 se utilizaron 7 secuencias.

Neighbor-joining es un método heurístico para la estimación de un árbol de evolución mínima (ME, por sus siglas en inglés) a partir de datos distancia evolutiva.

Este método dispone la velocidad de cálculo con la singularidad de los resultados y, es el método más usado para la construcción de árboles de distancia. [25]

El parámetro de Jukes Cantor especifica las frecuencias de equilibrio de los 4 nucleótidos que son un 25% cada uno y que durante la evolución cualquier nucleótido tiene la misma posibilidad de ser sustituido por otro [25]

CAPITULO #3

ANALISIS DE RESULTADOS

3.1. Resultados

3.1.1. Amplificación del Gen E6

Se utilizaron 15 muestras que dieron positivas para el control interno de *β -globina*, de estas 15 muestras se pudieron amplificar 10 muestras (66.67%) con los iniciadores específicos para el Gen E6 del genotipo 16 de VPH.

3.1.2. Secuenciación

Las 10 muestras que fueron amplificadas y purificadas para su secuenciación, se obtuvieron 7 muestras capaces para seguir con el proceso de análisis, puesto las otras 3 muestras tuvieron una baja calidad en el porcentaje de bases sin recortar del cromatograma.

3.1.3. Análisis Filogenético del Gen E6

La filogenia muestra las relaciones evolutivas entre los genes y sus organismos. [25]

Para demostrar las relaciones se utilizan diagramas que son los llamados arboles filogenéticos. [25] que nos ayudan para un mejor entendimiento de la evolución del gen del organismo. [26]

Para el siguiente estudio se utilizo el método de Neighbor- joining con 2.000 réplicas y

el modelo de parámetro Jukes Cantor. Este método dispone la velocidad de cálculo con la singularidad de los resultados y, es el método más usado para la construcción de árboles de distancia. [25]

En el árbol filogenético se utilizaron las secuencias citadas por Burk, et al 2013. [4] para compararlas con las secuencias obtenidas en el estudio, las secuencias de las muestras que se utilizaron fueron las que presentaron un gran calidad en el cromatograma

