



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Identificación de Virus Herpes
simplex (VHS) 1/2, Virus Epstein Barr
(EBV) y Citomegalovirus (CMV) por
PCR punto final en muestras de
exudados cervicales.**

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciatura en Biología

P R E S E N T A

Brandon Valentin Araujo Lucido

DIRECTOR(A) DE TESIS

José Sergio TecpanecatI Xihuitl

CO DIRECTOR (A) DE TESIS

José Antonio Yáñez Santos



Ciudad Universitaria, Puebla, Junio de 2024

AGRADECIMIENTOS

Estoy totalmente agradecido a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su calidad académica y a la Facultad de Ciencias Biológicas por poseer profesores que son buenos en enseñanza y paciencia a través de programas educativos de gran interés.

Al profesor José Sergio TecpanecatI Xihuitl por su indudable apoyo y paciencia que tuvo conmigo, al responder cualquier duda que tenía y responderla con toda amabilidad y paciencia, le agradezco por guiarme en este proyecto de investigación y hacer que me adentre más a estos temas y enseñarme lo que ahora sé. También agradezco a la profesora Elda Carreón Moreno por su gran apoyo y paciencia que me brindo en el estudio y conocimiento ante los problemas que se me presentaban en su momento, y a aquellos consejos que me brindaba para poder realizar el trabajo de manera correctiva.

A mis padres por el gran apoyo que me brindaron en todo momento, al apoyo que recibí por parte de ellos cuando incluso las cosas no iban del todo bien y ver lejos este gran logro, a sus consejos que me brindaron para no dejar atrás todo el trabajo y les agradezco por escuchar y aceptar las decisiones tomadas en este trabajo.

A todos mis amigos de laboratorio que en su momento me apoyaron con algunas actividades y consejos para realizar este proyecto, realmente estoy tan agradecido con todos ellos por darse el espacio de escuchar y de aconsejarme.

ÍNDICE

Resumen	5
1. Introducción	6
2. Antecedentes	9
2.1 Infecciones de transmisión sexual	9
2.2 Los virus	10
2.3 Virus del herpes simple	11
2.3.1 Virus del herpes simple 1	12
2.3.2 Virus del herpes simple 2	13
2.4 Virus de Epstein-Barr	14
2.5 Citomegalovirus	14
2.6 Virus del papiloma humano	15
2.7 Coinfecciones virales en ITS	16
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
5.1 Objetivo general	19
6.2 Objetivos particulares	19
6. Diagrama de trabajo	20
7. Metodología	21
7.1 Extracción de DNA de VHS por lisis celular	21

7.2 Extracción de DNA de EBV y CMV por kit Roche	22
7.3 PCR control de extracción	23
7.4 PCR punto final	23
7.5 Electroforesis en gel de agarosa	24
7.6 Purificación y Secuenciación	25
8. Resultados	26
9. Discusión	37
10. Conclusiones	40
11. Referencias	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso del mecanismo de PCR, 1. Desnaturalización del DNA, 2. Alineamiento de los primers, 3. Elongación de la DNA polimerasa.

Figura 2. Estructura de un virus, cápside, tegumento, envoltura vírica, glicoproteína.

Figura 3. Diagrama de trabajo del procedimiento realizado con técnicas moleculares ejecutadas para la identificación de los herpes virus.

Figura 4. Mecanismo del proceso de PCR β -Globina utilizado en este trabajo. Muestra las temperaturas utilizadas y el número de ciclos para realizar los procesos.

Figura 5. Mecanismo del proceso de PCR multiplex para la detección de VHS 1 / 2, EBV y CMV.

Figura 6. Gel de agarosa al 2% para la identificación de VHS 1 / 2.

Figura 7. Gel de agarosa al 2% para la identificación de EBV.

Figura 8. Gel de agarosa al 2% para la identificación de CMV.

Figura 9. Cromatograma resultado del proceso de secuenciación de VHS 1.

Figura 10. Alineamientos significativos en BLAST de acuerdo con la secuencia de VHS 1 resultado del proceso de secuenciación en formato FASTA.

Figura 11. Cromatograma resultado del proceso de secuenciación de EBV.

Figura 12. Alineamientos significativos en BLAST de acuerdo con la secuencia de EBV resultado del proceso de secuenciación en formato FASTA.

Figura 13. Cromatograma resultado del proceso de secuenciación de CMV.

Figura 14. Alineamientos significativos en BLAST de acuerdo con la secuencia de CMV resultado del proceso de secuenciación en formato FASTA.

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Clasificación de los herpes virus causantes de algunas ITS, abreviatura, grupo y tamaño molecular del genoma. (Jiao *et al.* 2019) (Minaya *et al.* 2019) (Blazquez *et al.* 2021) (Dobbins, *et al.* 2019).

Tabla 2. Reactivos y concentraciones utilizados para el proceso de PCR β -globina. Cantidades para cada muestra realizadas en cada PCR.

Tabla.3 Reactivos y concentraciones utilizados para el proceso de PCR multiplex punto final.

Tabla 4. Secuencia de primers usados para la PCR multiplex punto final de los herpes virus (VHS 1 / 2, EBV, CMV). Tanaka, *et al.* 2009.

Tabla 5. Muestras positivas a CMV con resultados positivos y negativos a VPH, genotipos de alto o bajo riesgo que presentan.

Tabla 6. Muestras positivas a EBV con resultados positivos y negativos a VPH, genotipos de alto o bajo riesgo que presentan.

Gráfico 1. Gráfico circular que representa el número de muestras positivas a VHS del total de 140.

Gráfico 2. Gráfico circular que representa el número de muestras positivas a EBV del total de 140.

Gráfico 3. Gráfico circular que representa el número de muestras positivas a CMV del total de 140.

Gráfico 4. Gráfico circular que representa el número total de las muestras positivas a EBV y CMV, con 7 positivas para CMV, 5 para EBV y ninguna para VHS 1 / 2 sobre 140 muestras de exudados cervicales totales.

Gráfico 5. Gráfico en barra que representa el total de muestras cervicales. 54 muestras negativas a VPH, 86 positivas a VPH sobre el total de 140. De las muestras positivas a VPH, 4 son positivas a EBV, de las negativas 1 es positiva a EBV. De las muestras negativas a VPH, 3 son positivas a CMV y de las positivas 4 son positivas a CMV.

RESUMEN

Uno de los problemas de salud pública a nivel mundial es la enfermedad del herpes. Es causada por el virus del herpes simplex 1 y 2 (VHS 1 / 2), este virus es el responsable de las infecciones en las regiones bucal y genital.

El virus del herpes simplex 1 y 2 es el protagonista de una gran familia de virus de doble cadena de DNA, en donde los virus de Epstein-Barr (EBV) y Citomegalovirus (CMV) se encuentran dentro de esta familia llamada *Herpesviridae*; estos virus son productores de infecciones como mononucleosis infecciosa en el caso de EBV y CMV, entre otras. El virus del papiloma humano (VPH) es un virus perteneciente a la familia de los *Papillomaviridae*, y se caracterizan por su clasificación oncológica de alto y bajo riesgo, este virus es el principal causante de cáncer cervicouterino en mujeres en etapa reproductiva.

El objetivo de este estudio fue analizar la existencia de los virus VHS, EBV y CMV en muestras de exudados cervicales positivas y negativas a VPH. Se utilizaron 140 muestras de exudados cervicales y 2 muestras orales para la identificación de VHS, EBV y CMV tomadas bajo un protocolo de identificación de los virus por parte del laboratorio del Centro de Detección Biomolecular de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La identificación se realizó por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) touchdown con primers específicos para cada virus, se amplificó un fragmento de 292pb para VHS, 229 para EBV y 131 para CMV en un gel de agarosa al 2%.

La existencia de estos virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae*, se pudo observar en un porcentaje muy bajo de muestras, haciendo referencia a solo 12 muestras de 140, en donde, 5 muestras fueron positivas a Epstein-Barr, 7 positivas a Citomegalovirus y ninguna para herpes simplex, algunas de las muestras positivas a dichos virus también eran positivas a virus de papiloma humano.

Palabras clave: Infecciones de transmisión sexual, virus, Herpes simple, Epstein-Barr, Citomegalovirus, Virus del papiloma humano, presencia.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el panorama general de la diversidad sexual y de aquellas prácticas sexuales que se realicen en ella, existen una amplia variedad de infecciones en consecuencia a dichas prácticas, se producen de persona a persona por contacto sexual y se pueden denominar Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 30 bacterias, virus y parásitos diferentes se transmiten por contacto sexual, incluido el coito vaginal, anal o bucal. De los cuales, ocho son los agentes infecciosos vinculados a la máxima incidencia de ITS. Entre ellas, se encuentran la infección por el virus del herpes simplex (VHS) y la infección por el virus del papiloma humano (VPH).

Las ITS logran tener un efecto profundo en la salud sexual y reproductiva en todo el mundo. Según la OMS, se estima que cada día más de un millón de personas contraen una ITS, esto se plantea como una de las cinco principales razones de atención médica en adultos, y se calcula que el número de personas con herpes genital supera los 490 millones en 2016. Además, hay 300 millones de mujeres con infección por el VPH, dicho virus es la principal causa de cáncer de cuello uterino y de cáncer anal entre los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (Viscarra *et al.* 2013).

De todas las infecciones de transmisión sexual, las de mayor importancia en la salud, son inicialmente la infección por el virus del papiloma humano, la infección por el virus del herpes simplex (uno y dos) y la infección por los virus de Epstein Barr y Citomegalovirus. Según estudios previos, las infecciones virales, incluidas las causadas por el VPH, el EBV, el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC), son responsables de 15 al 20 por ciento de los cánceres ginecológicos. Dentro de los virus pertenecientes a la familia de los *Herpesviridae*, el virus de Epstein Barr fue el primer virus reconocido como carcinógeno y se estima que es uno de los virus humanos más comunes (Grabarek *et al.* 2023).

Las ITS se han asociado mucho a sus principales responsables, los virus. Estos agentes etiológicos microscópicos causan lesiones en distintos órganos, pero principalmente en los órganos genitales, ya sean masculinos o femeninos. Su detección en etapas tempranas de la infección es de suma importancia médica y se pueden detectar por varias técnicas moleculares, aunque algunas técnicas de laboratorio a menudo se dificultan por ser reacciones inespecíficas, tener una baja sensibilidad o un trabajo de laboratorio que es meticuloso y requiere de mucho tiempo de proceso (Kosaki *et al.* 2003).

Una técnica molecular usada ampliamente para la identificación de ciertos virus responsables de algunas ITS es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es la técnica ideal para la detección de especies de virus, bacterias y hongos (Victoria *et al.* 2005). Esta metodología se desarrolló inicialmente como una técnica para producir una gran cantidad de un fragmento de ADN específico y se convirtió en una poderosa herramienta para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, con una sensibilidad y especificidad más alta que los métodos tradicionales (Kosaki *et al.* 2003).

El mecanismo de PCR consiste en 3 pasos:

- 1) El DNA de doble cadena se desnaturaliza por calor (desnaturalización), la reacción requiere de una alta temperatura para realizar el proceso de rompimiento de los puentes de hidrogeno que une a las dos hebras del DNA.
- 2) Los primers o cebadores se alinean (hibridación o alineamiento) con las hebras individuales de ADN en un sentido de 5' a 3' para el forward y 3' a 5' para el reverse.
- 3) Los primers se extienden por la DNA polimerasa (elongación) y van tomando bases nitrogenadas para unirlos con la hebra original, de esa manera da como resultado dos copias de la hebra de ADN original, repitiendo todo este proceso durante 45 ciclos y el resultado son miles de copias de DNA (Figura 1).

