

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

**“Identificación de posibles epítomos inmunoterapéuticos en genotipos de HPV
con mayor prevalencia en Ecuador. Un análisis *in silico*.”**

Realizado por:

FERNANDO DAVID LÓPEZ DEFAZ

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro C., Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 6 de octubre de 2023

ANEXO B

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, Fernando David López Defaz, con cédula de identidad 050380437-9 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Fernando David López Defaz

C.C.: 050380437-9

ANEXO C

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“Identificación de posibles epítomos inmunoterapéuticos en genotipos de HPV con mayor prevalencia en Ecuador. Un análisis *in silico*.”

Realizado por:

FERNANDO DAVID LÓPEZ DEFAZ

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO C.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Defaz', with a horizontal line underneath the name.

FIRMA

ANEXO D

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESÍAS

GABRIELA CASTILLO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



Firma



Firma

Quito, 6 de Octubre de 2023

ANEXO E

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi esposa, quien, con su cariño, comprensión y amor, me ha brindado las mejores alegrías en mi vida, a mi madre siendo un pilar fundamental en mi vida, con su ejemplo me ha mostrado que el camino correcto no siempre es fácil.

Finalmente, dedico este trabajo a Dios, mi familia y mis amigos, quienes han compartido conmigo el corto camino que es la vida.

ANEXO F

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la UISEK y a sus profesores los cuales durante todo este proceso me guiaron y compartieron sus conocimientos conmigo, sirviendo en todo momento con su profesionalismo, calidez y calidad humana.

Agradezco de manera especial al Dr. Juan Carlos Navarro y al Dr. José Rubén Ramírez, sin los cuales este trabajo de titulación no sería posible.

Agradezco también a las personas involucradas en el desarrollo de bases de datos, los cuales facilitaron el análisis bioinformático.

ANEXO G

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

SALUD GLOBAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

Proyecto DII-P011617_2 (JCN, JRR)

Artículo de tesis

Identificación de posibles epítomos inmunoterapéuticos en cepas de HPV con mayor prevalencia en Ecuador. Un análisis *in silico*.

David Lopez ¹, Juan Carlos Navarro ^{1,2,*}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud; fernando.lopez@uisek.edu.ec; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

²Universidad Internacional SEK, Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

*Autor de Correspondencia: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Resumen

El virus del papiloma humano (HPV), es el principal agente etiológico del cáncer de cuello uterino. Una infección no tratada a tiempo, prolongada durante años y que ha desarrollado lesiones precancerosas, producto de los oncogenes de los genotipos de alto riesgo, conduce al desarrollo de cáncer de cuello uterino. Datos de la OMS indican que los genotipos 16 y 18 son los responsables de causar más del 70% de las infecciones por HPV a nivel mundial, en tanto, Ecuador reportan los genotipos 16,18,31,33,58 y 66, como los más prevalentes durante el año 2008 al presente estudio, además, se disponen de las secuencias de la región L1 reportadas en diferentes unidades de salud, para la predicción de epítomos de células T. Para el análisis bioinformático entre el péptido, el MHC I y II y células B, se emplearon los alelos disponibles en la base de datos del NCBI para seres humanos.

El análisis filogenético de las secuencias reportadas propone reclasificar a 11 y 15 diferentes genotipos *HPV 9* como genotipos *HPV 58* y *HPV 16* respectivamente. El estudio realizado detalla por primera vez, el análisis de posibles epítomos inmunoterapéuticos basados en la proteína L1 de la región tardía de los genotipos 16,18, 31, 33 y 58 reportados en unidades de salud del Ecuador, el análisis de la inmunogenicidad mostro que el score más alto reportado corresponde a los alelos MHC-I, HLA-B*44:03, MHC-II, HLA-DRB1*07:01 y diversos péptidos capaces de generar una respuesta adecuada frente a las células B. La visualización 3D



de las proteínas generadas, marca los péptidos de la proteína L1 con alto nivel de inmunogenicidad frente a las células T y B.

Palabras Clave

HPV, Genotipo, Epítipo, Respuesta inmunitaria, Vacunas, análisis *in silico*

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is the main etiological agent of cervical cancer. An infection not treated in time, prolonged for years and that has developed precancerous lesions, a product of the oncogenes of high-risk genotypes, leads to the development of cervical cancer. WHO data indicate that genotypes 16 and 18 are responsible for causing more than 70% of HPV infections worldwide, while Ecuador reports genotypes 16,18,31,33,58 and 66, as the most prevalent during the year 2008 to the present study, in addition, the sequences of the L1 region reported in different health units are available, for the prediction of T cell epitopes. For the bioinformatic analysis between the peptide, MHC I and II and B cells, the alleles available in the NCBI database for humans were used.

The phylogenetic analysis of the reported sequences proposes to reclassify 11 and 15 different *HPV 9* genotypes as *HPV 58* and *HPV 16* genotypes respectively. The study carried out details for the first time, the analysis of possible immunotherapeutic epitopes based on the L1 protein of the late region of genotypes 16,18, 31, 33 and 58 reported in health units in Ecuador, the analysis of immunogenicity showed. that the highest score reported corresponds to the alleles MHC-I, HLA-B*44:03, MHC-II, HLA-DRB1*07:01 and various peptides capable of generating an adequate response against B cells. The visualization 3D of the generated proteins marks the peptides of the L1 protein with a high level of immunogenicity against T and B cells.

Keywords

HPV, Genotype, Epitope, Immune response, Vaccines, in silico analysis

1. Introducción

El cáncer de cuello uterino es el cuarto más frecuente en mujeres, con un estimado de 604 000 casos nuevos en el 2020 a nivel mundial. Cerca del 90% de las muertes causadas por cáncer de cuello uterino en el 2020 ocurrieron en países con bajos y medianos ingresos, (WHO, 2023). En Latinoamérica, la incidencia de cáncer de cuello uterino llega al 22,8 por cada 100 000 mujeres al año. En el caso de Ecuador, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar como el más frecuente en mujeres en edad fértil, solo superado por el cáncer de mama (International Agency for Research on Cancer., 2023)

La etiología más probable para el cáncer de cuello uterino suele ser una infección de transmisión sexual no tratada a tiempo y que se ha prolongado por un periodo de 20 a 30 años, causada por el virus del papiloma humano (HPV) (Adhanom Ghebreyesus & Jakab, 2020; Sendagorta-Cudós et al., 2019). A nivel mundial, más del 70% de las lesiones de cáncer de cuello uterino provienen de infecciones causadas por los genotipos 16 y 18 conocidos como de alto riesgo (Cohen et al., 2019a). Sin embargo, como se describe en la tabla 1, los genotipos con mayor prevalencia a nivel nacional a partir del año 2008 al presente estudio son: 16, 33, 58, 66, 31. La mayoría de las células cancerígenas en el cáncer de cuello uterino surgen de infecciones persistentes por el virus del papiloma humano y expresan las oncoproteínas virales E6 y E7.

Tabla 1. Recopilación de diversos estudios sobre HPV en población femenina en el Ecuador a partir del año 2008. En los estudios sin análisis filogenético se emplearon las técnicas de hibridación con microarreglos de baja densidad, o pruebas qPCR. Para la genotipificación se emplearon las secuencias MY09 - MY11.

<i>Año de estudio</i>	<i>Lugar geográfico</i>	<i>CEPAS DESCRITAS</i>	<i>ID: Secuencias descritas</i>	<i>Origen, numero de muestra y periodo de estudio</i>	<i>Referencia</i>
2008	Quito Instituto de colposcopia e histerectomía	HPV: 16, 81, 31, 53, 56, 58	Secuencias no disponibles en GenBank®	-Preservada en parafina -96 muestras - septiembre 2005 – febrero 2006	(Tornesello et al., 2008)
2009	Santa ELENA SOLCA	HPV: 16, 58, 39, 59, 52	Sin estudio filogenético	-Hisopado cervical - 302 muestras - septiembre 2005 y enero 2006	(Brown et al., 2009)
2009	Quito Hospital AXISS	HPV: 6, 66, 16, 31, 44	Sin estudio filogenético	- Hisopado cervical -124 muestras - 2008 – 2009	(González-Andrade & Sánchez, 2009)
2015	Azuay	HPV: 66, 68, 16, 59, 31, 39, 33	Sin estudio filogenético	- Hisopado cervical -500 muestras - Sin datos	(Cabrera et al., 2015)

2016	Quito Solca	HPV: 16, 33, 11, 18, 66, 56	Sin estudio filogenético	- Hisopado cervical - 1581 muestras - enero 2008 - diciembre 2013	(García Muentes et al., 2016)
2016	Quito Solca	HPV: 9, 16, 58, 52, 66, 31, 43, 39, 68	KP794891- KP794918.	- Hisopado cervical -164 muestras - octubre – diciembre 2011 y mayo 2012 – junio 2013	(Mejía et al., 2016)
2018	Esmeraldas, Manabi, Los ríos y Santa Elena Universidad Católica Santiago de Guayaquil	HPV: 16, 58, 53, 31, 18, 52, 6, 33, 56	KU050106 - KU050193	- Hisopado cervical - 201 muestras - 2014	(Bedoya- Pilozo et al., 2018)
2018	Guayaquil SOLCA	HPV: 33, 67, 58, 40, 26, 82, 54	Sin estudio filogenético	- Preservada en parafina - 53 Muestras - enero 1, 2006 y diciembre 31, 2011	(Ramos et al., 2018)
2019	Quito INSPI	HPV: 31, 52, 53, 58	Sin estudio filogenético	- Hisopado cervical - 543 Muestras - 2018	(Zapata et al., 2019)

2019	Guayaquil SOLCA	HPV: 39, 16, 6, 58	Sin análisis filogenético	- Hisopado cervical - 800 muestras - enero – diciembre 2018	(Muentes et al., 2019)
2020	Cañar	HPV: 31, 58, 66, 59, 61, 35	Sin análisis filogenético	- Hisopado cervical - 100 muestras - julio de 2017 y septiembre de 2018	(Carrión Ordóñez et al., 2020)
2022	Valle Rural Communities of Cuenca	HPV 31, 51, 58, 52, 53, 16	Sin análisis filogenético	- Hisopado cervical, orina -120 muestras - mayo – agosto 2021	(Crespo et al., 2022)

Estructura del virión

Los virus del papiloma son virus de ADN de doble cadena de aproximadamente 8 kb de tamaño, con un diámetro entre 52 A 55 nm, contenido en una cápside de 72 capsomeros pentaméricos. Como se muestra en la **figura 1** el genoma del HPV contiene ocho regiones ORF que se pueden dividir en tres partes funcionales: región temprana (E) codifica las proteínas E1 – E7 necesarias para la replicación viral, la región tardía (L) codificas las proteínas L1 – L2 empleadas para el ensamblaje del virión y la región de control larga (LCR).