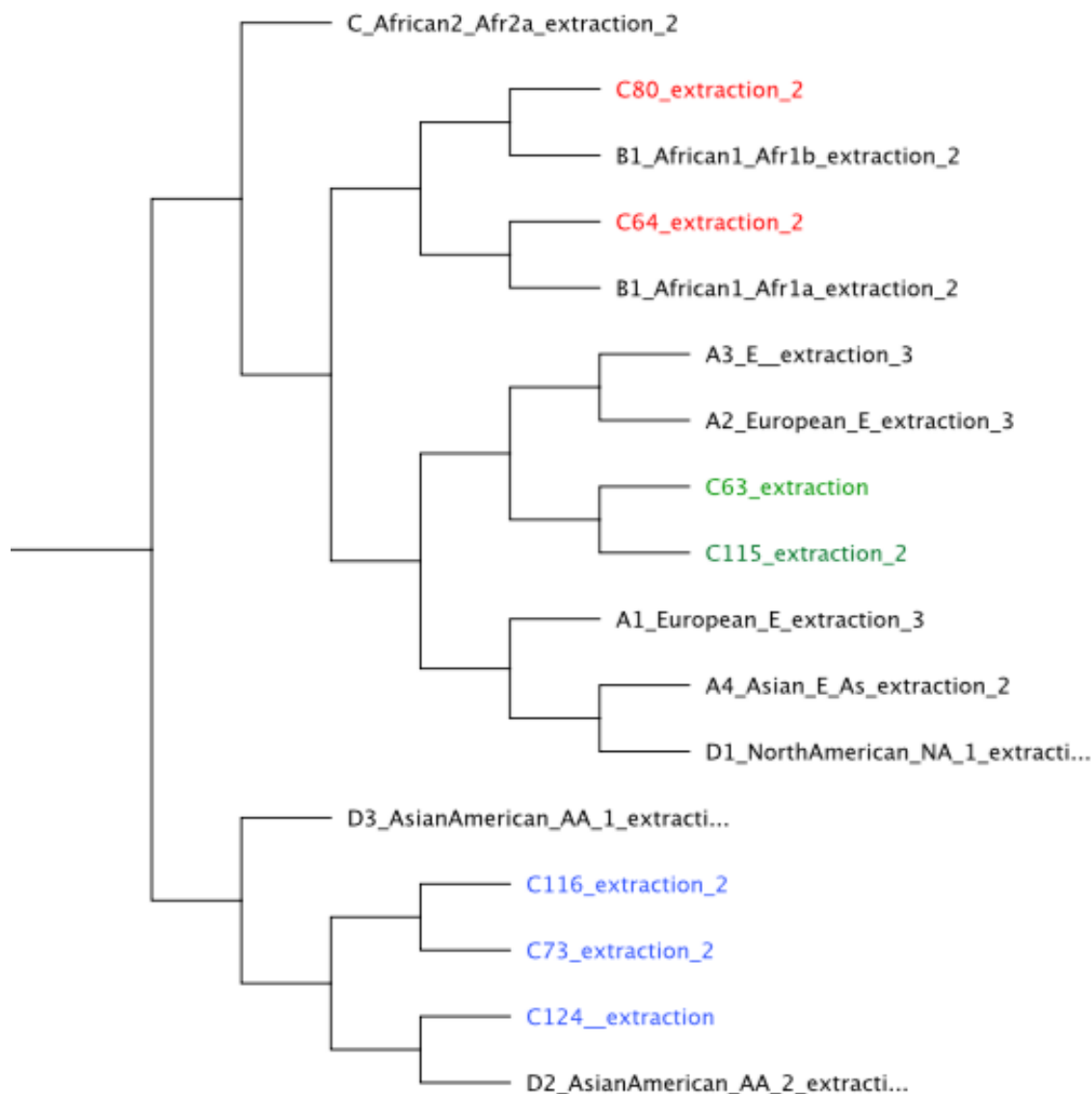


Figura 3.1. Árbol filogenético realizado con el Programa BEAST modelo Neighbor-joining parámetro Jukes Cantor (2000 réplicas) valor inicial 1.27E-08, valor final 2.35E-08 con prioridad uniforme.

Como se puede observar en el Árbol filogenético las muestras C80 y C64 se encuentran en el linaje Africano 1, aunque las 2 muestras se encuentran en el linaje africano tiene una diferencia o variabilidad por eso no se encuentran completamente juntas sino separadas.

La muestra C63 y C115 se encuentran en el linaje Europeo, estas muestras no presentan una variabilidad genética por hallarse juntas en el mismo linaje.

Las muestras C116, C73 y C124 se encuentran en el linaje Asiático Americano, como se observa en árbol filogenético, las muestras C116 y C73 presentan una variabilidad genética de la muestra C124 a pesar que las 3 se encuentran en el mismo linaje así se

demuestra que aunque se encuentren en el mismo linaje puede variar genéticamente.

3.2. Discusión

En base a la filogenia que es una herramienta que nos permite conocer el desarrollo evolutivo del virus de VPH en el Ecuador y gracias a los arboles filogenéticos los resultados los podemos obtener para una interpretación grafica.

Siendo el gen E6 que es uno de los genes mas representativos del virus de VPH nos sirvió para dar una muestra clara sobre la variabilidad genética existente en las muestras analizadas.

Así las muestras analizadas del virus de VPH del genotipo 16, nos dieron como resultado dentro de 3 de los 4 grandes linajes, siendo estos el linaje Africano dentro del sublinaje Africano 1, el linaje Europeo y el Linaje Asiático Americano.

Esto nos indica que están presentes todos los linajes en el Ecuador a pesar que la población es mas corta a diferencia de países desarrollados y que a pesar que existen campañas de concientización sobre la enfermedad del Papiloma Humano hay una gran presencia de la enfermedad.

La no presencia del linaje Asiático dentro de las muestras, no nos da un suficiente nivel confianza de que no exista este linaje en el país, puesto se debería aumentar la cantidad de las muestras analizadas para así descartar esta posibilidad.