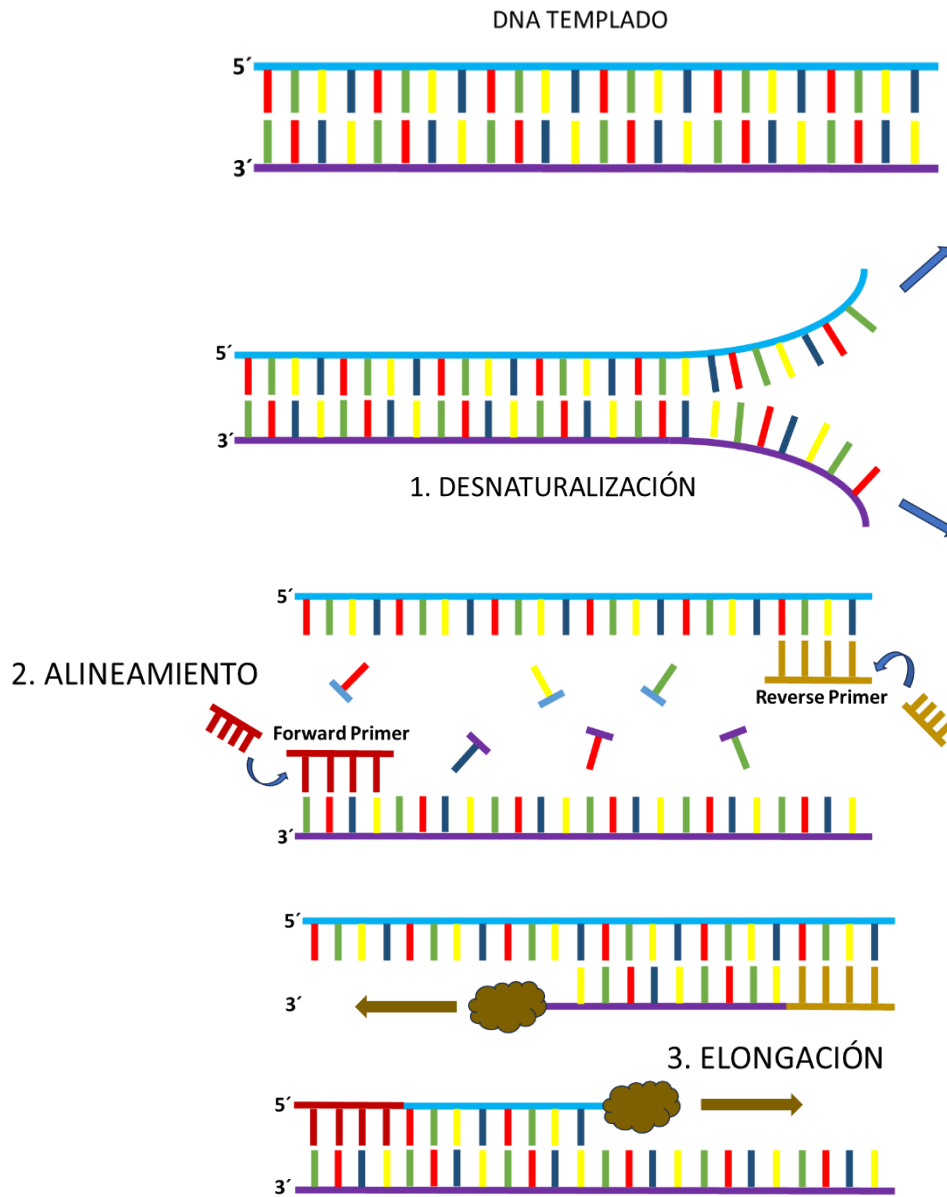


Figura 1. Mecanismo de PCR.

1. Muestra el proceso de desnaturalización, consiste en la separación de las dos hebras de DNA a una alta temperatura. 2. Muestra el proceso de alineamiento de los primers en cada una de las hebras previamente desnaturalizadas. 3. Muestra el proceso de elongación de la DNA polimerasa tomando bases nitrogenadas para sintetizar las copias de DNA. Autoría propia

2. ANTECEDENTES

2.1 INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Las ITS o también llamadas enfermedades de transmisión sexual (ETS) o enfermedades venéreas, comprende una serie de patologías de infección diversa, su transmisión sexual es relevante desde el punto de vista epidemiológico.

Su principal vía de transmisión o la principal fuente de incidencia de las ITS, es debido al contacto con una persona infectada, y es un contacto directo sexual de persona a persona. La evidencia desde el punto de vista epidemiológico sugiere que las infecciones de transmisión sexual tienden a ser similares por los factores de riesgo que se presenten, como es el inicio de una vida sexual activa a una edad temprana, múltiples compañeros sexuales, el escaso uso de algún método preservativo, prácticas sexuales de diversa índole como lo son oral, genital o anal y algunos antecedentes de otra ITS que se presenten en el individuo (Díez *et al.* 2011).

Las mayores infecciones de transmisión sexual son dadas por agentes patógenos como los virus (Escuredo *et al.* 2007). Las manifestaciones más frecuentes de la ITS son locales, en el sistema genitourinario, aunque no son infrecuentes las manifestaciones generales y de otros órganos (Díez *et al.* 2011). Las ITS son las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo, y dichas ITS se asocian mayoritariamente con graves complicaciones de salud en el tracto reproductivo y también están relacionadas a varios tipos de cánceres, entre ellos incluidos los de cuello uterino y anal (Alotaibi *et al.* 2020).

Se estima que el 15 por ciento de todos los cánceres diagnosticados en el mundo están relacionados con los virus y son los virus quienes pueden favorecer la formación de tumores mediante diferentes mecanismos como la modificación del genoma celular o la alteración de la expresión de las proteínas de la célula huésped (Escuredo *et al.* 2007).

2.2 LOS VIRUS

Los virus son agentes infecciosos microscópicos que constan de un segmento de ácido nucleico ya sea DNA o RNA. Estos agentes infecciosos microscópicos solo pueden prosperar y multiplicarse en un hospedero por lo que no pueden replicarse por sí solos. Ellos lo hacen mediante el uso de sus componentes de la célula hospedera para fabricar copias de sí mismo, y dependen completamente del ambiente interno de la célula hospedera para crear nuevas partículas de virus infecciosos o viriones (Louten 2016).

Los virus se componen de un genoma de DNA o RNA que se encuentra en el interior de una cubierta de proteína llamada cápside y algunos virus tienen una envoltura (una capa de membrana). La cápside es una cubierta proteica de diferentes formas, que se compone de muchas proteínas y dichas proteínas están siempre codificadas por el genoma del virus, por lo que es el virus el que proporciona la información para fabricar dichas proteínas y no la célula hospedera (Troconis 2022).

Además de la cápside algunos virus también poseen una membrana lipídica externa que se denomina envoltura, y es esta envoltura que rodea a toda la cápside (Figura 2). Estas envolturas que poseen en su estructura los virus contienen proteínas que el mismo virus determina y que a menudo ayuda a unirse a las células hospederas. Estos dependen de la maquinaria de la célula hospedera para la replicación de su material genético, para lo cual codifican proteínas no estructurales. “Estas oncoproteínas virales tienen como dianas proteínas de la célula hospedera que intervienen en la regulación del ciclo celular, interacción que es esencial para la transformación celular (Escuredo *et al.* 2007)”.

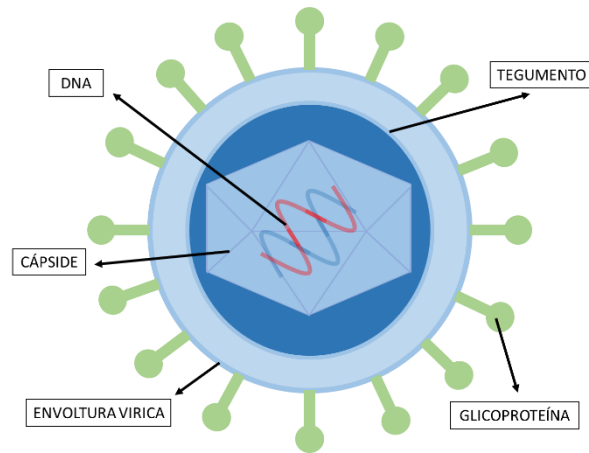


Figura 2. Estructura de un virus que muestra el DNA, la cápside (estructura que envuelve al DNA), el tegumento (unión entre la envoltura vírica y la cápside), envoltura vírica y la glicoproteína. Autoría propia

2.3 VIRUS DEL HERPES SIMPLE

Los virus del herpes pertenecen a una gran familia de virus conocida como *Herpesviridae*, la cual a su vez se divide en tres subfamilias basado en sus propiedades biológicas y sus secuencias genéticas, la subfamilia de los alfa, beta y gamma (Tabla 1). Estos virus están constituidos por una estructura bien definida, son virus de doble cadena de DNA (ácido desoxirribonucleico) que se encuentra encapsulada dentro de una estructura icosaédrica llamada cápside, esta estructura además de proteger el genoma, tiene la función de realizar o permitir la liberación del genoma viral dentro del núcleo de la célula hospedera (Troconis 2022).

A su vez, la cápside es envuelta por una doble capa lipídica llamada envoltorio, el envoltorio se une a la cápside por medio de una estructura denominada tegumento. Esta partícula completa y ensamblada se denomina virión. Dicho envoltorio se encuentra constituido por alrededor de dieciséis proteínas, de las cuales doce son glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, y gN) (Figura 2), su función es ayudar o asistir a la penetración del virus a la célula hospedera.

Debajo del envoltorio está el tegumento, el cual, contiene veintidós proteínas virales y debajo del tegumento yace la cápside icosaédrica que encapsula el genoma del virus del herpes simplex. Los genomas del virus del herpes simplex uno y dos, contienen al menos

setenta y cuatro genes llamados “Marcos de Lectura Abiertos u Open Reading Frames” (ORF), estos genes u ORF codifican las proteínas que forma la cápside, el tegumento y el envoltorio del virus, así como también, controlan la replicación del virus (Troconis 2022).

Dentro de los virus del herpes simplex, los más comunes y asociados a las infecciones de transmisión sexual se encuentran los virus del herpes simplex tipo uno y dos (Viscarra *et al.* 2013).

TIPOS DE HERPES VIRUS				
Herpes virus humanos	Abreviatura	Grupo	Tamaño molecular	Referencia
Herpes simple 1	VHS 1	α	152,476 pb	(Jiao <i>et al.</i> 2019)
Herpes simple 2	VHS 2	α	154,126 pb	(Minaya <i>et al.</i> 2019)
Virus de Epstein Barr	EBV	γ	171,823 pb	(Blazquez <i>et al.</i> 2021)
Citomegalovirus	CMV	β	235,646 pb	(Dobbins, <i>et al.</i> 2019)

Tabla 1. Clasificación de los herpes virus causantes de ITS, abreviatura, grupo al que pertenecen y tamaño molecular del genoma en pares de bases. Autoría propia

2.3.1 VIRUS DEL HERPES SIMPLE 1

El VHS 1 es el principal causante del herpes orolabial o mayor conocido como herpes labial. Es perteneciente a la familia *Herpesviridae* y a su vez a la subfamilia de los *Alphaherpesvirinae*. Este virus es transmitido inicialmente por contacto oral o genital, y se propaga por contacto causando las infecciones en boca, genitales y zonas cercanas a estas. Dicho virus es frecuente debido a que puede llegar a provocar lesiones cutáneas formadas por pequeñas vesículas, llagas y úlceras dolorosas que se encuentran rodeadas de una irritación epitelial de un característico color rojo (M Díez *et al.* 2011). Aunque este virus se propaga por contacto bucal, puede llegar aparecerse en zonas genitales debido a las prácticas sexuales (oral genital) que realicen las personas.

La secuencia completa del genoma del VHS tipo uno, corresponde a 152,476 pares de bases (pb), con un alto contenido de guaninas y citocinas (GC) y que posee algunos ORF (Jiao *et al.* 2019).