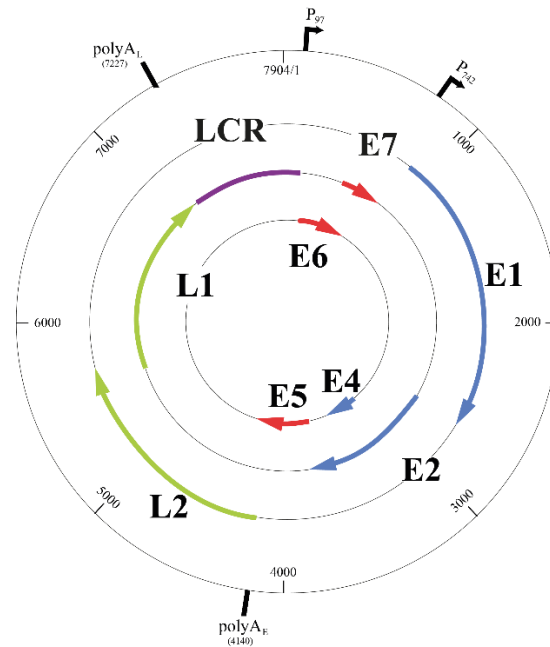


Figura 1 Esquema del genoma del HPV genotipo de alto riesgo 16. El diagrama indica los ORF; Azul los genes tempranos (E). Rojo los oncogenes (E). Verde los genes tardíos (L). Morado la región de control larga (LCR). Los dos principales promotores que impulsan la expresión viral (P97 y P742) y los sitios de poliadenilación. Fuente: Elaboración propia

Las proteínas E1 – E5 del HPV actúan como reguladores de la transcripción, en tanto, las proteínas E6 y E7 se dirigen como reguladores negativos del ciclo celular, actuando principalmente sobre p105Rb y p53, estimulando la diferenciación celular al entrar en la fase S. Las proteínas L1 y L2 ensamblan los capsómeros virales durante la generación de los viriones.

Clasificación de los papilomavirus

La región ORF L1 es la más conservada dentro del genoma del papilomavirus, por lo tanto, ha sido empleado para la identificación de nuevos genotipos. Se considera como un nuevo género del virus del papiloma si la secuencia completa del ADN del ORF L1 difiere en más del 10% del tipo conocido más cercano, entre el 2% al 10% definen las especies y menos del 2% un genotipo. Como se muestra en la figura 2 los árboles filogenéticos basados en las secuencias ORF L1 agrupan todos

aquellos tipos de HPV que pertenecen a la misma especie y que presumiblemente tendrán propiedades biológicas y patológicas similares.

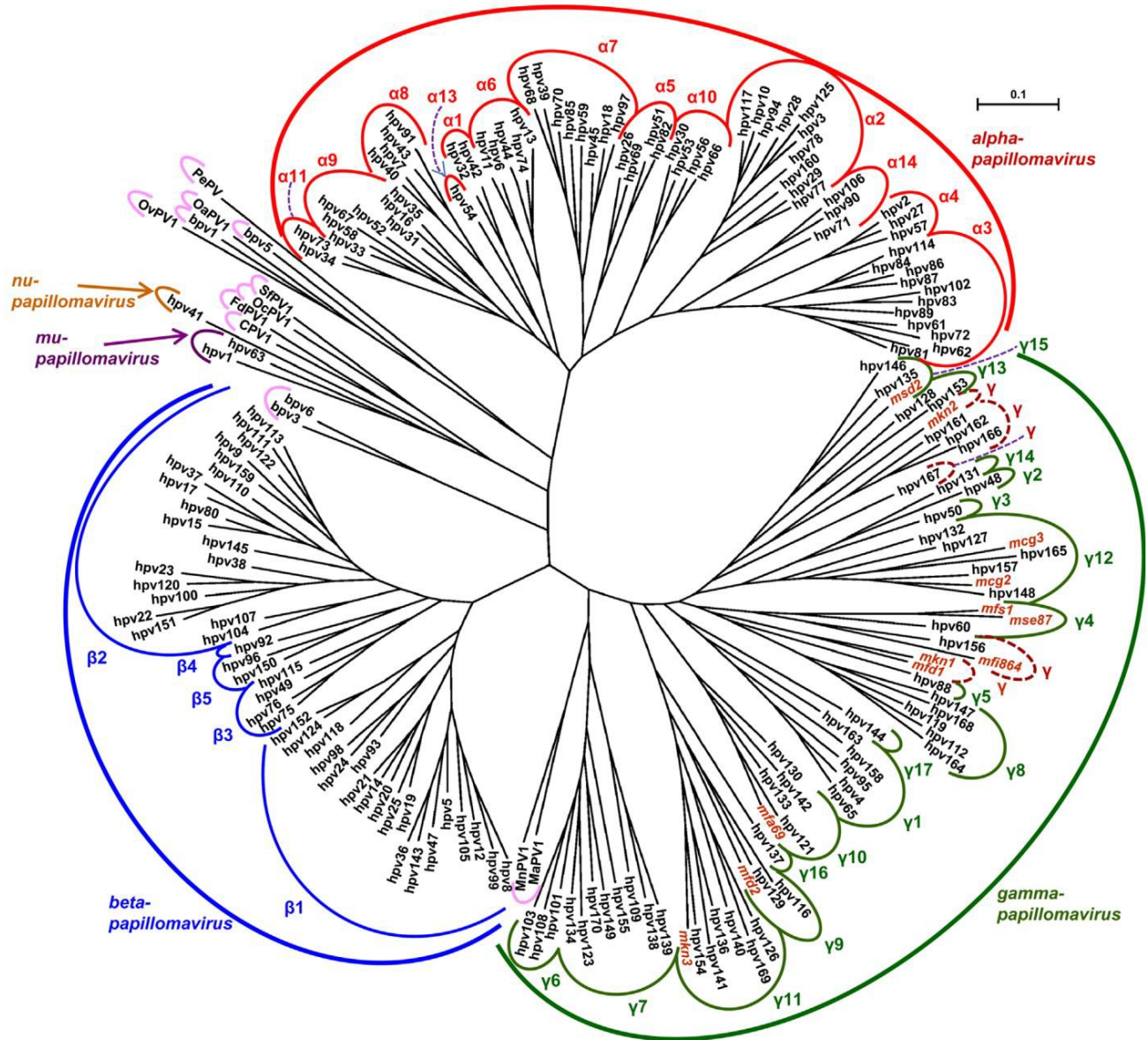


Figura 2. Tomado del trabajo De Villiers. 2004, **Árbol filogenético del papilomavirus basado en la región ORF L1**, se identifican a los géneros: Rojo: Alphapapillomavirus. Verde: Gammapapillomavirus. Azul: Betapapillomavirus. Morado: Mupapillomavirus. Marrón: Nupapillomavirus. Las especies con las letras del alfabeto griego: α , β , γ . Los números al final de cada una de las ramas identifican un genotipo de HPV, todas las demás abreviaturas se refieren a tipos de virus del papiloma animal. (De Villiers et al., 2004):

Curso natural de la infección y Vacunación

Como se muestra en la figura 3, el ciclo de reproducción viral del HPV está directamente relacionado con la diferenciación de células epiteliales. La infección hacia el epitelio por parte del HPV ocurre a través de micro traumas, exponiendo a las células basales a la entrada del virus. Las proteínas de replicación: E1 y E2 inician y regulan la replicación al unirse al promotor de replicación viral. E4 facilita el ensamblaje y la replicación viral. E5 induce la proliferación celular no programada, activa los receptores de crecimiento e inhibe la apoptosis. E6 induce la síntesis de ADN viral, suprime la proteína p53, factores de reparación, previene la diferenciación celular y replicación de ADN. E7 Interactúa principalmente con la proteína ribosomal p105Rb e induce la proliferación celular no programada. Las proteínas tardías L1-L2 ensamblan capsómeros y cápsides, facilitando el ensamblaje del virión, codifican epítomos neutralizantes e interactúan con los receptores celulares.