La mayoría de muestras analizadas 43% se alinearon en el linaje Asiático Americano siendo este de mayor prevalencia para cáncer cérvico uterino aunque no se esta descartando que las otras muestras no tengan prevalencia puesto como son todas genotipo 16, presentando así un alto grado de riesgo de cáncer por ser este genotipo de alto riesgo dentro de los VPH.

CAPITULO #4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Los estudios de variabilidad genética son importantes porque nos permiten hallar polimorfismos existentes en las muestras.
- Las muestras analizadas se las hicieron en base al gen E6, una fracción del gen, siendo el amplicón de 220bp y el gen completo de 500bp aproximadamente demostrando que también se puede hallar variabilidad genética en partes del gen.
- Existen 3 (Africano, Europeo y Asiático Americano) de los 4 grandes linajes de VPH genotipo 16 en el Ecuador y no se descarta aun la presencia del genotipo restante (linaje Asiático).
- Algunas muestras a pesar de encontrarse en el mismo linaje defieren una de otra al separarse en otra raíz esto nos indica que a pesar del mismo linaje hay una variabilidad genética entre ellas no muy significativa.
- El linaje de mayor prevalencia fue el Asiático Americano siendo este linaje el mas oncogénico de los 4 linajes existentes del genotipo 16.
- Estos estudios permitirán una base para obtener información a lo largo del tiempo sobre los linajes que estan circundando del genotipo 16 en nuestro país

4.2. Recomendaciones.

- Este estudio nos brinda datos preliminares dando asi a conocer que se debe llevar a cabo estudios de una mayor magnitud, para así estimar la presencia de VPH real en nuestro país.

- Los estudios a futuro se puede analizar todo el gen E6 para así corroborar la información ya obtenida, si pertenecen al mismo linaje o con toda la secuencia total del gen existirá una mayor variabilidad genética.
- La importancia de conocer los genotipos con sus linajes para tomar en cuenta la implementación de una vacuna.
- Realizar más estudios para ver si existe una correlación entre el linaje y su potencial oncogénico.

ANEXOS

ANEXO A

Otorgado por el Comité de Bioética



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DEL GUAYAS

Guayaquil, 12 de abril de 2013

Señor Doctor
CÉSAR BEDOYA
Investigador Principal
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA "INSPH"
Presente

De nuestra consideración:


- El Comité de Bioética institucional del Hospital del Niño "Dr. Francisco de Ycaza Bustamante", en la sesión del 11 de marzo de 2013, luego del análisis pormenorizado del Proyecto de Investigación "Epidemiología Molecular del Virus de Papiloma Humano para la prevención del Cáncer de Cérvico-Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador" SENESCYT PIC-12-HN-001, resolvió aprobarlo.

El Comité solicita a los responsables de la ejecución del Proyecto que presenten los informes del avance del mismo, efectos adversos y demás pormenores que se adviertan en su desarrollo. Un delegado de este organismo supervisará el trabajo.

Hacemos propicia la oportunidad para expresarle nuestros sentimientos de consideración y alta estima.

Atentamente,


Dr. Antonio Aguilar Guzmán
PRESIDENTE


Dr. Francisco Pareja Morante
SECRETARIO

c.c.: Comité de Bioética

ANEXO B

Iniciadores de Control

Iniciador	Secuencia	Longitud	Dirección	Blanco	Amplicón
PC03	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	20	Forward	<i>β-globina</i>	110bp
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	20	Reverse	<i>β-globina</i>	

ANEXO C

Condiciones de la Mix

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Inicial	Volumen Final
Agua			13,3ul	25ul
Buffer	10X	1X	2,5ul	
MgCl ₂	50mM	2mM	1ul	
dNTPs	10mM	0,2mM	0,5ul	
Iniciador Forward	10uM	0,5uM	1,25ul	
Iniciador Reverse	10uM	0,5uM	1,25ul	
Platinum Taq Polymerase	5U/ul	0,5U	0,2ul	
ADN			5ul	