2.3.2 VIRUS DEL HERPES SIMPLE 2

El VHS 2 es el principal causante del herpes genital, y facilita la adquisición del virus de inmunodeficiencia humana (Oregon *et al.* 2010). Este virus se encuentra relacionado con infecciones virales del tracto genitourinario y es perteneciente a la familia *Herpesviridae* y a su vez a la subfamilia de los *Alphaherpesvirinae*.

Su principal vía de transmisión es por contacto sexual, aquí se pueden observar las mismas lesiones cutáneas, llagas o úlceras que se presentan con el virus del herpes simplex uno, pero su localización es específicamente en zonas genitales. Sin embargo, en los últimos años se encontró que el VHS tipo uno puede transmitirse por contacto sexual y el herpes tipo 2 o genital también puede transmitirse por contacto oral genital. Esta información indica que la línea entre la infección por VHS tipo uno y dos, se ha vuelto cada vez más difusa y que ambos virus pueden infectar las células epiteliales orales/genitales y de esa manera producir los mismos mecanismos patológicos (Chen *et al.* 2022).

Resumiendo todo esto, el virus se puede propagar en una zona en específico, pero puede presentarse en otras zonas debido a todas aquellas actividades sexuales (genital oral) que se realicen, debido a eso se presenta mayoritariamente en adultos jóvenes (Chen *et al.* 2022). Se estima que más de 500 millones de personas en el mundo están infectados por el VHS-2 y es considerada como una de las ITS más prevalentes en el mundo.

El VHS tipo dos tiene una longitud en la secuencia de su genoma completo de 154,126 pb (Minaya *et al.* 2019).

2.4 VIRUS DE EPSTEIN-BARR

El Virus de Epstein Barr (EBV) o virus del herpes tipo cuatro, es el virus principal causante de la infección por mononucleosis infecciosa o mayormente conocida como la infección del beso. La infección del beso se presenta normalmente en jóvenes y en edad adulta, dicha infección se caracteriza por fiebre, linfadenopatías (inflamación de los ganglios linfáticos), y faringitis (hinchazón de la parte posterior de la garganta (faringe), entre las amígdalas y la laringe) (Bascones & Pousa, 2011).

Este virus es perteneciente a la familia de los *Herpesviridae* y a su vez pertenece a la subfamilia de los *Gammaherpesvirinae*. El EBV se ha podido localizar en secreciones genitales masculinas y femeninas, estas secreciones son una de las principales vías de transmisión del virus, además de la saliva y transfusiones sanguíneas. Es por eso por lo que el plasma seminal puede transmitir el virus y facilitar la replicación de EBV en células del cuello uterino (Viscarra *et al* 2013). Es un virus que ataca principalmente a las células B (linfocitos B) del sistema inmunológico y a las células epiteliales, debido a eso, su sitio de latencia se encuentra en las células B (Troconis 2022).

El genoma completo que corresponde al EBV, es de una longitud de 171,823 pb (Blazquez *et al.* 2021).

2.5 CITOMEGALOVIRUS

El Citomegalovirus (CMV) o virus del herpes tipo cinco, es un virus protagonista de la mononucleosis infecciosa o la infección del beso, dicha infección es transmitida de igual manera que el EBV. Es un virus muy frecuente que entre sus síntomas se encuentran la faringitis (hinchazón de la parte posterior de la garganta (faringe), entre las amígdalas y la laringe), malestar, y linfadenopatías (inflamación de los ganglios linfáticos) (Bascones & Pousa, 2011). Por lo que las células de dicho virus son las células epiteliales y los monocitos (Troconis, 2022).

Es un virus perteneciente a la familia de los *Herpesviridae* y a su vez a la subfamilia de los *Betaherpesvirinae*. Las diversas vías de transmisión de este virus son a través de los fluidos corporales como lo pueden ser la saliva, la actividad sexual, la transferencia placentaria, la lactancia materna, transfusiones de sangre, la orina, el semen y los fluidos vaginales. CMV se encuentra presente en el semen, ya sea de forma continua o por un prolongado periodo de tiempo, un periodo puntual o bien, de forma intermitente (Viscarra *et al.* 2013).

Además, se encuentra presente tanto en secreciones genitales como en glándulas salivales como se ha mencionado anteriormente, pero aún no se determina la vía preferida

para la infección. Sin embargo, frecuentemente el CMV se encuentra en el moco cervical de mujeres lo que hace posible la transmisión del virus a través del contacto sexual. (Viscarra *et al.* 2013).

El genoma de CMV es uno de los genomas más grandes de los virus patógenos, corresponde alrededor de 235,646 pb con más de 200 ORF (Dobbins, *et al.* 2019).

2.6 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de DNA pequeño, sin envoltura, es un virus perteneciente a la familia de los *Papillomaviridae*. Este virus es el principal responsable de la generación de cáncer de cuello cervicouterino en las mujeres, y es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente, debido a esto es una de las infecciones más importantes a nivel mundial por la población, presentando una gran morbimortalidad en mujeres que se encuentran en su etapa reproductiva ubicándose entre el tercer y cuarta posición en incidencias y mortalidad por el cáncer cervicouterino (Atencio T., R. *et al.* 2013).

A pesar del papel bien establecido del VPH en el cáncer de cuello uterino, nuevas líneas de evidencia sugieren que el VPH también puede ser un factor de riesgo independiente para el cáncer oral, y la coinfección con otras ITS que podría aumentar el riesgo de desarrollo de este. (Mosmann *et al.* 2019).

El virus del papiloma humano se puede clasificar de acuerdo con su patogenicidad oncológica de alto y bajo riesgo, los VPH de bajo riesgo, como principal patógeno de las verrugas genitales benignas, no suelen asociarse a ninguna otra neoplasia (masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido) que puede o no ser cancerosas, los genotipos VPH de bajo riesgo son: 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 66, 70 y 74 (Mofrad *et al.* 2021).

Los genotipos de VPH de alto riesgo, denominados así por su carcinogenicidad (conjunto de procesos por lo que una célula se convierte en tumoral maligna y causa cáncer), se ha asociado a lesiones intraepiteliales cervicales y comprenden a los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 (Alotaibi *et al.* 2020).

2.7 COINFECCIONES VIRALES EN ITS

Dado que las ITS desempeñan un papel importante como cofactor en el desarrollo de la displasia cervical (crecimiento anormal de células en la superficie del cuello uterino) y que pueden dar lugar a complicaciones graves del aparato reproductor, por ejemplo, una infección de transmisión sexual puede facilitar la entrada de múltiples genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano, y a su vez disminuir la inmunidad de la célula huésped para combatir y resolver la infección por dicho virus (Alotaibi *et al.* 2020).

De acuerdo con la información que se tiene a la fecha, la presencia del virus del papiloma humano es importante pero no suficiente para causar cáncer de cuello uterino, la persistencia de la infección de este virus desempeña un papel importante en el desarrollo de cáncer (Alotaibi *et al.* 2020).

Es bien conocido que el origen y el desarrollo de las lesiones premalignas y malignas en el caso del cáncer de cuello uterino es multifactorial. El factor más importante es el VPH, en especial los genotipos de alto riesgo como los tipos 16 y 18 (VPH-AR) pero otros factores de riesgo han sido identificados en múltiples estudios como lo son: número de parejas sexuales, inicio de relaciones sexuales a edades tempranas, pareja sexual con múltiples parejas, uso de anticonceptivos por largo tiempo, infecciones vaginales de diferente origen etiológico (virus, bacterias, hongos, parásitos), patologías inmunosupresivas tales como infección por VIH, inflamación crónica debido a infecciones producidas por *Chlamydia trachomatis*, virus del herpes simplex tipo 1 y 2, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Gardnerella vaginalis* (Mosmann *et al.* 2019).

Estudios recientes han demostrado que el cáncer cervical invasivo de la mujer es causado por cepas oncológicas del VPH (Atencio *et al.* 2013), por otro lado, estudios del virus del herpes simplex VHS han sido de especial importancia en las mujeres por que se ha encontrado que podría estar implicado en el cáncer de cuello uterino cuando se encuentra presente en combinación con el VPH, debido a que en un mismo individuo puede coincidir más de una infección de transmisión sexual debido a que pueden compartir el mismo mecanismo de transmisión y es ahí donde favorecen la transmisión de otras enfermedades con la producción de lesiones vesiculares, ulcerativas orales y genitales que son producidas

por los VSH tipo uno y dos, o alteraciones que comprometen la inmunidad individual producida por citomegalovirus (CMV), y entre otros cánceres en donde son responsables los virus de Epstein-Barr y el virus del sarcoma de Kaposi. (Troconis. 2022).

Hay muchos cofactores que contribuyen a que el virus se convierta en una infección persistente, y en esta lista se incluye la coinfección con dos o más patógenos que pueden ser un cofactor importante para el inicio y/o la progresión del riesgo de padecer una neoplasia cervical. En muchos estudios se describió la asociación entre las infecciones de transmisión sexual y las anomalías cervicales, como lo es la infección por el virus del herpes simple, que se ha descrito junto a la infección por el virus del papiloma humano, y lo que posiblemente aumenta el riesgo de cáncer de cuello uterino (Alotaibi *et al.* 2020). Uno de estos grupos de virus que desempeñan un papel importante en la fisiopatología humana es la familia *Herpesviridae* que lo integran los virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (EBV), y citomegalovirus (CMV) (Dworzański *et al.* 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los agentes patógenos que integran el grupo de infecciones de transmisión sexual, los virus son los agentes causales responsables de algunas de las infecciones de mayor importancia a nivel mundial para la población, su presencia junto con la de otros virus puede ser uno más de los factores desencadenantes para la progresión de la infección de transmisión sexual a etapas en donde pueden llegar a conducir a un crecimiento excesivo de células epiteliales y de esa manera desencadenar algún tipo de cáncer.

Algunos de los virus que se sabe pueden desempeñar un papel en la generación de cáncer son los virus que pertenecen a la familia *Herpesviridae*; específicamente el virus de Epstein Barr se sabe que causa mononucleosis infecciosa y puede estar relacionado con ciertos tipos de cáncer nasofaríngeo, linfoma de Burkitt y linfoma de Hodgkin. El citomegalovirus, aunque no se ha relacionado con la generación de alguna neoplasia si está involucrado con la generación de un tipo de mononucleosis infecciosa en adolescentes, adultos y mujeres embarazadas en donde puede provocar síntomas que van desde leves hasta graves que pueden causar la muerte en personas inmunocomprometidas o en el caso de las mujeres embarazadas donde se pueden producir abortos espontáneos o muerte fetal.

El virus herpes simplex 1 es un agente muy bien conocido por su presencia en zonas bucales provocando ampollas en estas zona; el virus herpes simplex 2 es un agente importante de transmisión sexual, sin embargo, debido a las diferentes prácticas sexuales se pueden identificar ambos virus tanto en zonas bucales como genitales. Por último, el virus del papiloma humano (VPH) y aunque está bien establecido su papel en el desarrollo de cáncer cervical creemos que la presencia de más de un agente infeccioso puedan ser un factor determinante para el inicio o desarrollo de la enfermedad.

Se ha cuestionado mucho si la posible co-presencia de ambas familias de virus puede llegar a conducir a cáncer de cuello uterino, aunque algunos estudios indican que hay una mínima probabilidad de desarrollar cáncer, existen otros estudios que afirman lo contrario, debido a esta información aún no es claro en este tema y queda mucho por investigar; es por esto que se hace necesario conocer la prevalencia de estos herpesvirus en muestras positivas y negativas a VPH, ya que la coinfección por dos especies de virus patógenos se ve implicado en la duplicación del riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer.

Es importante desarrollar estrategias de identificación durante las primeras etapas de la enfermedad resultante de infecciones virales, como lo son campañas de prevención, campañas de información dirigida a la población mas vulnerable, siendo la población joven. Campañas de detección de algunos virus causantes de las infecciones de transmisión sexual entre la población joven.