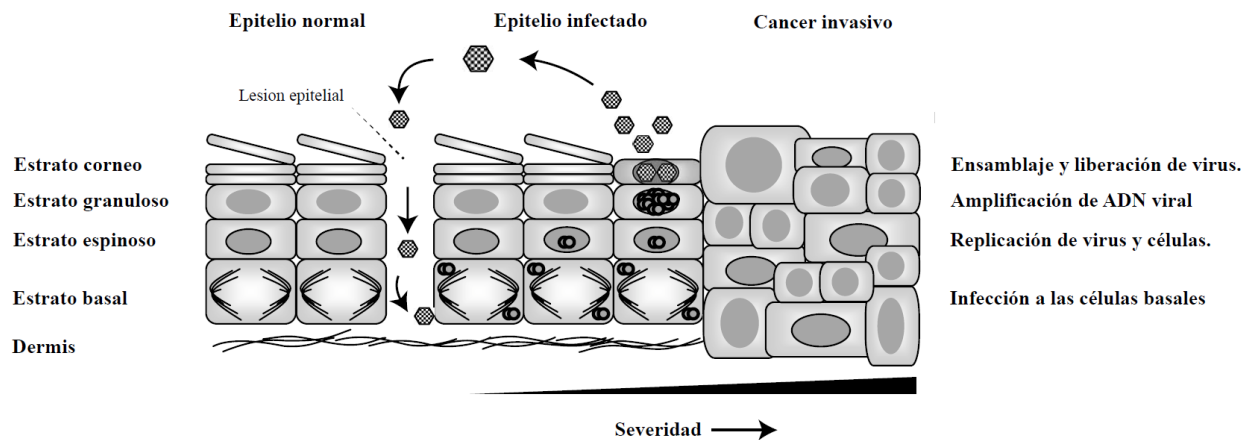


Figura 3. Representación esquemática de la diferenciación epitelial anormal inducida por el virus del papiloma humano, se comparan el epitelio normal, el epitelio infectado y el estadio de cáncer invasivo. Durante la etapa de infección viral y replicación del virus se encuentran activos los genes E 1- E7, mientras tanto, las proteínas LVP producidas por los genes tardíos L1-L2, se expresan durante la amplificación del ADN viral, ensamblaje y liberación del virus. Fuente: elaboración propia

El HPV es un patógeno con tropismo por las células epiteliales, por lo que el cuello uterino puede considerarse como el objetivo idóneo de tejido susceptible a la carcinogenicidad del HPV. Los principales pasos que se sabe son necesarios para la carcinogénesis cervical incluyen una infección por HPV no tratada, persistente, la progresión a lesiones precancerosas y finalmente la invasión.

El cáncer de cuello uterino es una enfermedad prevenible, tratable, curable si se detecta a tiempo y se trata adecuadamente, las vacunas contra el HPV brindan una herramienta profiláctica en la lucha contra las infecciones del virus del papiloma humano, medicamentos desarrollados frente a cepas de alto y bajo riesgo con mayor prevalencia. (Cohen et al., 2019b).

En Ecuador se distribuyen dos tipos de vacunas en el plan nacional: Gardasil 9 y Cervarix, la primera brinda protección contra los genotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, mientras que la segunda lo hace contra los genotipos 16 y 18. Ambas vacunas están desarrolladas contra la proteína L1 de la región temprana. Se suministran a niños y adolescentes entre los 9 – 14 años que reciben 2 inyecciones, la primera en la fecha elegida y la segunda entre 5 – 13 meses después. (Adhanom Ghebreyesus & Jakab, 2020)

El MSP recomienda la vacunación temprana contra el HPV, dado que las infecciones comúnmente se adquieren después que los adolescentes y adultos jóvenes se vuelven sexualmente activos. Si bien los casos de HPV pueden desaparecer de forma natural, las vacunas son capaces de reducir en gran medida las infecciones producidas y el desarrollo de cáncer de cuello uterino por casos de HPV. (Sendagorta-Cudós et al., 2019)

El desarrollo de vacunas profilácticas es uno de los posibles métodos de tratamiento que ahora se ha explorado para prevenir las infecciones por HPV, (Garbuglia et al., 2020) Debido a esto, la proteína L1 del HPV la convierte en el objetivo ideal para el desarrollo de vacunas profilácticas,

estimulan la inmunidad adaptativa del huésped generando anticuerpos de tipo IgG, las regiones tardías que forman la cápside o una proteína de superficie son las primeras en entrar en contacto con las células presentadoras de antígenos. Debido a esto la proteína L1 que codifica la cápside del HPV es el candidato idóneo para un plan de vacunación. (Gupta et al., 2021)

El análisis *in silico* de epítomos inmunoterapéuticos en secuencias de HPV reportadas en diversas unidades de salud del Ecuador y recuperadas de genbank (NCBI), mostrará la realidad que se presenta en el país. Permitirá determinar los genotipos descritos y presentes en esta base datos a nivel nacional, y comprobar si las vacunas suministradas tienen un efecto positivo sobre las cepas circulantes. El desarrollo de epítomos en vacunas profilácticas proporcionará una herramienta eficaz en la lucha contra el cáncer de cuello uterino, y el análisis de las secuencias filogenéticas reportadas suministrará la información necesaria para análisis inmunoterapéuticos, farmacológicos o biotecnológicos, posteriores.

2. Materiales y métodos

Recuperación de la secuencia de cepas:

Se recuperaron secuencias de ADN disponibles en NCBI del gen L1 completo reportadas para Ecuador, mediante una búsqueda en la base de datos del NCBI (Tabla 2), de los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33, 58, 66. Las secuencias recuperadas tuvieron una longitud de 450 pares de bases

Alineamientos de secuencias y Análisis filogenéticos

Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias del gen L1 de todos los aislados de HPV descritos en la tabla 2 con el programa MEGA X. Los árboles filogenéticos se construyeron mediante neighborjoining con apoyo de ramas mediante el análisis a posteriori de Bootstrapping,

con 1000 repeticiones o pseudorélicas, confirmando la robustez con valores de bootstrap superiores al 90%. Las secuencias detalladas se proporcionan en forma de archivo FASTA (Archivo An1), el detalle del análisis filogenético se proporciona en forma de archivos BPM (Archivo An2) y (Archivo An3), finalmente la disposición del análisis filogenético se proporciona en forma de archivo Newick tree (Archivo An4).

Los árboles filogenéticos se elaboraron usando el software MEGA X[®], para establecer la relación entre las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias descritas por (De Villiers et al., 2004) las secuencias completas se recuperaron de la base de datos del NCBI (Tabla 2). La matriz de alineamiento fue de 170 secuencias cada una con 450 pares de base, mediante Clustal W en MEGA X, con parámetros de GOP y GEP por default.

Método de Predicción de Epítomos de Células-T MCH I y II:

Para la predicción de epítomos de células-T MCH I y II, se implementaron los servidores web NetMHCpan-4.1 y NetMHCIIpan-4.0, diseñados específicamente para prever la afinidad de unión de péptidos a MCH I y II, respectivamente. En el desarrollo de estos softwares, se aplicaron variadas técnicas de entrenamiento para optimizar la predicción de péptidos. Entre estas técnicas, se destacan:

- (BA): Predictores entrenados con datos de afinidad vinculante. Este método se centra en modelar el evento único de unión péptido-MHC, obviando otras características biológicas que puedan estar involucradas en el proceso.
- (EL): Ligandos eluidos, datos obtenidos de experimentos de espectrometría de masas.
- NNAlign_MA: Este algoritmo de predicción define la especificidad de la unión péptido-MHC considerando los procesos biológicos esenciales y la expresión natural del péptido.

Factores como el TAP (Transporte asociado a la presentación de antígenos) son tenidos en cuenta en este proceso. El método también emplea curvas de sensibilidad/especificidad en función del umbral de puntuación utilizando el test de Pearson.

Un valor próximo a 1 en estas predicciones sugiere una alta probabilidad de una unión robusta entre el péptido y el MHC-I y II (Hoof et al., 2009; Jurtz et al., 2017; Reynisson et al., 2021)

Predicción de epítomos de células MHC-I T-Cell

La identificación de epítomos de células T / MHC-I derivados de las proteínas de la región ORF L1 de los genotipos HPV 16, 18, 31, 33, 58 se llevó a cabo utilizando la base de datos de epítomos inmunes (IEDB), disponible en <http://tools.iedb.org/mhci/>. Se mantuvieron los parámetros por defecto para este análisis.

Predicción de epítomos de células MHC-II T-Cell

La identificación de epítomos de células T / MHC-II derivados de las proteínas de la región ORF L1 de los genotipos HPV 16, 18, 31, 33, 58 se efectuó mediante la herramienta proporcionada por la base de datos de epítomos inmunes (IEDB), localizada en <http://tools.iedb.org/mhcii/>.

Predicción de epítomos de células B

Se usó el software ABCpred página de envío de ABCpred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/>) para identificar epítomos de células B contra proteínas las cepas 16, 18, 31, 33, 58 y 66 se usaron parámetros predeterminados con un valor de umbral de 0,8 para el método de predicción.