ANEXO D

Condiciones del Ciclado

	Grados Celsius	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización	94°	2min	1
Desnaturalización	94°	1min	40
Alineamiento	55°	1min	
Extensión	72°	1min	
Extensión Final	72°	10min	1
Final	4°		1

ANEXO E

Purificación

- Añadir 5 volúmenes de Buffer PB a 1 volumen de la muestra de PCR y mezclar.
- Poner la cantidad antes expuesta en la columna QIAquick y esta en un tubo de colección de 2ml
- Para unir el ADN a la columna centrifugar por 60seg
- Descartar el sobrenadante, ubicar de nuevo la columna en el tubo de colección.
- Para el lavado, añadir 750ul de Buffer PE a la columna y centrifugar 60seg
- Descartar el sobrenadante y ubicar de nuevo la columna en el tubo de colección, centrifugar por 1 min.
- Poner la columna QIAquick en un tubo limpio de 1.5ml.
- Para remover el ADN, añadir 50ul de Buffer EB al centro de la membrana de la columna QIAquick y centrifugar por 1 min.
- Cerrar los tubos de 1.5 y refrigerar las muestras purificadas.

ANEXO F

Cuantificación de las muestras purificadas

#	Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	blank	0,6	ng/μl	0,013	-0,001	-22,18	0,64	DNA
2	blank	-0,2	ng/μl	-0,003	-0,027	0,12	-0,02	DNA
3	C124	14	ng/μl	0,28	0,165	1,7	0,59	DNA
4	C116	20,9	ng/μl	0,418	0,23	1,81	0,72	DNA
5	C115	18,9	ng/μl	0,378	0,207	1,83	0,63	DNA
6	C73	11,1	ng/μl	0,223	0,126	1,77	0,48	DNA
7	C49	10,5	ng/μl	0,211	0,117	1,8	0,57	DNA
8	C80	12,6	ng/μl	0,253	0,142	1,78	0,65	DNA
9	C63	10,7	ng/μl	0,214	0,121	1,78	0,37	DNA
10	C98	11,4	ng/μl	0,229	0,135	1,69	0,4	DNA
11	SHL5	13,8	ng/μl	0,276	0,159	1,74	0,58	DNA
12	C64	9,8	ng/μl	0,196	0,088	2,24	0,43	DNA
13	blank	-0,4	ng/μl	-0,008	-0,026	0,3	-0,07	DNA