4. HIPOTESIS

La técnica de PCR punto final nos permitirá identificar la prevalencia de los virus: Epstein-Barr, Citomegalovirus, Herpes simplex 1 y 2 en muestras de exudados cervicales positivos y negativos a virus de papiloma humano (VPH).

5. OBJETIVOS

5.1 GENERALES:

Estandarizar la técnica de PCR punto final para detectar la presencia de 3 virus de la familia de los herpes virus (VHS 1/2, EBV, CMV) en muestras de exudados cervicales.

5.2 PARTICULARES:

-Estandarizar la técnica de PCR multiplex punto final en un solo tubo para la identificación de los virus VHS 1/2, EBV y CMV.

-Determinar la frecuencia de los virus VHS 1/2, EBV y CMV en muestras cervicales positivas a virus del papiloma humano (VPH).

-Determinar la frecuencia de los virus VHS 1/2, EBV y CMV en muestras cervicales negativas a virus del papiloma humano (VPH).

-Analizar la frecuencia de los virus VHS 1/2, EBV, CMV en el total de muestras de exudados cervicales analizados.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO

El procedimiento empleado en el presente trabajo es presentado en la figura 3. Todo el procedimiento y las técnicas moleculares empleadas se realizaron dentro del laboratorio de Detección Biomolecular de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Desde la toma de muestra cervical, extracción de ácidos nucleicos hasta el proceso de identificación de los virus por PCR

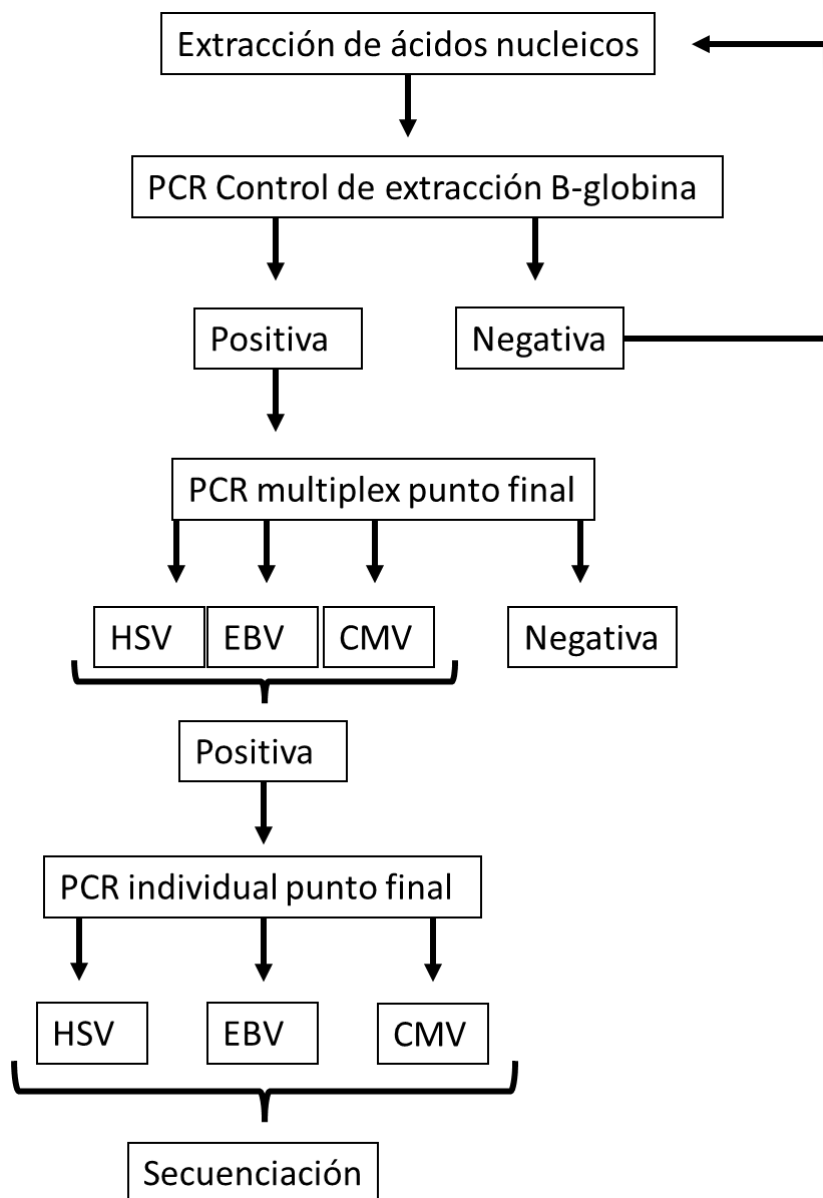


Figura 3. Diagrama de trabajo con respecto al procedimiento realizado con técnicas moleculares ejecutadas en un orden para la identificación de los herpes virus, que va desde la extracción de ácidos nucleicos hasta el proceso de secuenciación.

7. METODOLOGÍA

Se trata de un estudio experimental el cual se le realizó a una población de pacientes del sexo femenino, las muestras usadas fueron muestras de exudados cervicales que se tomaron previamente bajo un protocolo de diagnóstico y con una carta de consentimiento establecido en el laboratorio del Centro de Detección Biomolecular de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En dicho estudio se obtuvieron 140 muestras de exudados cervicales y 2 muestras orales, las cuales acudieron al laboratorio del Centro de detección biomolecular a realizarse el estudio de VPH.

Siendo los criterios de inclusión a aquella población mayores de edad del sexo femenino dentro de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los criterios de exclusión a aquella población menores de edad del sexo femenino que no pertenezcan a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

A dichas muestras se le realizó la extracción de ADN mediante el **kit “High Pure PCR Template”** de Roche. Para hacer más eficiente el proceso y obtener mayor cantidad de ácidos nucleicos (ADN) de las muestras de exudado cervical, éstas se centrifugaron a 14'000 rpm durante 15-20 minutos antes de empezar la extracción con las correspondientes instrucciones del kit. Al término de la extracción, las muestras de ADN son cuantificadas para saber la concentración y grado de pureza de ADN a través de un nanofotómetro con 1µL de ADN extraído. Posteriormente para corroborar la integridad del ADN de estas muestras se realizó la amplificación por PCR punto final con oligonucleótidos específicos para el gen endógeno β -globina.

Al finalizar las reacciones de amplificación, se cargaron en un gel de agarosa al 2% esperando observar una banda de 268pb que corresponde al gen endógeno β -globina. Para que las muestras pudieran ser visualizadas en el fotodocumentador, estas previamente se cargaron en el gel de agarosa al 2%, mezcladas con 1µL de buffer de carga 1X (buffer de azul de bromofenol y Xylene Cyanol) y posteriormente el gel se introdujo en bromuro de etidio (0.5 mg/L) durante 5-10 minutos aproximadamente. Para poder referenciar las bandas, se cargaron en un pozo del gel con 2µL del marcador de peso molecular GeneRuler™. Las muestras que no presentaban el amplificado esperado, eran procesadas nuevamente desde la extracción del ADN, mientras que las que sí amplificaban se preparaban para la reacción con los oligonucleótidos específicos de la detección de los virus VHS 1 / 2, EBV y CMV.

Una vez terminada la investigación, 6 muestras positivas a estos virus se sometieron a un proceso de secuenciación para confirmar que los fragmentos obtenidos de la amplificación correspondían al virus de nuestro interés. En este proceso se realizó una extracción y purificación de fragmento en gel de agarosa. Para ello se realizaron nuevamente las reacciones de amplificación en volumen de 25µL con los mismos elementos y condiciones de amplificación descritos para cada virus. El gel de agarosa utilizado para purificar los fragmentos obtenidos fue del 0.7%, teñidas únicamente 20 segundos en BEt (Bromuro de etidio) y visualizadas en fotodocumentador donde fueron cortadas las bandas y posteriormente ser pesadas en tubos eppendorf de 1.5 µl y continuar con el protocolo de extracción y purificación de banda según el kit de “**Agarose Gel DNA Extraction de Zymo spin**”.

Los fragmentos purificados fueron preparados con su primer correspondiente para enviarlas al proceso de secuenciación. Finalmente, las secuencias arrojadas por dicho proceso se realizó un alineamiento en base de datos de BLAST para confirmar su identidad.

Extracción de DNA de VHS por lisis celular

En el proceso de extracción de DNA del VHS se siguió por el proceso de lisis. Este proceso consiste en romper partes de la pared celular o célula completa para liberar moléculas biológicas como al DNA.

En tubos Eppendorf de 1.5 microlitros se colocó 1 mililitro de muestra tomada previamente, el tubo se llevó a una centrifuga para que el tubo sea centrifugado a 14,000 revoluciones por un periodo de tiempo de 6 minutos. En cuanto el proceso de centrifugación terminó, se desechó el líquido que restaba en el tubo y solo se dejó la pastilla para consiguiente añadir 30 microlitros de agua tridestilada. El tubo que contenía todo, se incubó en un termomixer a 95°C por un periodo de tiempo de 5 minutos con una agitación de 800 revoluciones por minuto, una vez terminado el lisado, se llevó nuevamente a un proceso de centrifugación de 14,000 revoluciones por 6 minutos. Una vez terminado el proceso de extracción de DNA, checamos la concentración de DNA de dicha muestra en un espectrofotómetro para volúmenes pequeños.

7.1 Extracción de DNA de EBV y CMV por kit Roche

Para la extracción del DNA de EBV y CMV se siguió el proceso del fabricante Roche High Pure PCR Template Preparation Kit.

En tubos Eppendorf de 1.5 microlitros se añadió 200 microlitros del reactivo binding buffer, 40 microlitros de proteinasa K y 200 microlitros de la muestra previamente tomada, el tubo lo llevamos a un Vortex para homogeneizar la muestra y los reactivos. Una vez homogenizada se colocó el tubo en el termomixer a 70°C por un tiempo de 10 minutos con lo mínimo de revoluciones de agitación (300 revoluciones por minuto), después del termomixer se agregó 100 microlitros de isopropanol para después nuevamente homogenizar en el Vortex.

Todo lo añadido en el tubo (540 microlitros) se transfirió a un tubo con filtro y así de esa manera se llevó a centrifugar a 12,000 revoluciones por 1 minuto, una vez que terminó el proceso de centrifugación eliminamos el líquido resultante del proceso y lo desechamos junto con el tubo para usar un nuevo tubo, pero sin desechar el filtro. En el filtro con un tubo nuevo, se añadió 500 microlitros de removedor de inhibidores y lo llevamos a un proceso de centrifugación de 12,000 revoluciones por 1 minuto, para nuevamente eliminar el líquido resultante del proceso y el tubo.

Usando un nuevo tubo y el mismo filtro, se añadió 500 microlitros de buffer de lavado para llevarlo a un proceso de centrifugación de 12,000 revoluciones por un minuto, una vez terminado el proceso, se desechó el líquido que resultó de la centrifugación, este proceso se repitió una vez más, pero con el mismo tubo. Para poder eliminar residuos que hayan quedado del isopropanol o de los reactivos que añadimos, tuvimos que llevar a centrifugar sin añadir nada, solo el filtro y el tubo a una centrifugación de 14,000 revoluciones por 30 segundos.

El tubo con filtro que ya lo habíamos centrifugado y que contiene como resultado los ácidos nucleicos, lo colocamos en un tubo Eppendorf de 1.5 microlitros y se añadió 60 microlitros de buffer de elusión que previamente se puso a calentar a 70°C en el termoblock con lo mínimo de revoluciones por minuto (300rpm). Lo dejamos reposar por 1 minuto y lo llevamos a un proceso de centrifugación de 12,000 revoluciones por 1 minuto. Una vez

terminado el proceso de extracción de DNA, checamos la concentración de DNA de dicha muestra en un nanofotómetro.