El servidor ABCpred, que se basa en una red neuronal artificial para la predicción de epítomos de células B lineales. Cabe mencionar que, en el proceso de desarrollo y optimización de este

software, se implementaron diversas técnicas de entrenamiento. Una de las más destacadas es la llamada "Threshold independent measures-ROC", que relaciona parámetros tales como sensibilidad, especificidad, precisión y valor predictivo positivo. Esto permite a ABCpred clasificar de manera efectiva los epítomos y los no epítomos. Un valor cercano a 1 sugiere una alta probabilidad de que las células B identifiquen al péptido como epítomo. (Saha & Raghava, 2006)

Visualización de la Estructura 3D de Epítomos Predichos

Para la transcripción y traducción de las secuencias ADN a cadenas de proteínas se usó el software Expasy página de acceso de Expasy (web.expasy.org/translate). Para la obtención del modelo en formato PDB se usó el software Phyre², página de acceso de Phyre² (www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index). Para la visualización, edición y marcaje de los epítomos predicho en la estructura 3D se usó el software Pymol en su versión para estudiantes. (**Figura 5**)

Resultados

Análisis filogenéticos

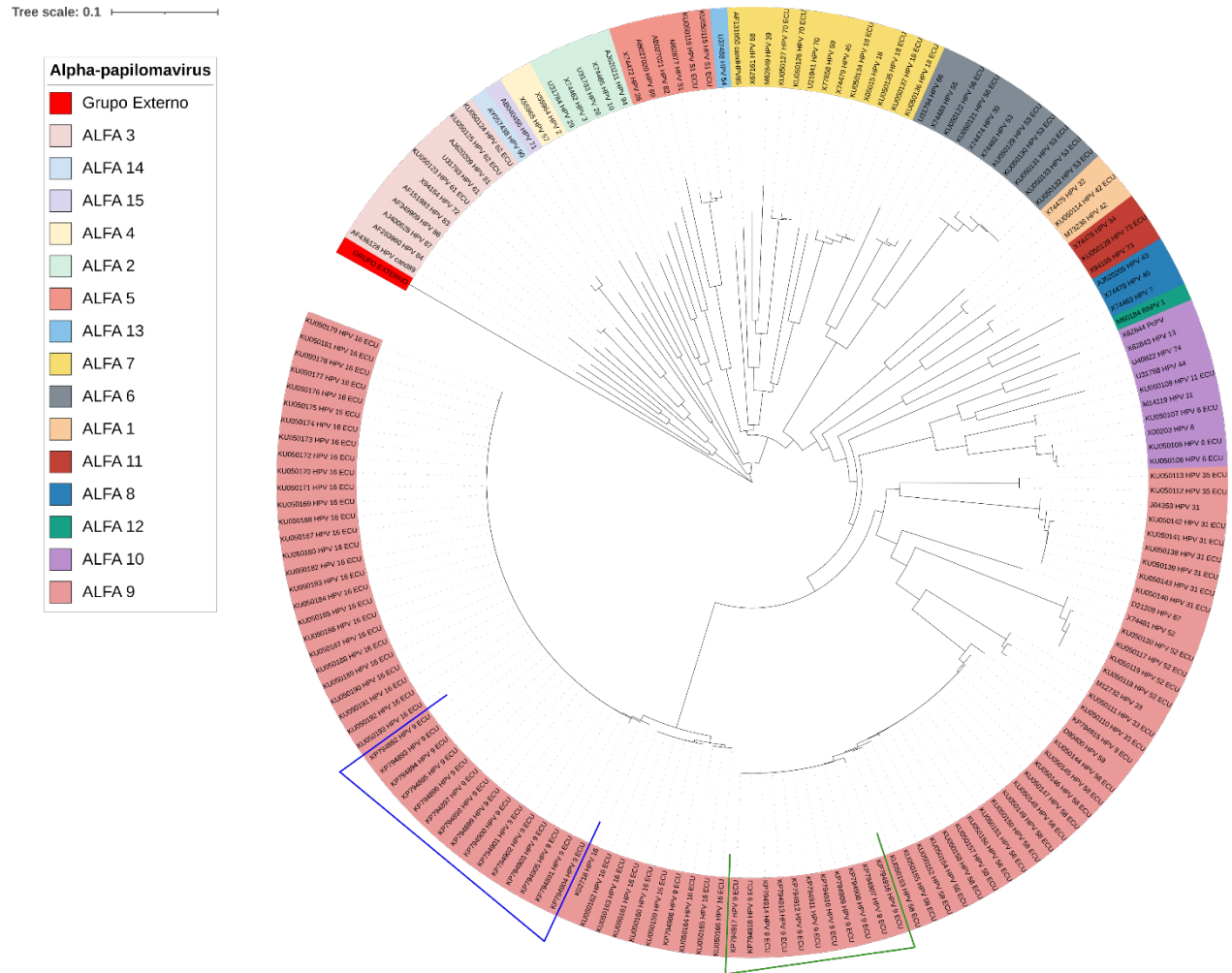


Figura 4 Árbol filogenético de los genotipos reportados en el Ecuador a partir del año 2008 al presente estudio. se empleó como grupo externo a *Phocoena spinipinnis papilomavirus* (GenBank: AJ238373). Se muestran las secuencias correspondientes: en azul KP794907 – KP794918 y en verde KP794891 – KP794906, reportadas en GENBanck como genotipo 9.

Tabla 2. Secuencias empleadas para generar el análisis filogenético alfa papilomavirus, Se resalta en color gris los GenBank Access, empleados para la predicción y visualización de epítomos inmunoterapéuticos de los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 58 la clasificación se basa en lo propuesto por (De Villiers et al., 2004), no se hallaron secuencias del genotipo 66 descritas en el país.

<i>Especie</i>	<i>Genotipos</i>	<i>Genotipos descritos en el ECUADOR</i>	
1	X74475 HPV 32 M73236 HPV 42	KU050114 HPV 42	
2	U31784 HPV 29 U31783 HPV 28 X74462 HPV 3 AJ620211 HPV 94 X74465 HPV 10		
3	AF349909 HPV 86 AF293960 HPV 84 AJ400628 HPV 87 AF151983 HPV 83 AJ620209 HPV 81 X94164 HPV 72 U31793 HPV 61 AF436128 candHPV 89	KU050123 HPV 61 KU050125 HPV 62 KU050124 HPV 62	
4	X55965 HPV 57 X55964 HPV 2 ^a		
5	AB027020 HPV 69 X74472 HPV 26 AB027021 HPV 82 M62877 HPV 51	KU050116 HPV 51 KU050115 HPV 51	
6	X74474 HPV 30 X74482 HPV 53	KU050122 HPV 56 KU050121 HPV 56	KU050131 HPV 53 KU050132 HPV 53

	X74483 HPV 56	KU050129 HPV 53	KU050133 HPV 53
	U31794 HPV 66	KU050130 HPV 53	
7	AF131950 candHPV85	KU050127 HPV 70	
	X77858 HPV 59	KU050126 HPV 70	
	M62849 HPV 39	KU050134 HPV 18	
	X67161 HPV 68	KU050135 HPV 18	
	U21941 HPV 70	KU050136 HPV 18	
	X74479 HPV 45	KU050137 HPV 18	
	X05015 HPV 18		
8	AJ620205 HPV 43		
	X74463 HPV 7		
	X74478 HPV 40		
9	X74481 HPV 52	KU050113 HPV 35	KP794891 HPV 9
	D21208 HPV 67	KU050112 HPV 35	KU050167 HPV 16
	D90400 HPV 58	KU050120 HPV 52	KU050193 HPV 16
	M12732 HPV 33	KU050119 HPV 52	KU050192 HPV 16
	J04353 HPV 31	KU050118 HPV 52	KU050191 HPV 16
	K02718 HPV 16	KU050117 HPV 52	KU050190 HPV 16
		KP794915 HPV 9	KU050189 HPV 16
		KU050158 HPV 58	KU050188 HPV 16
		KU050157 HPV 58	KU050187 HPV 16
		KU050156 HPV 58	KU050186 HPV 16
		KU050155 HPV 58	KU050185 HPV 16
		KU050154 HPV 58	KU050184 HPV 16
		KU050153 HPV 58	KU050183 HPV 16
		KU050152 HPV 58	KU050182 HPV 16
		KU050151 HPV 58	KU050180 HPV 16
		KU050150 HPV 58	KU050179 HPV 16

KU050149 HPV 58	KU050178 HPV 16
KU050148 HPV 58	KU050177 HPV 16
KU050147 HPV 58	KU050176 HPV 16
KU050146 HPV 58	KU050175 HPV 16
KU050145 HPV 58	KU050174 HPV 16
KU050144 HPV 58	KU050173 HPV 16
KP794918 HPV 9	KU050172 HPV 16
KP794917 HPV 9	KU050171 HPV 16
KP794916 HPV 9	KU050170 HPV 16
KP794914 HPV 9	KU050169 HPV 16
KP794913 HPV 9	KU050168 HPV 16
KP794912 HPV 9	KU050142 HPV 16
KP794911 HPV 9	KU050141 HPV 16
KP794910 HPV 9	KU050138 HPV 16
KP794909 HPV 9	KU050139 HPV 16
KP794908 HPV 9	KU050143 HPV 16
KP794907 HPV 9	KU050140 HPV 16
KU050110 HPV 33	KU050120 HPV 16
KU050111 HPV 33	KU050120 HPV 16
KP794904 HPV 9	KU050117 HPV 16
KP794902 HPV 9	KU050119 HPV 16
KP794905 HPV 9	KU050118 HPV 16
KP794903 HPV 9	KU050110 HPV 16
KP794901 HPV 9	KU050111 HPV 16
KP794900 HPV 9	KU050166 HPV 16
KP794899 HPV 9	KU050165 HPV 16
KP794898 HPV 9	KU050164 HPV 16
KP794897 HPV 9	KP794906 HPV 9

		KP794896 HPV 9	KU050159 HPV 16
		KP794895 HPV 9	KU050160 HPV 16
		KP794894 HPV 9	KU050161 HPV 16
		KP794893 HPV 9	KU050163 HPV 16
		KP794892 HPV 9	KU050162 HPV 16
			KU050181 HPV 16
10	U31788 HPV 44	KU050109 HPV 11	
	U40822 HPV 74	KU050108 HPV 6	
	X62844 PcPV	KU050107 HPV 6	
	X62843 HPV 13	KU050106 HPV 6	
	M14119 HPV 11		
	X00203 HPV 6		
11	X74476 HPV 34	KU050128 HPV 73	
	X94165 HPV 73		
12	M60184 Macaca mulata papillomavirus 1		
13	U37488 HPV 54		
14	AY057438 candHPV 90		
15	AB040456 HPV 71		
<i>Grupo externo</i>	AJ238373 Phocoena spinipinnis papillomavirus		

Análisis filogenéticos

En el estudio de la filogenia de Alpha papilomavirus, hemos establecido un árbol filogenético compuesto por 140 secuencias de aminoácidos, organizadas en 15 clados distintos. Dichos clados están detallados en la Tabla 2 y en los anexos Archivo An 3 y Archivo An 4.