ANEXO G

Elección del mejor parámetro

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+H)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	κ(AT)	κ(AC)	κ(AG)	κ(TA)	κ(TC)	κ(TG)	κ(CA)	κ(CT)	κ(CG)	κ(GA)	κ(GT)	κ(GC)	
JC	59	1044.713	660.258	-270.429	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G	60	1050.506	659.558	-269.055	n/a	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2	60	1050.669	659.721	-269.137	n/a	n/a	1.96	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.166	0.042	0.166	0.042	0.042	0.166	0.042	0.166	0.042	0.042	0.042
JC+I	60	1053.053	662.105	-270.329	0.10	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92	61	1056.117	658.678	-267.591	n/a	n/a	1.96	0.293	0.293	0.207	0.207	0.048	0.034	0.139	0.048	0.139	0.034	0.048	0.196	0.034	0.196	0.048	0.034	0.034
K2+G	61	1056.437	658.998	-267.750	n/a	0.05	2.01	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.167	0.042	0.167	0.042	0.042	0.167	0.042	0.167	0.042	0.042	0.042
JC+G+I	61	1058.631	661.192	-268.848	0.28	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+I	61	1058.962	661.523	-269.013	0.12	n/a	1.96	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.166	0.042	0.166	0.042	0.042	0.166	0.042	0.166	0.042	0.042	0.042
T92+G	62	1061.765	657.836	-266.145	n/a	0.05	2.05	0.293	0.293	0.207	0.207	0.047	0.033	0.140	0.047	0.140	0.033	0.047	0.199	0.033	0.199	0.047	0.033	0.033
T92+I	62	1064.657	660.727	-267.591	0.00	n/a	1.96	0.293	0.293	0.207	0.207	0.048	0.034	0.139	0.048	0.139	0.034	0.048	0.196	0.034	0.196	0.048	0.034	0.034
K2+G+I	62	1064.981	661.051	-267.752	0.00	0.05	2.01	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.167	0.042	0.167	0.042	0.042	0.167	0.042	0.167	0.042	0.042	0.042
HKY	63	1068.354	657.934	-265.169	n/a	n/a	1.96	0.343	0.242	0.176	0.238	0.042	0.030	0.156	0.059	0.116	0.041	0.059	0.159	0.041	0.226	0.042	0.030	0.030
T92+G+I	63	1070.002	659.583	-265.993	0.18	0.05	2.07	0.293	0.293	0.207	0.207	0.047	0.033	0.141	0.047	0.141	0.033	0.047	0.200	0.033	0.200	0.047	0.033	0.033
TN93	64	1073.533	656.625	-263.489	n/a	n/a	1.99	0.343	0.242	0.176	0.238	0.045	0.032	0.259	0.063	0.000	0.044	0.063	0.000	0.044	0.374	0.045	0.032	0.032
HKY+G	64	1074.032	657.124	-263.738	n/a	0.05	1.99	0.343	0.242	0.176	0.238	0.041	0.030	0.157	0.058	0.116	0.040	0.058	0.160	0.040	0.227	0.041	0.030	0.030
HKY+I	64	1076.084	659.176	-264.764	0.35	n/a	1.97	0.343	0.242	0.176	0.238	0.041	0.030	0.157	0.059	0.116	0.041	0.059	0.159	0.041	0.226	0.041	0.030	0.030
TN93+G	65	1079.404	656.007	-262.154	n/a	0.05	2.09	0.343	0.242	0.176	0.238	0.043	0.031	0.264	0.061	0.000	0.042	0.061	0.000	0.042	0.380	0.043	0.031	0.031
TN93+I	65	1081.744	658.348	-263.324	0.16	n/a	1.99	0.343	0.242	0.176	0.238	0.044	0.032	0.259	0.063	0.000	0.044	0.063	0.000	0.044	0.374	0.044	0.032	0.032
HKY+G+I	65	1081.762	658.366	-263.333	0.46	0.05	2.03	0.343	0.242	0.176	0.238	0.041	0.029	0.158	0.057	0.117	0.040	0.057	0.161	0.040	0.229	0.041	0.029	0.029
TN93+G+I	66	1087.736	657.852	-262.050	0.16	0.05	2.11	0.343	0.242	0.176	0.238	0.043	0.031	0.265	0.061	0.000	0.042	0.061	0.000	0.042	0.382	0.043	0.031	0.031

TN93	64	1073.533	656.625	-263.489	n/a	n/a	1.99	0.343	0.242	0.176	0.238	0.045	0.032	0.259	0.063	0.000	0.044	0.063	0.000	0.044	0.374	0.045	0.032
HKY+G	64	1074.032	657.124	-263.738	n/a	0.05	1.99	0.343	0.242	0.176	0.238	0.041	0.030	0.157	0.058	0.116	0.040	0.058	0.160	0.040	0.227	0.041	0.030
HKY+I	64	1076.084	659.176	-264.764	0.35	n/a	1.97	0.343	0.242	0.176	0.238	0.041	0.030	0.157	0.059	0.116	0.041	0.059	0.159	0.041	0.226	0.041	0.030
TN93+G	65	1079.404	656.007	-262.154	n/a	0.05	2.09	0.343	0.242	0.176	0.238	0.043	0.031	0.264	0.061	0.000	0.042	0.061	0.000	0.042	0.380	0.043	0.031
TN93+I	65	1081.744	658.348	-263.324	0.16	n/a	1.99	0.343	0.242	0.176	0.238	0.044	0.032	0.259	0.063	0.000	0.044	0.063	0.000	0.044	0.374	0.044	0.032
HKY+G+I	65	1081.762	658.366	-263.333	0.46	0.05	2.03	0.343	0.242	0.176	0.238	0.041	0.029	0.158	0.057	0.117	0.040	0.057	0.161	0.040	0.229	0.041	0.029
TN93+G+I	66	1087.736	657.852	-262.050	0.16	0.05	2.11	0.343	0.242	0.176	0.238	0.043	0.031	0.265	0.061	0.000	0.042	0.061	0.000	0.042	0.382	0.043	0.031
GTR	67	1096.920	660.549	-262.372	n/a	n/a	1.01	0.343	0.242	0.176	0.238	0.037	0.126	0.191	0.052	0.000	0.036	0.246	0.000	0.000	0.275	0.037	0.000
GTR+G	68	1102.470	659.614	-260.877	n/a	0.05	1.06	0.343	0.242	0.176	0.238	0.032	0.122	0.194	0.045	0.000	0.031	0.238	0.000	0.014	0.280	0.032	0.010
GTR+I	68	1105.458	662.602	-262.371	0.00	n/a	1.01	0.343	0.242	0.176	0.238	0.037	0.126	0.191	0.052	0.000	0.036	0.246	0.000	0.000	0.275	0.037	0.000
GTR+G+I	69	1110.471	661.130	-260.608	0.12	0.05	1.04	0.343	0.242	0.176	0.238	0.032	0.124	0.193	0.045	0.000	0.031	0.241	0.000	0.014	0.278	0.032	0.010