7.2 PCR control de extracción

La PCR control de extracción es realizada para validar que la extracción de ácidos nucleicos se haya elaborado de una manera correcta. Es un proceso que su resultado se puede analizar en un gel de agarosa al 2%, en el cual se observa la amplificación de un fragmento de 268pb y corresponde al gen de la β -globina con los oligonucleótidos correspondientes a este proceso de acuerdo con Talmaci *et al.* 2004.

Este procedimiento se realizó en todas las muestras de exudados cervicales y orales usadas para la detección de los 3 tipos de virus (VHS 1 / 2, EBV, CMV). Verificamos mediante esta técnica molecular que el proceso de extracción de ácidos nucleicos fuese correcto y no se presentaran falsos negativos por la ausencia de ácidos nucleicos.

La reacción contenía:

Reacción PCR β -Globina	
H ₂ O	16.1 μ L
Máster Mix	3.9 μ L
Primer Forward	1.25 μ L
Primer Reverse	1.25 μ L
Templado	2.5 μ L
Volumen final	25 μ L

Tabla 2. Reactivos y cantidades utilizados para el proceso de PCR β -globina. Cantidades para cada muestra realizadas en cada PCR.

Autoría propia.

Bajo las condiciones del termociclador indicadas a continuación.

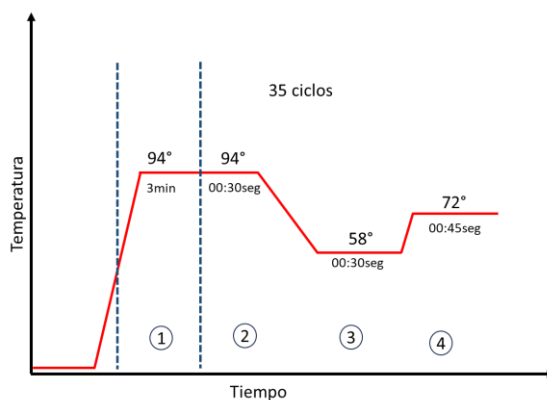


Figura 4: Figura que representa el proceso de PCR β -Globina utilizado en este trabajo. Muestra las temperaturas utilizadas y el número de ciclos para realizar los procesos. Autoría propia.

7.4 PCR multiplex punto final

Los primers utilizados para la detección de VHS 1 / 2, EBV y CMV fue una mezcla de primers específicos para cada virus. Cada producto de amplificación esperado en el gel de agarosa fue de: un fragmento de 292pb para VHS 1 / 2, cuyos primers se unen a una zona específica del genoma completo de dicho virus, que es referente a un gen llamado como UL30, codificante para una DNA polimerasa de la familia B.

Para EBV es un fragmento de 229pb, en una zona de unión de los primers que corresponde a un gen llamado UBALF5. El gen UBALF5 sintetiza para una DNA polimerasa de la familia tipo B.

Y con respecto a CMV es de un fragmento de 131pb, cuyo sitio de unión de los primers corresponde a un gen llamado UL54 dentro de la zona del genoma de CMV. Dicho gen sintetiza para la misma proteína DNA polimerasa de la familia tipo B que los demás herpes virus.

Las reacciones de PCR multiplex punto final se realizaron en un volumen final de 25 μ l con un volumen de 4.2 μ l para H₂O, 12.5 μ l de Master Mix, 0.8 μ l de cebador forward, 0.8 μ l de cebador reverse y 6.7 μ l de DNA (Tabla 3).

Reacción de PCR		
Reactivo	1x	14x
H2O	4.2	58.8
Master Mix	12.5	175
Forward	0.8	11.2
Reverse	0.8	11.2
Templado (DNA)	6.7	6.7 c/tubo
Volumen final	25 µl	

Tabla 3. Reactivos y cantidades utilizados para el proceso de PCR multiplex punto final. Cantidades para una y 14 muestras realizadas en cada PCR multiplex punto final. Autoría propia.

La secuencia de los primers forward y reverse usados para la PCR multiplex punto final de este trabajo se representan en la tabla 4.

Virus	Secuencia (5' - 3')	Tamaño de producto esperado
VHS 1 / 2	F: GCCAAGAAAAAGTACATCGGCGTCATC R: TGAGGACAAAGTCCTGGATGTCCCTCT	292pb
EBV	F: CTTAGAATGGTGGCCGGGCTGTAATAAT R: ATCCAGTACGTCTTTGTGGAGCCCAAG	229pb
CMV	F: GCGCGTACCGTTGAAAGAAAAGCATAA R: TGGGCACTCGGGTCTTCATCTCTTTAC	131pb

Tabla 4. Secuencia de primers usados para la PCR multiplex punto final de los herpes virus (VHS 1 / 2, EBV, CMV) Autor: Tanaka, et al. 2009.

Como control negativo de templado (NTC) se usó agua y para control positivo de VHS 1/2 se usó una muestra de lesión bucal que resultó positiva con anterioridad a VHS tipo uno. Para control positivo a EBV y CMV se utilizaron muestras positivas a estos virus que ya se tenían con anterioridad de otros estudios realizados.

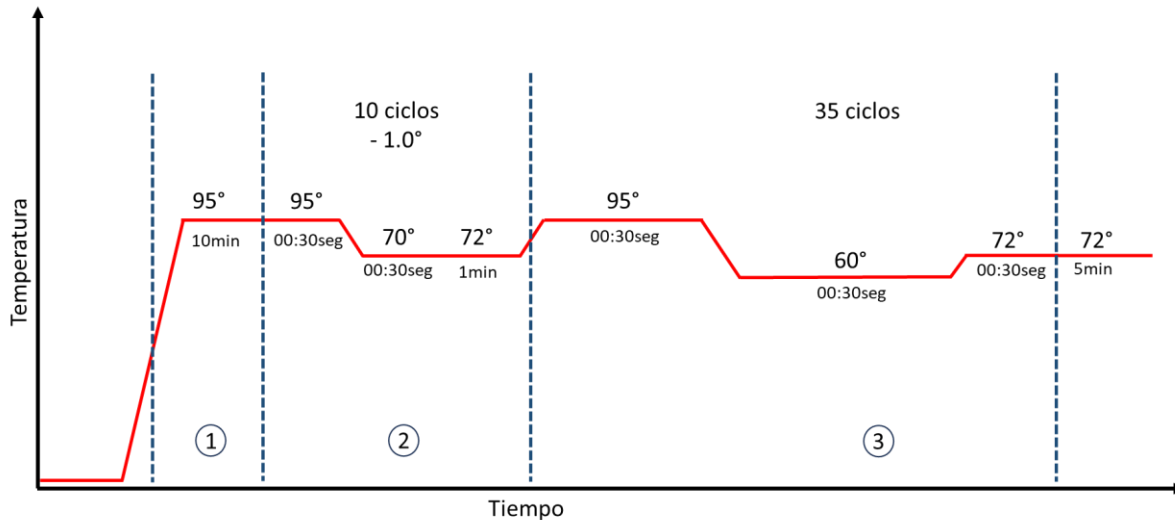


Figura 5: Figura que representa el proceso de PCR utilizado en este trabajo. Muestra las temperaturas utilizadas y el número de ciclos para realizar los procesos. Autoría propia.

Los pasos para el proceso de PCR se realizaron en un termociclador marca Labnet. El primer paso corresponde al proceso de desnaturalización el cual fue a una temperatura de 95° por un tiempo de 10 minutos, es realizado para separar las dos hebras del DNA. El segundo paso corresponde al alineamiento de los primers utilizados en la PCR, los primers se alinean en una zona específica del DNA y es llevado a cabo a una temperatura de 70° inicialmente; en cada ciclo va disminuyendo 1 C° hasta llegar a 60 C° la cual es la temperatura de alineamiento que se usa por 35 ciclos más. El tercer paso corresponde al proceso de elongación, aquí la DNA polimerasa se une a la zona específica del DNA en donde se unieron los primers y empieza a sintetizar una nueva hebra complementaria de la cadena molde, este proceso es realizado por 35 ciclos para sintetizar miles de copias y tener una mejor visualización del DNA para procesos posteriores de dicho fragmento que queremos analizar. (Figura 5.)

7.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar el proceso de la PCR multiplex punto final se realizó un gel de agarosa a una concentración del 2%. Los fragmentos obtenidos resultado de la PCR multiplex punto final se colocaron en un gel de agarosa al 2% en cámara de electroforesis Thermo Scientific Owl. La cámara de electroforesis en conjunto con el gel y las muestras se situaron a una corriente

eléctrica de 75 volts y al terminar este proceso el gel se puso a teñir en bromuro de etidio con un tiempo de exposición de 10 minutos.

Para visualizar los resultados de la electroforesis, el gel se lavó con agua tridestilada y se colocó en un foto documentador Carestream Gel Logic 212 Pro.

7.6 Purificación y Secuenciación

De las muestras totales que resultaron positivas a los virus de VHS 1, EBV y CMV en el gel de agarosa al 2%, los fragmentos de la PCR multiplex punto final se enviaron a secuenciar y de esa manera verificar que las bandas enviadas a este proceso pertenecen a los herpes virus.

Se extrajo el fragmento de DNA amplificado del gel de agarosa con un bisturí y se transfirió a un microtubo de 1.5 μ l. En el microtubo añadimos 200 μ l de ADB. Consecutivamente transferimos el gel de agarosa derretido a una columna de Zymo-Spin para centrifugarlo con un periodo de tiempo de 60 segundos a 12,000 revoluciones y al finalizar la centrifugación desechamos el flujo líquido de la columna.

Después de ese proceso añadimos 200 μ l de buffer de lavado para centrifugar nuevamente por un periodo de tiempo de 30 segundos a 12,000 revoluciones. Desechamos el flujo líquido de la columna y repetimos una vez más el proceso de lavado.

Finalmente añadimos 50 μ l de buffer de elusión a la columna que previamente fue centrifugada y la colocamos en un microtubo de 1.5 μ l. De esa manera lo centrifugamos para obtener el DNA durante un periodo de tiempo de 30 segundos a 14,000 revoluciones.

Terminado el proceso de purificación los fragmentos amplificados se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología De la UNAM. Como resultado del proceso de secuenciación se observó la secuencia de los cromatogramas y se subió a la página del BLAST. Esto se realizó para comparar la secuencia que se obtuvo de la secuenciación con las existentes en la base de datos y poder confirmar que corresponden a la familia de los herpes virus.

8. RESULTADOS

Todas las muestras, al ser procesadas por primera o segunda vez, amplificaron el gen endógeno β -Globina (control interno de extracción) observándose en todas la muestras un producto de amplificación de 268 pb.

De acuerdo con la PCR multiplex punto final para la identificación de los virus, la amplificación de los fragmentos se visualizó en geles de agarosa al 2%, del total de 140 muestras de exudados ninguna amplificó para el virus del herpes simplex 1/2, a excepción del control positivo a VHS tipo uno, resultado que se observa mediante el siguiente gráfico 1 y la figura 6.

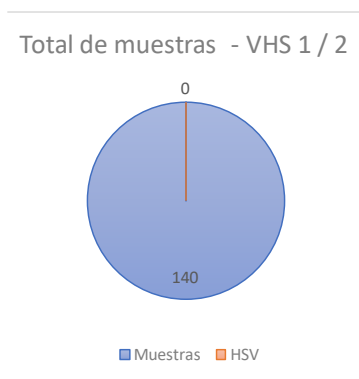


Gráfico 1: Gráfico circular que representa el número de muestras positivas a VHS del total de 140.