Dentro de esta clasificación, los clados 2, 4, 8, 12, 13, 14 y 15 no incluyen secuencias de referencia de origen nacional. Por otro lado, los clados 1, 3, 5, 6, 7, 10 y 11 fueron construidos utilizando, en parte, secuencias procedentes del país, las cuales previamente fueron reportadas y subidas a la base de datos GenBank. Estas secuencias son filogenéticamente congruentes con secuencias que se han reportado en investigaciones anteriores en el contexto internacional.

Específicamente, las secuencias KP794907 – KP794918 y KP794891 – KP794906, identificadas como pertenecientes al genotipo *HPV 9*, están resaltadas en color azul y verde, respectivamente. Es importante mencionar que las secuencias KP794907 – KP794918 están filogenéticamente vinculadas al genotipo *HPV 58*, mientras que las secuencias KP794891 – KP794906 tienen relación con el genotipo *HPV 16*.

Para mejorar la precisión y validación de nuestro análisis filogenético, hemos empleado el *Phocoena spinipinnis papilomavirus* como grupo externo. Esta elección proporciona un punto de referencia necesario para contextualizar y contrastar las relaciones evolutivas dentro del género Alpha papilomavirus que estamos estudiando.

Predicción de epítomos de células MHC-I T-Cell

El complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (MHC I), tiene diferentes alelos dentro de una misma población con una especificidad de unión a péptido diversa. Se seleccionaron aquellos alelos con mayor prevalencia en seres humanos y recuperados de la base de datos dbMHC.

Los alelos seleccionados fueron, HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:01, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01, HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01. Para la tabla 3 se escogieron todos los epítomos predichos que tenían una longitud entre 9 – 10 mer, puntuación de inmunogenicidad superior a 0.88 y un valor de percentil menor a 1. Los Alelos HLA-B*44:03, HLA-A*68:01, HLA-B*44:02, HLA-A*68:02, presentaron diferentes grados de inmunogenicidad frente a los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 58 seguidos de los otros HLA. La lista de epítomos potentes predichos, contra MHC-1, con alta puntuación de inmunogenicidad se proporciona en la tabla 3, Los resultados detallados de todos los epítomos contra MCH I se proporcionan en la información de apoyo, como archivos de Excel (Archivo An5).

Predicción de epítomos de células MHC-II T-Cell

Para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC-II), se seleccionaron y recuperaron de la base de datos dbMHC

Los alelos seleccionados fueron: HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*12:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB4*01:01, HLA-DRB5*01:01, HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01, HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02, HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02, HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01, HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02, HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01, HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02, HLA-

DPA1*02:01/DPB1*05:01, HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01 Para la tabla 4 se escogieron todos los epítomos predichos que tenían una longitud de 15 mer, puntuación de inmunogenicidad superior a 0.88 y un valor de percentil menor a 1.

Los Alelos HLA-DRB1*01:01 y HLA-DRB1*07:01, presentaron diferentes grados de inmunogenicidad frente a los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 58 seguidos de los otros HLA. La lista de epítomos potentes predichos, contra MHC-1, con alta puntuación de inmunogenicidad se proporciona en la tabla 4, Los resultados detallados de todos los epítomos contra MCH I se proporcionan en la información de apoyo, como archivos de Excel (Archivo An6).

Predicción de epítomos de células MHC-II T-Cell

Los epítomos reconocidos por células B frente a las proteínas L1 se predijeron utilizando ABCpred con un valor umbral de 0,80 y otros parámetros predeterminados. En total, 33 epítomos de células B de 16 aminoácidos de longitud se predijeron contra las proteínas L1 de los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 58. La lista de epítomos potentes predichos, con una alta puntuación de inmunogenicidad, se proporciona en la Tabla 5. Los resultados detallados de todos los epítomos contra las células B se proporcionan como información de respaldo, como archivos Excel (Archivo An7).

Tabla 3 Predicción de los principales epítomos de los genotipos HPV 16, 18, 31, 33 y 58 frente al MHC I, Se muestran solo los resultados con un score ≥ 0.90 , los epítomos tienen una longitud entre 9 – 10 mer, el péptido VPPPPTTSL con un score = 0.986735 del genotipo 18 correspondiente al alelo HLA-B*07:02.

<i>Cepa</i>	<i>GenBank</i>	<i>Alelo</i>	<i>Epitope</i>	<i>Score</i>
<i>HPV 16</i>	KU050166	HLA-B*44:03	EEYDLQFIF	0.973715
		HLA-A*26:01	DVMSYIHSM	0.954823
		HLA-A*68:01	YTFWEVNLK	0.921429
		HLA-B*44:02	EEYDLQFIF	0.920265

HPV 18		HLA-A*68:02	LTADVMSYI	0.913574	
	KU050134	HLA-B*07:02	VPPPPTTSL	0.986735	
		HLA-B*44:03	EEYDLQFIF	0.973715	
		HLA-A*68:01	TTSLVDTYR	0.961923	
		HLA-B*15:01	TQSPVPGQY	0.960511	
		HLA-A*68:02	DTYRFVQSV	0.960039	
		HLA-B*15:01	KQYSRHVEEY	0.957377	
		HLA-A*26:01	DVMSYIHSM	0.954823	
		HLA-A*31:01	ATKFKQYSR	0.939233	
		HLA-A*30:02	TQSPVPGQY	0.932066	
		HLA-B*44:02	EEYDLQFIF	0.920265	
		HLA-A*68:02	LTADVMSYI	0.913574	
	HPV 31	KU050142	HLA-B*44:03	EEFDLQFIF	0.963384
			HLA-B*53:01	DPFKDYVFW	0.952197
		HLA-A*11:01	TTFKSSNFK	0.947964	
		HLA-A*68:01	TTFKSSNFK	0.944791	
HPV 33	KU050111	HLA-B*44:03	EEYDLQFVF	0.980299	
		HLA-A*26:01	EVMTYIHAM	0.965746	
		HLA-A*11:01	STYKNENFK	0.942609	
		HLA-B*44:02	EEYDLQFVF	0.940697	
		HLA-B*15:01	TQVTSDSTY	0.932118	
		HLA-B*44:03	KEDPLGKYTF	0.907777	
		HLA-A*68:02	LTAEVMTYI	0.904117	
HPV 58	KU050153	HLA-B*44:03	EEYDLQFVF	0.980299	
		HLA-B*44:02	EEYDLQFVF	0.940697	
		HLA-B*44:03	KEKEDPLNKY	0.927953	
		HLA-A*68:02	LTAEIMTYI	0.925228	
		HLA-A*68:01	YTFWEVNLK	0.921429	

HLA-B*44:02	KEKEDPLNKY	0.90924
HLA-A*26:01	EIMTYIHTM	0.906553

Tabla 4 Predicción de los principales epítomos de los genotipos HPV 16, 18, 31, 33 y 58 frente al MHC II, Se muestran solo los resultados con un score ≥ 0.90 , los epítomos tienen una longitud de 15 mer, el péptido TLEDTYRFVTSQAIA con un score = 0.9859 del genotipo 16. El alelo HLA-DRB1*07:01 está presente en todos los epítomos.

<i>Cepa</i>	<i>GenBank</i>	<i>Alelo</i>	<i>Epitope</i>	<i>Score</i>
HPV 16	KU050166	HLA-DRB1*07:01	TLEDTYRFVTSQAIA	0.9859
		HLA-DRB1*07:01	EDTYRFVTSQAIAACQ	0.9829
		HLA-DRB1*07:01	LEDTYRFVTSQAIAAC	0.9737
		HLA-DRB1*07:01	GTLEDTYRFVTSQAI	0.9500
		HLA-DRB1*01:01	EDTYRFVTSQAIAACQ	0.9408
		HLA-DRB1*07:01	DTYRFVTSQAIAACQK	0.9238
		HLA-DRB1*01:01	TLEDTYRFVTSQAIA	0.9218
HPV 18	KU050134	HLA-DRB1*07:01	SLVDTYRFVQSVAIT	0.9158
		HLA-DRB1*07:01	VDTYRFVQSVAITCQ	0.9002
HPV 31	KU050142	HLA-DRB1*07:01	SLEDTYRFVTSQAIAIT	0.9852
		HLA-DRB1*07:01	EDTYRFVTSQAIAITCQ	0.9818
		HLA-DRB1*07:01	LEDTYRFVTSQAIAITC	0.9722
		HLA-DRB1*07:01	GSLEDTYRFVTSQAI	0.9500
		HLA-DRB1*01:01	EDTYRFVTSQAIAITCQ	0.9287
		HLA-DRB1*07:01	DTYRFVTSQAIAITCQK	0.9193
		HLA-DRB1*01:01	SLEDTYRFVTSQAIAIT	0.9048
HPV 33	KU050111	HLA-DRB1*07:01	SLQDTYRFVTSQAIAIT	0.9842
		HLA-DRB1*07:01	QDTYRFVTSQAIAITCQ	0.9807
		HLA-DRB1*07:01	LQDTYRFVTSQAIAITC	0.9698
		HLA-DRB1*07:01	ASLQDTYRFVTSQAI	0.9452

HPV 58		HLA-DRB1*01:01	QDTYRFVTSQAITCQ	0.9242
		HLA-DRB1*07:01	DTYRFVTSQAITCQK	0.9193
	KU050153	HLA-DRB1*07:01	SLQDTYRFVTSQAIT	0.9842
		HLA-DRB1*07:01	QDTYRFVTSQAITCQ	0.9807
		HLA-DRB1*07:01	LQDTYRFVTSQAITC	0.9698
		HLA-DRB1*07:01	ASLQDTYRFVTSQAI	0.9452
		HLA-DRB1*01:01	QDTYRFVTSQAITCQ	0.9242
		HLA-DRB1*07:01	DTYRFVTSQAITCQK	0.9193

Tabla 5 Predicción de los principales epítomos de los genotipos 16, 18, 31, 33 y 58 frente a linfocitos B Se muestran solo los resultados con un score ≥ 0.75 , los epítomos tienen una longitud de 16 mer, el péptido AITCQKTVPPKEKEDP correspondiente al genotipo HPV 33 con un score = 0.93.