NOTE -- Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value ($\ln L$), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown. Assumed or estimated values of transition/transversion bias (R) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (f) and rates of base substitutions (r) for each nucleotide pair. Relative values of instantaneous r should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of r values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The analysis involved 31 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 165 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

Abbreviations: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

1. Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

2. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Disclaimer: Although utmost care has been taken to ensure the correctness of the caption, the caption text is provided "as is" without any warranty of any kind. Authors advise the user to carefully check the caption prior to its use for any purpose and report any errors or problems to the authors immediately (www.megasoftware.net). In no event shall the authors and their employees be liable for any damages, including but not limited to special, consequential, or other damages. Authors specifically disclaim all other warranties expressed or implied, including but not limited to the determination of suitability of this caption text for a specific purpose, use, or application.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] BIONET, "VIRUS PAPILOMA HUMANO APLICACIÓN Y UTILIDAD CLINICA DE LAS PRUEBAS MOLECULARES," no. 6.
- [2] and E.-M. de V. Hans-Ulrich Bernard(1), Robert D. Burk(2),(3), Zigui Chen(2), Koenraad van Doorslaer(2), Harald zur Hausen(3), "Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments," vol. 4, no. 164, pp. 70–79, 2011.
- [3] ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre) Ecuador 2016, "Human Papillomavirus and Related Diseases Report Ecuador," *HPV Inf. Cent.*, no. Albania, p. 60, 2015.
- [4] R. Burk, A. Harari, and Z. Chen, "Human papillomavirus genome variants Robert," vol. 4, no. 164, pp. 232–243, 2011.
- [5] J. G. Sanabria Negrín, "Virus del Papiloma humano," *Rev. Ciencias Médicas Pinar del Río*, vol. 3, no. 4, pp. 168–187, 2009.
- [6] E. M. De Villiers, C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. Zur Hausen, "Classification of papillomaviruses," *Virology*, vol. 324, no. 1, pp. 17–27, 2004.
- [7] S. Daf, L. Jena, and S. Kumar, "Comparative phylogenetic analysis of E6 and E7 proteins of different 42 strains of HPV," *JK Sci.*, vol. 12, no. 1, pp. 6–10, 2010.
- [8] L. Yang, H. Yang, J. Chen, X. Huang, Y. Pan, D. Li, X. Ding, K. Wu, X. Shi, J. Fu, H. Shi, S. Ma, and Q. Sun, "Genetic variability of HPV-58 E6 and E7 genes in Southwest China," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 21, pp. 395–400, 2014.
- [9] P. K. S. Chan, C. Zhang, J. S. Park, K. K. Smith-McCune, J. M. Palefsky, L. Giovannelli, F. Coutl??e, S. Hibbitts, R. Konno, W. Settheetham-Ishida, T. Y. Chu, A. Ferrera, M. Alejandra Picconi, F. De Marco, Y. L. Woo, T. Raiol, P. Pi??a-S??nchez, J. H. Bae, M. C. S. Wong, M. Z. Chirenje, T. Magure, A. B. Moscicki, A. N. Fiander, G. Capra, E. Young Ki, Y. Tan, Z. Chen, R. D. Burk, M. C. W. Chan, T. H. Cheung, D. Pim, and L. Banks, "Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations," *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 11, pp. 2528–2536, 2013.