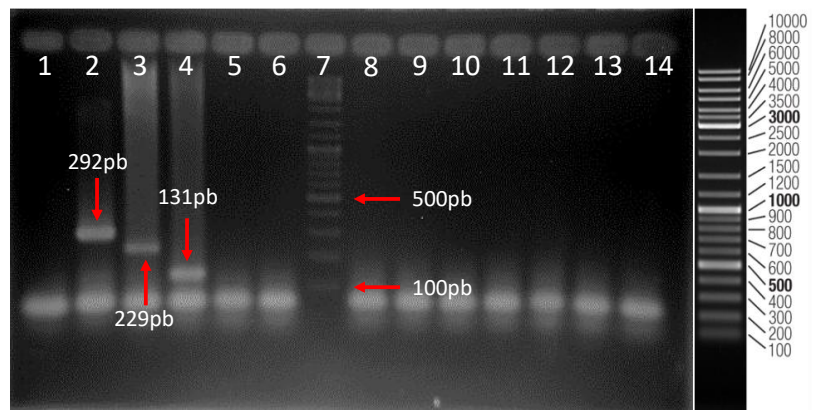


Figura 6: Gel de agarosa al 2% para VHS 1 / 2. 1: NTC, 2: CP VHS 1, 3: CP EBV, 4: CP CMV, 5: Mx 076/23, 6: Mx 080/23, 7: MPM, 8: Mx 083/23, 9: Mx 084/23, 9: Mx 084/23, 10: Mx 085/23, 11: Mx 087/23, 12: Mx 089/23, 13: Mx 097/23, 14: Mx 063/23

En el gel de agarosa al 2% podemos observar que hay varias bandas de los controles positivos (CP), en el carril 2 pertenece a VHS tipo 1 que corresponde a 292pb, el carril 3 a EBV que corresponde de 229pb y el carril 4 para CMV con un fragmento de 131pb, los controles se encuentran seguido del control negativo de templado (NTC carril 1). Para los siguientes carriles del gel, tomamos en cuenta algunas muestras de exudados cervicales que se les realizó una PCR multiplex punto final y de esa manera observar si había alguna banda de 131pb, 229pb o 292pb que correspondiera a VHS tipo 1/2, EBV o CMV, respectivamente. Por lo que se pudo analizar, ninguna muestra mostró una banda de 131pb, 229pb o 292pb que indicara si las muestras fueron positivas a VHS tipo 1/2, EBV y CMV. Con respecto en

el carril 7 de la imagen del gel, se observa el marcador de peso molecular (MPM) utilizado para este proceso, que entre cada banda corresponde a un fragmente de 100pb.

Con respecto a los resultados de las 140 muestras de exudados cervicales y a la amplificación del virus EBV se obtuvo lo siguiente: 5 de estas muestras resultaron positivas al virus de Epstein-Barr con un porcentaje que corresponde al 5.4% de muestras positivas a dicho virus, y se puede observar en el gráfico 2 y figura 7.

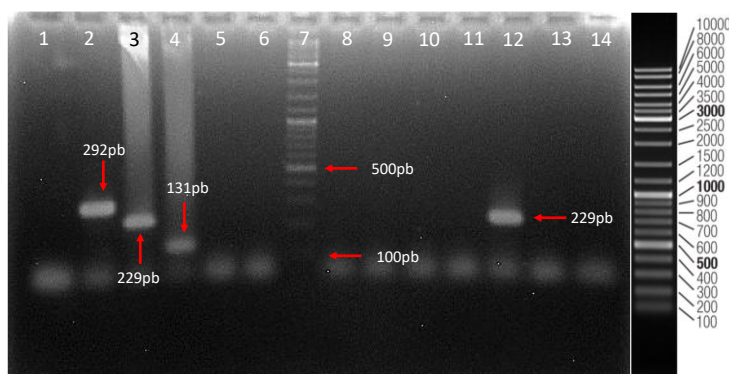
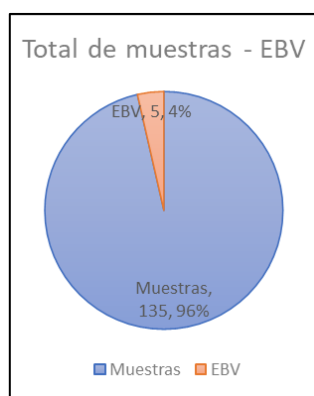


Gráfico 2: Gráfico circular que representa el número de muestras positivas a EBV (5), con un porcentaje de (5.4%) muestras sobre el total de 140.

Figura 7: Gel de agarosa al 2% para EBV. 1: NTC, 2: CP VHS 1, 3: CP EBV, 4: CP CMV, 5: Mx 025/23, 6: Mx 026/23, 7: Mx MPM, 8: Mx 027/23, 9: Mx 032/23, 10: Mx 033/23, 11: Mx 053/23, 12: Mx '6'/23, 13: Mx 061/23, 14: Mx 066/23.

En la figura 6 podemos observar un gel de agarosa al 2% que representa los resultados de una PCR multiplex punto final. Los carriles (2,3 y 4) que siguen del NTC corresponden a los controles positivos, el carril 2 corresponde a VHS tipo 1 con un fragmento de 292pb, carril 3 corresponde a EBV con un fragmento de 229pb y el carril 4 corresponde a CMV con una banda de 131pb. En el carril número 7 se encuentra el MPM utilizado para esta electroforesis, en los demás carriles podemos observar a las muestras utilizadas para la PCR multiplex punto final. En el carril 12 del gel de agarosa, se puede observar una banda que corresponde a un fragmento de 229pb. El resultado indicó que la banda es perteneciente a EBV, pero para corroborar que realmente es el virus EBV, se le realizó una PCR individual usando los mismos primers específicos para dicho virus, por lo cual, si amplificó la misma banda de 229pb.

Con respecto al virus CMV obtuvimos 7 muestras positivas de las 140 muestras totales de exudados cervicales con un porcentaje de 7.5%. Esto de acuerdo con los productos de amplificación que se visualizaron en geles de agarosa al 2% y que se representa en el siguiente gráfico circular 3 y figura 7.

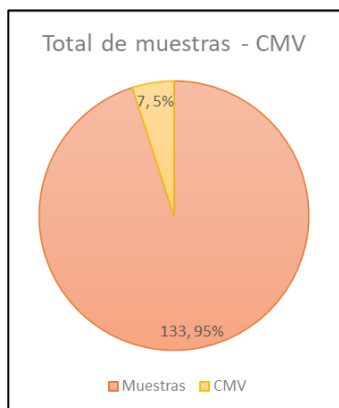


Gráfico 3: Gráfico circular que representa el número de muestras positivas a CMV (7) con un porcentaje de 7.5% muestras sobre el total de 140.

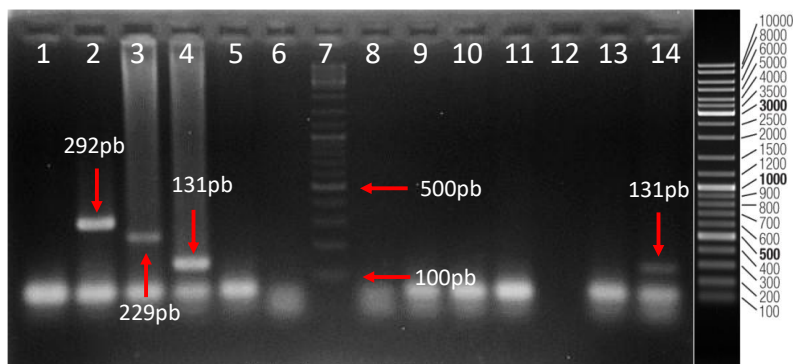


Figura 8: Gel de agarosa al 2% para CMV. 1: NTC, 2: CP VHS, 3: CP EBV, 4: CP CMV, 5: Mx 014723, 6: Mx 017/23, 7: MPM, 8: Mx 018/23, 9: Mx 022/23, 10: Mx 028/23, 11: Mx 034/23, 12: Mx 036/23, 13: Mx 047/23, 14: Mx 048/23

En la imagen del gel de agarosa (figura 7) podemos observar los tres controles positivos (carril 2,3 y 4), el carril 2 corresponde a VHS tipo 1 con un fragmento de 292pb, el carril 3 a EBV con un fragmento de 229pb y el carril 4 a CMV con una banda de 131pb, seguidos del NTC (carril 1). El séptimo carril corresponde a un marcador de peso molecular (MPM) y el resto de los carriles corresponden a muestras de exudados cervicales que no presentan alguna banda.

En el carril 14 que corresponde a la muestra 048/23 presenta una banda de 131pb, esto indica que la muestra es positiva a citomegalovirus. Para verificar que realmente correspondiera el fragmento del virus, se le realizó una PCR punto final individual en donde se tomaron los mismos primers específicos para citomegalovirus y la PCR dio un mismo resultado de la misma banda que corresponde a 131pb, esto indica que efectivamente corresponde a citomegalovirus. Esta PCR presentada es una PCR de las siete que salieron positivas a CMV.

Los resultados obtenidos en total son 12 muestras positivas a los virus de EBV y a CMV de las 140 muestras de exudados cervicales. El gráfico circular nos indica un porcentaje de 16.8 %, donde 5 son positivas a EBV, 7 son positivas a CMV y ninguna a VHS 1 / 2. Información observada en el gráfico circular 4.

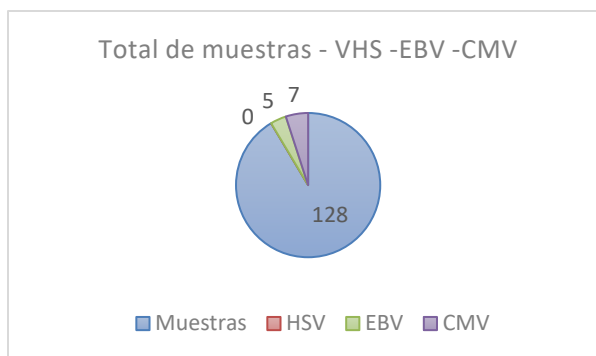


Gráfico 4: Gráfico circular que representa el número total de las muestras positivas a EBV y CMV, con 7 positivas para CMV, 5 para EBV y ninguna para VHS 1 / 2. Con un porcentaje de 16.8% de 140 muestras de exudados cervicales totales.

En la gráfica 5 se observa la relación de las muestras positivas a los virus EBV, CMV y cuáles de estas corresponden a muestras positivas y negativas a VPH

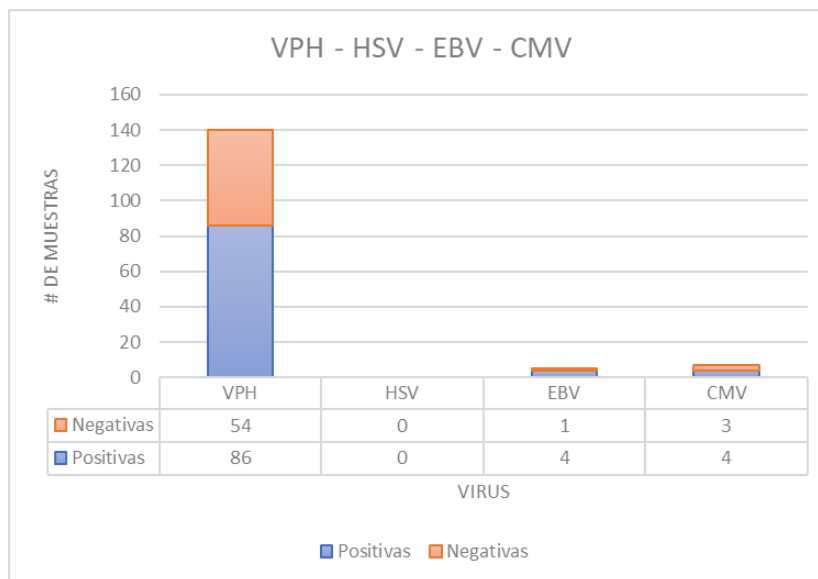


Gráfico 5: Gráfico que representa el total de muestras cervicales. 54 muestras negativas a VPH, 86 positivas a VPH sobre el total de 140. De las muestras positivas a VPH, 4 son positivas a EBV, de las negativas 1 es positiva a EBV. De las muestras negativas a VPH, 3 son positivas a CMV y de las positivas 4 son positivas a CMV.