<i>Cepa</i>	<i>GenBank</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Start position</i>	<i>Score</i>
HPV 16	KU050166	AIACQKHTPPAPKEDP	106	0.90
		GGTLEDTYRFVTSQAI	92	0.85
		FVTVVDTTRSTNMSLC	11	0.85
		TSEPTYKNTNFKEYLR	31	0.84
		NGICWGNQLFVTVVDT	2	0.83
		RHGEEYDLQFIFQLCK	46	0.82
		CKITLTADVMSYIHSM	60	0.81
		LCAAISTSEPTYKNTN	25	0.80
HPV 18	KU050134	RHVEEYDLQFIFQLCT	45	0.87
		CASTQSPVPGQYDATK	24	0.87
		AITCQKDAAPAENKDP	105	0.87
		MSYIHSMNSSILEDWN	68	0.83
		AAPAENKDPYDKLKFW	112	0.82

		NSSILEDWNFGVPPPP	75	0.81
<i>HPV 31</i>	KU050142	SADIMTYIHSMNPAIL	54	0.89
		SGSLEDTYRFVTSQAI	81	0.84
		TVVDTTRSTNMSVCAA	2	0.84
		CAAIANSDTTFKSSNF	15	0.84
		AITCQKTAPQPKEDP	95	0.83
		PQPKEDPFKDYVFE	103	0.82
		RSTNMSVCAAIANSDT	8	0.80
<i>HPV 33</i>	KU050111	AITCQKTVPPKEKEDP	107	0.93
		RHVEEYDLQFVQLCK	47	0.86
		TQVTSdstyknENfKE	29	0.86
		FVTVVDTTRSTNMTLC	13	0.85
		TAEVMTYIHAMNPdIL	66	0.84
		NGICWGNQVFVTVVDT	4	0.83
		DWQFGLTPPSASLQD	83	0.82
<i>HPV 58</i>	KU050153	TVVDTTRSTNMTLCTE	12	0.88
		MTLCTEVTKEGTYKND	22	0.87
		RHVEEYDLQFVQLCK	44	0.86
		AITCQKTAPPKEKEDP	104	0.86
		TAEIMTYIHTMDSNIL	63	0.84
		NGICWGNQLFVTVVDT	1	0.83
		DWQFGLTPPSASLQD	80	0.82

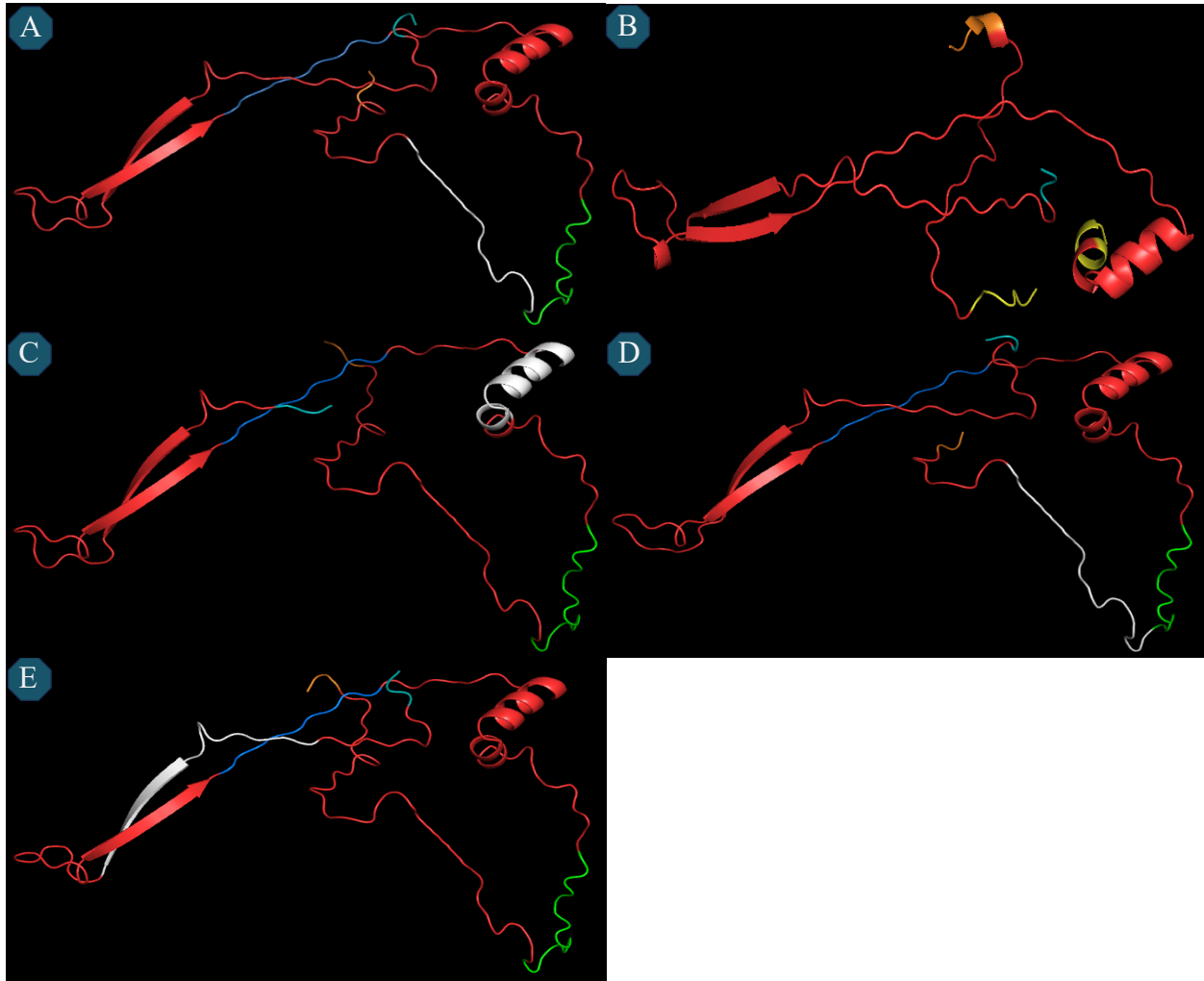


Figura 5. Visualización en 3D de epítomos predichos contra los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33, 58 y 66, En la figura se detalla la visualización en 3D de epítomos predichos contra: A) HPV 16 B) HPV 18 C) HPV 31 D) HPV 33 E) HPV 58. Azul, epítomo reconocido por el MHC I; Verde, epítomo reconocido por el MHC II; Gris epítomo reconocido por los linfocitos B; Amarillo, cadena polipeptídica faltante en el genotipo 18.

Discusión:

Como se detalla en la **Tabla 1**, los genotipos de HPV más descritos son 16, 18, 31, 33, 58 y 66, por lo que una correcta caracterización e identificación de las secuencias obtenidas facilita los estudios epidemiológicos, inmunoterapéuticos y clínicos. El análisis filogenético empleado por (Mejía et al., 2016) clasifica a las secuencias; KP794907 – KP794918 y KP794891 – KP794906 como: genero: Beta-papilomavirus, genotipo: HPV 9, sin embargo, nuestra hipótesis filogenética

muestra a las primeras secuencias como genotipo HPV 58 y a las secuencias restantes como genotipo HPV 16.

Todas las secuencias descritas se clasifican dentro de las 15 especies del género alfa-papilomavirus lo que concuerda con el estudio propuestos por (De Villiers et al., 2004). El genotipo HPV 9 corresponde al género Beta-papilomavirus. Se emplea como grupo externo a *Phocoena spinipinnis papilomavirus* (GenBank: AJ238373) perteneciente al género Omikron-papillomavirus. (De Villiers et al., 2004), sin embargo, no se recuperaron secuencias del genotipo 66 provenientes del país, por lo que no se continuó con la predicción de epítomos inmunoterapéuticos para dicho genotipo.

La implementación en 2014 de las vacunas contra el HPV en el plan nacional de vacunación de Ecuador representó un paso trascendental en la estrategia de salud pública dirigida a combatir esta infección y sus repercusiones. Sin embargo, las decisiones subsecuentes, particularmente la adquisición de 460,000 dosis en 2022 plantea una serie de interrogantes y reflexiones en el marco del objetivo propuesto por la OMS para 2030, el esquema 90-70-90 (Arévalo, 2023).