- [10] I. Cornet, T. Gheit, S. Franceschi, J. Vignat, R. D. Burk, B. S. Sylla, M. Tommasino, and G. M. Clifford, "Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR.," *J. Virol.*, vol. 86, no. 12, pp. 6855–61, 2012.
- [11] ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), "Human Papillomavirus and Related Diseases Report World," 2015.
- [12] M. L. Tornesello, S. Losito, G. Benincasa, F. Fulciniti, G. Botti, S. Greggi, L. Buonaguro, and F. M. Buonaguro, "Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix," *Gynecol. Oncol.*, vol. 121, no. 1, pp. 32–42, 2011.
- [13] Y. Farfan, "Deteccion Y Genotipificacion Del Virus De Papiloma Humano En Mujeres Con Lesiones De Significado Indeterminado (Ascus) En Un Programa De Tamizaje En Un Hospital De La Ciudad De Bogotá," 2009.
- [14] J. Doorbar, "The papillomavirus life cycle," *J. Clin. Virol.*, vol. 32, no. SUPPL., pp. 7–15, 2005.
- [15] X. Wang, Y. Li, T. Ni, X. Xie, J. Zhu, and Z.-M. Zheng, "Genome sequencing accuracy by RCA-seq versus long PCR template cloning and sequencing in identification of human papillomavirus type 58.," *Cell Biosci.*, vol. 4, no. 1, p. 5, 2014.
- [16] N. Muñoz, X. Castellsagué, A. B. de González, and L. Gissmann, "HPV in the etiology of human cancer," *Vaccine*, vol. 24, no. SUPPL. 3, pp. 1–10, 2006.
- [17] M. Mejia, "HPV 16 European variant and HPV 58 lineage A2 associated with cancer in Ecuadorian women," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [18] Z. Chen, M. Schiffman, R. Herrero, R. DeSalle, K. Anastos, M. Segondy, V. V. Sahasrabudde, P. E. Gravitt, A. W. Hsing, and R. D. Burk, "Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, 2011.
- [19] T. Gheit, I. Cornet, G. M. Clifford, T. Iftner, C. Munk, M. Tommasino, and S. K. Kjaer, "Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16

- variant lineages among a population-based sample of Danish women,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 20, no. 7, pp. 1315–1321, 2011.
- [20] Y. T., M. M.M., P. J., G. C.E., M. N., B. F.X., and W. C.M., “Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: A worldwide perspective,” *J. Virol.*, vol. 71, no. 3, pp. 2463–2472, 1997.
- [21] E. Q. Wu, X. Zha, X. H. Yu, G. N. Zhang, Y. G. Wu, Y. Fan, Y. Ren, L. Q. Kong, and W. Kong, “Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer,” *J. Gen. Virol.*, vol. 90, no. 5, pp. 1229–1237, 2009.
- [22] C. Nos, “Licensed for PCR,” vol. 018, no. 18038, pp. 5–8, 2010.
- [23] M. Reaction, C. Kit, B. Pe, B. Pb, B. Pb, B. Pb, B. Pb, B. Pb, B. Pb, B. Pb, B. Pb, B. Pe, and B. Pe, “QIAquick PCR Purification Kit Protocol,” pp. 19–20, 2008.
- [24] G. Company, “Genewiz.” .
- [25] P. Lemey, M. Salemi, and A. Vandamme, *The phylogenetic handbook*. 2009.
- [26] B. G. Hall, “Phylogenetic trees made easy, 4th ed,” 2011.