Las 140 muestras totales de exudados cervicales presentan un porcentaje del 16.8% positivas a EBV y CMV. Es interesante observar algunas muestras que fueron positivas a VPH al mismo tiempo fueron positivas a dichos virus y además presentar algunos genotipos de alto o bajo riesgo.

Del total de las 140 muestras, 54 son negativas a VPH pero 3 de estas muestras son positivas a CMV. En las 86 muestras positivas a VPH, 4 fueron positivas a CMV. Siendo el total de 7 positivas a dicho virus, pero al mismo tiempo las positivas a VPH resultaron positivas a genotipos de alto riesgo (Tabla 5).

MUESTRA	VPH	GENOTIPO	ALTO O BAJO RIESGO	CMV
008/23	POS	39	ALTO RIESGO	POS
048/23	NEG			POS
059/23	POS	56, 51	ALTO RIESGO	POS
082/23	NEG			POS
086/23	NEG			POS
102/23	POS	51	ALTO RIESGO	POS
120/23	POS	39	ALTO RIESGO	POS

Tabla 5. Muestras positivas a CMV que a su vez presentan resultados positivos o negativos a VPH, y genotipos de alto o bajo riesgo que presentan. Autoría propia.

Con respecto a EBV, de las 54 muestras negativas a VPH, 1 es positiva a EBV, aquí no se observa mucho la presencia de dicho virus. Pero en las 86 muestras positivas a VPH, hay 4 muestras que fueron positivas a EBV y al mismo tiempo presentaron genotipos de alto y bajo riesgo (Tabla 6).

MUESTRA	VPH	GENOTIPO	ALTO O BAJO RIESGO	EBV
052/23	POS	43, 56, 39	ALTO Y BAJO RIESGO	POS
060/23	NEG			POS
078/23	POS	18	ALTO RIESGO	POS
137/23	POS	43, 45	ALTO Y BAJO RIESGO	POS
146/23	POS	51	ALTO RIESGO	POS

Tabla 6. Muestras positivas a EBV que a su vez presentan resultados positivos o negativos a VPH, y genotipos de alto o bajo riesgo que presentan. Autoría propia.

El porcentaje bajo que corresponde al 16.8% de un total de 140 muestras, podemos dar como resultado que los primers utilizados en la PCR multiplex punto final se alinean dentro de una zona específica del genoma de cada virus.

Finalmente, de las muestras que resultaron positivas a los virus EBV y CMV se seleccionaron 3 muestras de CMV, 2 EBV y 1 de VHS para un proceso de purificación del DNA de cada virus y confirmar por secuenciación, los fragmentos que corresponden a dichos virus detectados en las muestras cervicales por la PCR multiplex punto final.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la PCR multiplex punto final y de lo observado en geles de agarosa, se realizó el proceso de purificación y el envío de muestras para la secuenciación de algunas de ellas que se obtuvieron y que fueron positivas a los virus VHS, EBV y CMV. Se realizó el proceso de secuenciación para corroborar que los fragmentos amplificados correspondieran a los ácidos nucleicos de los virus respectivos. Por consiguiente, al obtener los resultados de la secuenciación, se descargó la secuencia en formato FASTA para confirmar que el fragmento amplificado en el gel de agarosa correspondía con los ácidos nucleicos de los virus de VHS 1, EBV y CMV, se comparó con las secuencias depositadas en NCBI y aplicar el algoritmo del programa BLAST.

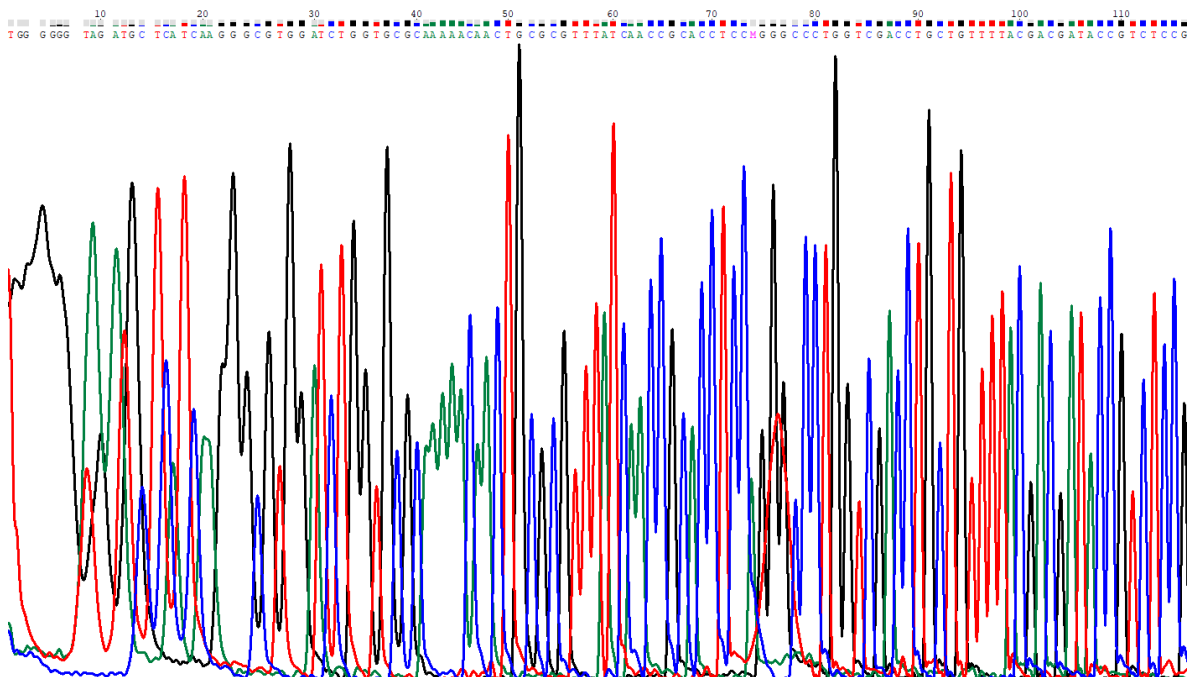


Figura 9. Cromatograma resultado del proceso de secuenciación de VHS y cada color representa a una base nitrogenada que es representada en la parte superior de la figura.

El cromatograma es el resultado del proceso de secuenciación y tiene como objetivo conocer la secuencia de las bases nitrogenadas de algún genoma o parte del genoma. El cromatograma (figura 9) representa la secuencia de bases nitrogenadas que pertenecen a la zona de unión de los primers dentro del genoma de VHS 1.

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate Sc16, complete genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1751092544 MN159383.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_31 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415432 MH697533.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_28 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415430 MH697532.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_23 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415422 MH697528.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_22 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415420 MH697527.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_20 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415416 MH697525.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_19 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415414 MH697524.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_13 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415406 MH697520.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_5 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415392 MH697513.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_4 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415390 MH697512.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HSV1_2 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415386 MH697510.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 2 isolate HSV2_2 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1678415212 MH697423.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate SJ8711012_1 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562184286 MH247253.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate KJ4719266_1 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562184276 MH247248.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HA6323859_1 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562184274 MH247247.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate RA7718902_1 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562184272 MH247246.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 isolate HS9415310_1 DNA polymerase (UL30) gene, complete cds	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562184264 MH247242.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain HSV-H15119, complete genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562111428 MH999850.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain HSV-H12118, complete genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562111197 MH999847.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain HSV-H1211, partial genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1562110885 MH999843.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain 2007-03494_S436_L001, partial genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1407526275 MG999895.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain 2015-30637, partial genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1407525902 MG999891.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain 2010-28641, partial genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1407525636 MG999888.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain 2007-21335, partial genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1407525376 MG999885.1
<input type="checkbox"/> Human alphaherpesvirus 1 strain 1996-27502, partial genome	436	436	99%	2e-117	99.59%	gi 1407523801 MG999868.1

Figura 10. Alineamientos significativos en BLAST de acuerdo con la secuencia resultado del proceso de secuenciación copiada en formato FASTA.

Con respecto a estos resultados obtenidos del BLAST (figura 10), y a las 100 primeras secuencias más significativas con un porcentaje de identidad del 99.59% del alineamiento con el programa BLAST, corresponde al virus del herpes simplex 1 (VHS 1), además el “E-value” es un valor de 2e-117, un valor muy pequeño que indica que “entre más pequeño sea el valor mejor será la coincidencia y será más significativa el alineamiento”.

El “Query cover” es de igual manera un valor alto que corresponde a un 99% y a lo que indica que la secuencia de entrada es comparada con otras, y es por eso por lo que podemos deducir que la secuencia corresponde al VHS tipo 1.

Para el virus de Epstein-Barr, de acuerdo con la secuencia de los amplicones obtenidos por PCR multiplex punto final, se envió para el proceso de secuenciación y corroborar que corresponde con dicho virus. Por consiguiente al obtener los resultados de la secuenciación, se descargó la secuencia en formato FASTA y se analizaron con en el programa BLAST en el cual se obtuvo un alineamiento con las 100 primeras secuencias de ácidos nucleicos.

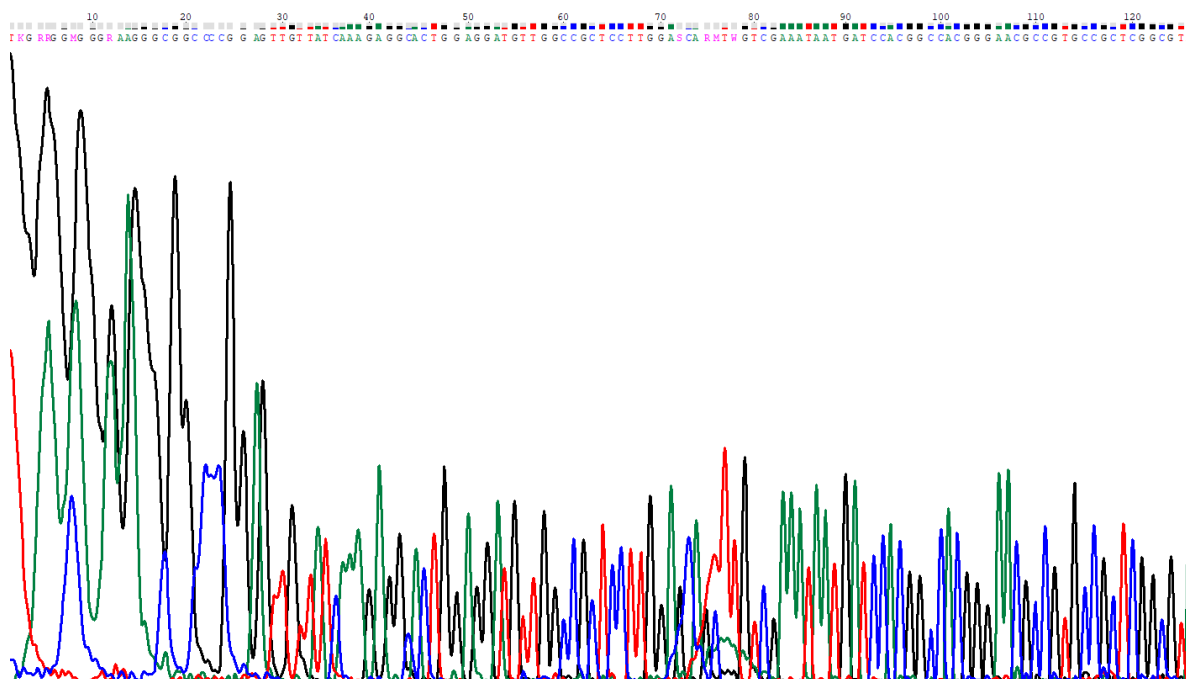


Figura 11. Cromatograma resultado del proceso de secuenciación de EBV y cada color representa a una base nitrogenada que es representada en la parte superior de la figura.