El descenso notable de la cobertura de vacunación, desde cifras que superaban el 90% antes de 2020 a un 2.73% en 2021, para posteriormente alcanzar un 52.41% en 2022 (International Agency for Research on Cancer., 2023; WHO, 2023), suscita interrogantes sobre las posibles causas de esta drástica reducción. Si bien no se presentan detalles directos sobre las razones de este cambio, es esencial considerar factores socioeconómicos, políticos y logísticos que pudieron haber influido en la eficacia de la implementación.

Por otro lado, los resultados positivos de los informes, como el presentado por Giuliano et al. (Giuliano et al., 2019), que avalan la eficiencia de las vacunas en la prevención de la infección y

las complicaciones asociadas al HPV, contrastan con la prevalencia y mortalidad aún elevadas en contextos de países en desarrollo. Esta paradoja indica que, si bien la vacuna es un recurso crucial, por sí sola no garantiza la erradicación del problema.

Es especialmente revelador que, a casi una década de la inclusión de estas vacunas en el plan nacional, la incidencia del HPV entre 2020 y 2022 continúe siendo alta, y aunque refleje una ligera disminución en comparación con los datos de 2011-2015 (Rosales Villarreal & Araujo Grijalva, 2019), todavía dista de ser la esperada tras una década de intervenciones. Esto refuerza la idea de que la mera disponibilidad de una vacuna no asegura su eficacia a nivel poblacional y resalta la importancia de un enfoque integrado, estratégico en políticas de implementación y seguimiento. La figura 5, con su diseño 3D, resalta las dianas terapéuticas propuestas basadas en secuencias locales, lo que podría potenciar la eficacia del plan de vacunación al considerar péptidos de elevada inmunogenicidad contra el complejo MHC I, II y células B para genotipos relevantes como HPV 16,18,31,33 y 58.

En resumen, la prevalencia de genotipos como HPV 16 y 18 en Ecuador, en línea con datos globales (Bedoya-Pilozo et al., 2018; Brown et al., 2009; International Agency for Research on Cancer., 2023) pone de manifiesto la urgencia de estrategias de intervención que atiendan las especificidades epidemiológicas nacionales.

Uno de los principales objetivos de este estudio fue la predicción de los epítomos inmunoterapéuticos de la proteína L1 de los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 58 las secuencias del gen L1 se obtuvieron de la base de datos del NCBI GenBank. Los linfocitos T y B son las principales células del sistema inmune que estimulan la inmunidad adaptativa ((Fehrmann & Laimins, 2003)). La correcta elección del epítomo; aumenta la posibilidad de generar anticuerpos eficaces;

permite diseñar dianas terapéuticas; intensifica la reacción antígeno anticuerpo en el diseño de las pruebas de screening y diagnósticas.

El epítomo con mayor afinidad por; el alelo HLA-B*44:03 del MCH I del genotipo 16 corresponde al EEYDLQFIF, con un score 0.973715; el alelo HLA-B*07:02 del MHC I del genotipo 18 corresponde al VPPPPTTSL, con un score 0.986735; el alelo HLA-B*44:03 del MCH I del genotipo 31 corresponde al EEFDLQFIF, con un score 0.963384; el alelo HLA-B*44:03 del MCH I del genotipo 33 corresponde al EEYDLQFVF, con un score 0.980299; el alelo HLA-B*44:03 del MCH I del genotipo 58 corresponde al EEYDLQFVF, con un score 0.980299. Estudios como el de (Baidya et al., 2017) indican que los péptidos EEYDLQFIFQLCKITLTA y LPDPNKF, presentan mayor inmunogenicidad frente al alelo HLA-A*02:01 de los genotipos 16 y 18, respectivamente, igualmente, (Kumar et al., 2022), indica; el péptido KYTFWEVNL, presentan mayor inmunogenicidad frente al alelo HLA-A*24:02, del genotipo 16; el péptido TTSLVDTYR, presentan mayor inmunogenicidad frente al alelo HLA-A*68:01, del genotipo 18; indistintamente, (Gupta et al., 2021), indica; el péptido IYNPETQRL del genotipo 18, presentan mayor inmunogenicidad.

El epítomo con mayor afinidad por; el alelo del MCH II del genotipo 16 corresponde al TLEDTYRFVTSQAIA, con un score 0.9859; el alelo HLA-DRB1*07:01 del MCH II del genotipo 18 corresponde al SLVDTYRFVQSVAIT , con un score 0.9158; el alelo HLA-DRB1*07:01 del MCH II del genotipo 31 corresponde al SLEDTYRFVTSQAIT, con un score 0.9852; el alelo HLA-DRB1*07:01 del MCH II del genotipo 33 corresponde al SLQDTYRFVTSQAIT, con un score 0.9842; el alelo HLA-DRB1*07:01 del MCH II del genotipo 58 corresponde al SLQDTYRFVTSQAIT, con un score 0.9842. Estudios como el de (Baidya et al., 2017) indican; los péptidos DLQFIFQLCKITLTA y PETQRLVWAC, presentan mayor inmunogenicidad frente

al alelo HLA-DRB1*15:01 del genotipo 16 y 18, respectivamente, igualmente, (Kumar et al., 2022), indica; el péptido RTNIYYHAGTSRLLA, presentan mayor inmunogenicidad frente al alelo HLA-DRB1*09:01, del genotipo 16; el péptido SIFYHAGSSRLLTVG, presentan mayor inmunogenicidad frente al alelo HLA-DRB1*09:01, del genotipo 18; indistintamente, (Gupta et al., 2021), indica; el péptido PTSIFYHAGSSRLLT del genotipo 18, presentan mayor inmunogenicidad.

El péptido con mayor afinidad por; El genotipo 16 corresponde al AIACQKHTPPAPKEDP, con un score 0.90; El genotipo 18 corresponde al RHVEEYDLQFIFQLCT, con un score 0.87; El genotipo 31 corresponde al SADIMTYIHSMNPAIL, con un score 0.89; El genotipo 33 corresponde al AITCQKTVPPKEKEDP, con un score 0.93; El genotipo 58 corresponde al TVVDTTRSTNMTLCTE, con un score 0.88. Estudios como el de (Kumar et al., 2022), indica el péptido con mayor afinidad por; El genotipo 16 corresponde al CTSICKYPDYIKMVSE, con un score 0.95, El genotipo 18 corresponde al corresponder al KPTIGPRKRSAPSATT, con un score 0.93. Indistintamente, (Gupta et al., 2021), indica el péptido con mayor afinidad por; El genotipo 18 corresponde al corresponder al KPTIGPRKRSAPSATT, con un score 0.93.

Una de las principales limitantes del estudio, fue que no se pudo realizar predicción de epítomos de la región temprana del HPV, es decir, de los oncogenes E5 y E6, diversos estudios los catalogan como posibles dianas terapéuticas en forma de vacunas terapéuticas.

Conclusiones:

A través del análisis de 140 secuencias de aminoácidos, hemos revelado una diversidad filogenética significativa dentro del género Alpha papilomavirus, organizada en 15 clados distintos. Nuestro estudio proporciona una visión detallada y organizada del panorama filogenético de este género,

ofreciendo información valiosa para futuras investigaciones y aplicaciones en el campo de la virología y la salud pública.

Una característica notable en nuestro estudio sobre clados es que ciertos grupos, específicamente los clados 2, 4, 8, 12, 13, 14 y 15, carecen de secuencias de referencia nacional. Esta ausencia podría indicar la necesidad de estudios adicionales o la especificidad geográfica de ciertos linajes del virus. Por otro lado, los clados 1, 3, 5, 6, 7, 10 y 11, que incorporan secuencias nacionales, muestran coherencia filogenética con secuencias reportadas internacionalmente, validando así la fiabilidad de los datos y su relevancia en un contexto global.

Nuestro análisis filogenético ha revelado hallazgos notables con respecto a las secuencias KP794907 – KP794918 y KP794891 – KP794906, inicialmente identificadas bajo el genotipo HPV 9. La hipótesis emergente sugiere que las primeras secuencias están estrechamente relacionadas con el genotipo HPV 58, mientras que las segundas secuencias se alinean con el genotipo HPV 16, sumada a su nula relación con el género Beta-papilomavirus, propone una incorrecta identificación o marcado durante su ingreso a GENBank, de las secuencias de estudio.

Las secuencias KP794907 – KP794918 y KP794891 – KP794906, pertenecientes al genotipo HPV 9, han sido analizadas en nuestra hipótesis filogenética. Esta muestra a las primeras secuencias como genotipo HPV 58 y a las secuencias restantes como genotipo HPV 16. Esta observación podría tener implicaciones significativas en la comprensión de la evolución y la patogenicidad de estos genotipos.

Este análisis filogenético proporciona una base sólida para futuras investigaciones en el género Alpha papilomavirus. La comprensión detallada de las relaciones evolutivas y la identificación de

secuencias específicas pueden guiar intervenciones en salud pública y estrategias de prevención y tratamiento en el ámbito de la virología.

El presente estudio abordó por primera vez un análisis *in silico*, a la predicción de epítomos de la proteína L1 de los genotipos de HPV, 16, 18, 31, 33 y 58. Para aumentar la posibilidad de generar anticuerpos eficaces; permitir diseñar dianas terapéuticas; intensificar la reacción antígeno anticuerpo en el diseño de las pruebas de screening y diagnósticas, es necesario buscar e identificar los péptidos candidatos con mayor respuesta inmune. Tomando en cuenta el papel que juega la proteína L1 durante el ciclo de replicación viral y la respuesta del sistema inmune, la convierte en la candidata idónea.

El estudio se ha centrado en la región tardía, para ser exactos en la proteína L1 encargada de la conformación estructural del virus. Estos objetivos previstos deben validarse aun mas mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

La predicción de epítomos inmunoterapéuticos de la proteína L1 de los genotipos de HPV es esencial en la comprensión de la inmunidad adaptativa que ofrecen contra el virus. Esto se basa en la evidencia existente de que los linfocitos T y B son células primordiales en la estimulación de inmunidad adaptativa, la correcta elección del péptido juega un papel fundamental.

La identificación y elección adecuada de epítomos fortalece el diseño de dianas terapéuticas, potencia la generación de anticuerpos efectivos y optimiza las pruebas de screening y diagnóstico en relación con la reacción antígeno-anticuerpo. Las afinidades observadas para los alelos específicos del MCH I y II en los genotipos de HPV destacados en el estudio indican una potente inmunogenicidad de los epítomos predichos, reflejada en los scores altos.

Los péptidos identificados en este estudio para genotipos específicos de HPV, en relación con su afinidad y los scores obtenidos, muestran diferencias y similitudes con hallazgos de estudios anteriores. Es relevante destacar que, en algunas instancias, los péptidos y sus scores coinciden con trabajos anteriores, mientras que, en otras, las diferencias podrían atribuirse a variaciones metodológicas, poblacionales o técnicas en la obtención de datos.

En la comparación de péptidos con mayor afinidad por genotipos específicos, se observa que, si bien hay coincidencias entre los péptidos identificados en este estudio y otros como el de Kumar y Gupta, también hay diferencias notables en los péptidos y sus scores correspondientes.

El análisis de los resultados de este estudio, en comparación con los de investigaciones previas, subraya la importancia de un enfoque continuo y evolutivo en la identificación y validación de epítomos inmunoterapéuticos de HPV. Las variaciones observadas refuerzan la necesidad de estudios adicionales y la integración de múltiples conjuntos de datos para alcanzar una comprensión más amplia y precisa del panorama inmunológico de los genotipos de HPV.

Este estudio proporciona valiosa información sobre los epítomos inmunoterapéuticos de la proteína L1 de varios genotipos de HPV, lo que puede contribuir significativamente al desarrollo de estrategias terapéuticas y diagnósticas más efectivas contra el virus. La comparación con estudios previos resalta tanto las consistencias como las discrepancias en los datos, sugiriendo rutas para investigaciones futuras en el ámbito de la inmunología del HPV.

Bibliografía

- Adhanom Ghebreyesus, T., & Jakab, Z. (2020). *Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Arévalo, D. (2023, April 17). *La vacunación contra el HPV se enfoca más en niñas de nueve años de edad*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/quito/vacunacion-ninas-hpv-planteles-quito.html>

- Baidya, S., Das, R., Golam Kabir, M., & Arifuzzaman, M. (2017). *Open access Volume 13(3) Hypothesis Epitope design of L1 protein for vaccine production against Human Papilloma Virus types 16 and 18*. <https://www.pymol.org>
- Bedoya-Pilozo, C. H., Medina Magües, L. G., Espinosa-García, M., Sánchez, M., Parrales Valdiviezo, J. V., Molina, D., Ibarra, M. A., Quimis-Ponce, M., España, K., Párraga Macias, K. E., Cajas Flores, N. V., Orlando, S. A., Robalino Penaherrera, J. A., Chedraui, P., Escobar, S., Loja Chango, R. D., Ramirez-Morán, C., Espinoza-Caicedo, J., Sánchez-Giler, S., ... Badano, I. (2018). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human papillomavirus infection in women with cervical lesions and cancer from the coastal region of Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.06.004>
- Brown, C., Leon, M., Muñoz, K., Fagioni, A., Amador, L., Frain, B., Tu, W., Qadadri, B., & Brown, D. (2009). Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 42, Issue 7). www.bjournal.com.br
- Cabrera, J. A., Cárdena, O. J., Campoverde, M. A., & Ortiz, J. I. (2015). Prevalencia de genotipos del papiloma virus humano en mujeres de la provincia del Azuay, Ecuador. In *MASKANA* (Vol. 6, Issue 1).
- Carrión Ordóñez, J. I., Soto Brito, Y., & Pupo Antúnez, M. (2020). Infección por virus del papiloma humano en mujeres del Cantón Cañar, Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. <https://orcid.org/0000-0003-0395-9762>
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019a). Cervical cancer. In *The Lancet* (Vol. 393, Issue 10167, pp. 169–182). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019b). Cervical cancer. In *The Lancet* (Vol. 393, Issue 10167, pp. 169–182). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Crespo, B. V., Neira, V. A., Segarra, J. O., Rengel, R. M., López, D., Orellana, M. P., Gómez, A., Vicuña, M. J., Mejía, J., Benoy, I., Carreño, T. P., & Verhoeven, V. (2022). Role of Self-Sampling for Cervical Cancer Screening: Diagnostic Test Properties of Three Tests for the Diagnosis of HPV in Rural Communities of Cuenca, Ecuador. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph19084619>
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. In *Virology* (Vol. 324, Issue 1, pp. 17–27). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Fehrmann, F., & Laimins, L. A. (2003). Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 33 REV. ISS. 2, pp. 5201–5207). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206554>
- Garbuglia, A. R., Lapa, D., Sias, C., Capobianchi, M. R., & Del Porto, P. (2020). The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00188>

- García Muentes, G. D., García Rodríguez, L. K., Burgos Galarraga, R. I., Almeida Carpio, F., & Ruiz Cabezas, J. C. (2016). Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em amostras de colo do útero de mulheres equatorianas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *19*(1), 160–166. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201600010014>
- Giuliano, A. R., Joura, E. A., Garland, S. M., Huh, W. K., Iversen, O. E., Kjaer, S. K., Ferenczy, A., Kurman, R. J., Ronnett, B. M., Stoler, M. H., Bautista, O. M., Moeller, E., Ritter, M., Shields, C., & Luxembourg, A. (2019). Nine-valent HPV vaccine efficacy against related diseases and definitive therapy: comparison with historic placebo population. *Gynecologic Oncology*, *154*(1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.03.253>
- González-Andrade, F., & Sánchez, D. (2009). HPV genotyping in anogenital abnormal samples of Ecuadorian women. *Cancer Biomarkers*, *5*(4–5), 225–232. <https://doi.org/10.3233/CBM-2009-0107>
- Gupta, B., Kumar, A., & Sridevi, P. (2021). A Comprehensive in Silico Analysis for Identification of Immunotherapeutic Epitopes of HPV-18. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *27*(4), 2717–2726. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10285-x>
- Hoof, I., Peters, B., Sidney, J., Pedersen, L. E., Sette, A., Lund, O., Buus, S., & Nielsen, M. (2009). NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics*, *61*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00251-008-0341-z>
- International Agency for Research on Cancer. (2023, February 3). *Global Observatory of Cancer- GLOBOCAN*. *Cancer Today*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D
- Jurtz, V., Paul, S., Andreatta, M., Marcatili, P., Peters, B., & Nielsen, M. (2017). NetMHCpan-4.0: Improved Peptide–MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *The Journal of Immunology*, *199*(9), 3360–3368. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700893>
- Kumar, A., Sahu, U., Kumari, P., Dixit, A., & Khare, P. (2022). Designing of multi-epitope chimeric vaccine using immunoinformatic platform by targeting oncogenic strain HPV 16 and 18 against cervical cancer. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13442-4>
- Mejía, L., Muñoz, D., Trueba, G., Tinoco, L., & Zapata, S. (2016). Prevalence of human papillomavirus types in cervical cancerous and precancerous lesions of Ecuadorian women. *Journal of Medical Virology*, *88*(1), 144–152. <https://doi.org/10.1002/jmv.24310>
- Muentes, G. D. G., García, M. A. M., Galárraga, R. I. B., Ollague, K., Wachter, C. V., & Cabezas, J. C. R. (2019). Frequency and distribution of hpv genotypes in 800 genital samples of ecuadorian men and women from the city of guayaquil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *61*. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961041>

- Ramos, G. M. D., Cotter, T. G., Ramos, L. F., Torres Floril, V., Martinez, G. A. R., & Ruiz-Cabezas, J. C. (2018). A pilot study on the identification of human papillomavirus genotypes in tongue cancer samples from a single institution in Ecuador. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *51*(11). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187810>
- Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., & Nielsen, M. (2021). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, *48*(W1), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA379>
- Rosales Villarreal, B., & Araujo Grijalva, I. (2019). Epidemiología del cáncer en Quito 2011-2015. *Sociedad de Lucha Contra El Cáncer / Registro Nacional de Tumores*, *16*, 64–68. https://issuu.com/solcaquito/docs/epidemiolog_a_del_c_ncer_en_quito_2011-2015
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *65*(1), 40–48. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>
- Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J., & Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Genital infections due to the human papillomavirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *37*(5), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.010>
- Tornesello, M. L., Buonaguro, L., Izzo, S., Lopez, G., Vega, X., Reyes, C. F. M., & Buonaguro, F. M. (2008). A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from ecuadorian women. *Journal of Medical Virology*, *80*(11), 1959–1965. <https://doi.org/10.1002/jmv.21317>
- WHO. (2023, February 3). *Cervical cancer*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Cervical%20cancer%20is%20the%20fourth,%2Dincome%20countries%20\(1\).](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Cervical%20cancer%20is%20the%20fourth,%2Dincome%20countries%20(1).)
- Zapata, S., Mosquera, J., Mejía, L., Cruz, L., Sánchez, S., García, M., España, K., Campoverde, A., Arcentales, M., Muñoz, M., Ortiz, A., Rivera, A., Santiesteban, Y., & Bedoya, C. (2019). Estudios sobre el virus del papiloma humano y cáncer cervical en el Ecuador. *Revista Científica Digital INSPILIP*. <https://doi.org/10.31790/inspilip.v3i1.70.g76>