El cromatograma es el resultado del proceso de secuenciación y tiene como objetivo conocer la secuencia de las bases nitrogenadas de algún genoma o parte del genoma. El cromatograma (figura 10) representa la secuencia de las bases nitrogenas en la que se unieron los primers dentro del genoma de EBV, para consecuentemente verificar que pertenecen al EBV.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 strain IM-3, complete genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1796170293 MK973061.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate P3-T1, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476020609 MH883777.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv27, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476020271 MH883769.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv25, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476020213 MH883768.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv23, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476020197 MH883767.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv22, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476020142 MH883766.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv17, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476020011 MH883763.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv9, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476019784 MH883758.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv6, partial genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1476019734 MH883757.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465389501 S992277.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465389501 S992276.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465382921 S992256.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465382789 S992253.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465382788 S992252.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465382787 S992251.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465382786 S992250.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate Human herpesvirus 4 genome assembly, chromosome:1	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1465382779 S992243.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate JC_039_BWA, complete genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1386454465 MG298926.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate JC_027_BWA, complete genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1386454385 MG298925.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate IMS_Saliva_90_BWA, complete genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1386454306 MG298924.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate IMS_Saliva_5_BWA, complete genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1386454153 MG298922.1
<input type="checkbox"/>	Human gammaherpesvirus 4 isolate DF_Tonsil_T156_BWA, complete genome	300	300	100%	6e-77	97.67%	gi 1386453760 MG298917.1

Figura 12. Alineamientos significativos en BLAST de acuerdo con la secuencia resultado del proceso de secuenciación copiada en formato FASTA.

Los resultados obtenidos de acuerdo con el programa BLAST (figura 12) y con las 100 primeras secuencias más significativas, arrojaron un porcentaje de identidad del 97.67%, corresponde al virus de herpes 4 (virus Epstein Barr). Además el “E-value” es un valor de 6e-77, un valor pequeño que indica la coincidencia y que tan significativa es el alineamiento. Por lo que podemos indicar que hay un alineamiento significativo con el programa BLAST.

Con respecto al “Query cover” es de igual manera un valor muy alto que corresponde a un 100%, y es comparada con otras, es por eso por lo que podemos confirmar que efectivamente la secuencia corresponde al virus del herpes 4 Epstein Barr.

Citomegalovirus y de igual manera que HSV y EBV, se realizó el proceso de secuenciación para poder corroborar que el proceso de PCR multiplex punto final y que el amplicón, corresponden al virus de citomegalovirus. Por consiguiente al obtener los resultados de la secuenciación, se descargó la secuencia en formato FASTA, se analizaron con en el programa BLAST y se obtuvo un alineamiento con las 100 primeras secuencias de ácidos nucleicos.

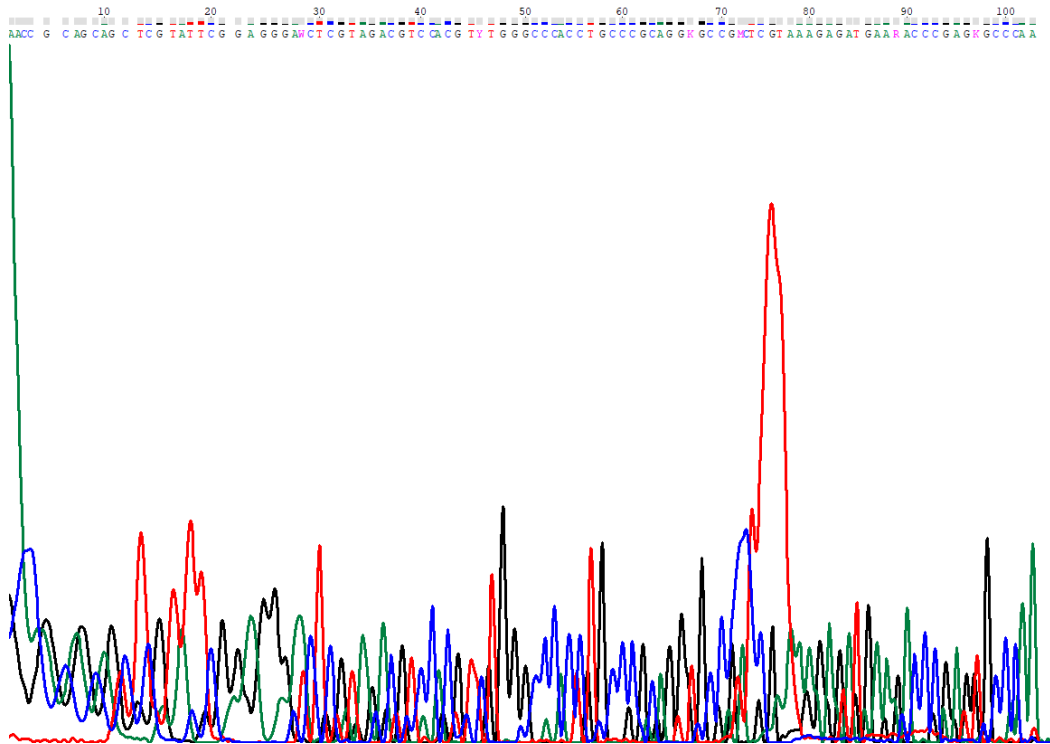


Figura 13. Cromatograma resultado del proceso de secuenciación de CMV y cada color representa a una base nitrogenada que es representada en la parte superior de la figura.

El cromatograma es el resultado del proceso de secuenciación y tiene como objetivo conocer la secuencia de las bases nitrogenadas de algún genoma o parte del genoma. El cromatograma (figura 13) muestra la secuencia de bases nitrogenadas que pertenecen a la zona de unión de los primers dentro del genoma de CMV. Finalmente, los resultado fueron vistos en el BLAST para corroborar la secuencia y confirmar que pertenecen al virus de herpes simplex 5.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments							Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain GLA-SOT4, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1808704584 MT044477.1				
<input type="checkbox"/> Mutant Human betaherpesvirus 5 clone AD169-BAC20, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1807242611 MN920393.1				
<input type="checkbox"/> Mutant Human betaherpesvirus 5 clone AD169-BAC2, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1807242129 MN900952.1				
<input type="checkbox"/> Mutant Human betaherpesvirus 5 isolate TR3_BAC, complete sequence	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1789282850 MN075802.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain LUS243, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1580077830 MK422176.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain LUS283, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1551353550 MK290744.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain LUS248, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1551353379 MK290743.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 isolate UCSF-1a genomic sequence	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1524081528 MK213797.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 isolate P018_UL54_gene, partial cds	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1488191926 MH836411.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 isolate P009_UL54_gene, partial cds	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1488191916 MH836406.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 isolate P003_UL54_gene, partial cds	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1488191904 MH836400.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain HANSCTR1A, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1145593718 KY490079.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain HANChild2&3, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1145592532 KY490072.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain PRA7, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1145592022 KY490069.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain PRA3, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1145591346 KY490065.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 clone TAR_Toledo-P, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1240500229 MF783093.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 isolate Toledo-p7 minority, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1240498990 MF783091.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 isolate Toledo-p7 majority, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1240498721 MF783090.1				
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Human herpesvirus 5, complete sequence	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 987386707 KJ317610.1				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain UK/Lon9/Urine/2012, partial genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1131740132 KT726953.2				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain UK/Lon8/Urine/2012, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1131740114 KT726951.2				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain UK/Lon7/Urine/2011, complete genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1131740109 KT726950.2				
<input type="checkbox"/> Human betaherpesvirus 5 strain NL/Rot7/Urine/2012, partial genome	149	149	96%	1e-31	92.00%	gi 1131740084 KT726946.2				

Figura 14. Alineamientos significativos en BLAST de acuerdo con la secuencia resultado del proceso de secuenciación copiada en formato FASTA CMV.

De acuerdo con los resultados obtenidos del BLAST (figura 14), y a las 100 primeras secuencias más significativas con un porcentaje de identidad del 92.00%, podemos deducir que el bandeo arrojado en el gel de agarosa corresponde al virus de herpes 5 y es correspondiente a CMV, además el “E-value” es un valor de 1e-31, un valor pequeño que indica la coincidencia y que tan significativo es el alineamiento.

El valor “Query cover” indica que la secuencia de entrada es comparada con otras, un valor alto que corresponde a un 96%, y es por eso por lo que podemos confiar y confirmar que efectivamente la secuencia corresponde al virus del herpes 5 Citomegalovirus.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación, se estandariza la técnica molecular de PCR ampliamente ya utilizada para la identificación de agentes etiológicos. Dicha técnica es de mucho interés por ser una herramienta específica para la detección temprana de ciertos virus responsables de algunas ITS. La técnica de PCR multiplex punto final brinda información importante para la detección de los virus como VHS 1, EBV y CMV. En las muestras de exudados cervicales pudimos observar que aunque la prevalencia de estos virus es baja, las pocas muestras que resultaron positivas para EBV y CMV brindan información relevante.

De acuerdo con los datos obtenidos del trabajo de investigación de Diego *et al.* 2023, las muestras de exudados cervicales que resultaron positivas a VPH, algunas de ellas mostraron la presencia de algunos genotipos como lo son el 39, 56 y 18, entre otros. Dichos genotipos pertenecen a los genotipos de alto riesgo y son aquellos que sin una atención médica puede liderar a un posible cáncer cervicouterino (Mosmann *et al.* 2019).

Otro de los posibles factores de riesgo de coinfección que se presentan, es el número de parejas sexuales. En las muestras positivas a CMV el número de parejas sexuales oscila entre 2 y 3 individuos, siendo el CMV el virus predominante con un porcentaje del 7.5% en su detección con respecto los demás virus de la familia de *Herpesviridae*. Cabe pensar que el VPH podría facilitar o cooperar en la entrada y presencia de CMV, ya que ambos virus se encuentran en una zona genital que posee fluidos vaginales muy susceptibles a la infección por algún otro patógeno (Viscarra *et al.* 2013).

Con respecto a EBV, se obtuvo un bajo porcentaje de muestras el cual corresponde a un 5.4%. Las muestras que resultaron positivas a EBV, también fueron positivas a VPH y de acuerdo con la información obtenida del trabajo de investigación de Diego *et al.* 2023, los genotipos que presentaron las muestras fueron 56, 39, 18, 45 y 51, que corresponden a genotipos de alto riesgo. De acuerdo con los genotipos de bajo riesgo que presentaron las muestras solo se presentó el genotipo 43 y hubo una muestra que no fue positiva a VPH pero si a EBV. Con respecto a número de parejas sexuales como factor de riesgo de coinfección, las muestras positivas a EBV presentaron un promedio de entre 3 a 5 parejas sexuales.

Además de los factores de riesgo en la ITS por EBV o CMV que se han mencionado, también se puede considerar la falta de algún método preservativo, de esta forma la presencia

de lesiones en la zona genital femenina como lo son un cérvix ulcerado, la presencia de crestas o algunas otras estructuras anormales que presenta la paciente, pueden ayudar a la infección con más de un agente viral.

Se puede observar que los genotipos que se presentaron mayormente en las muestras de exudados cervicales fueron los genotipos de alto riesgo como el 56 y 18. Normalmente estos genotipos puede liderar a cáncer sin algún tratamiento médico, al igual que el genotipo 16 (Mosmann *et al.* 2019), cuyo genotipo no se detectó en este trabajo.

Aunque los virus de VHS tipo 1 y 2, EBV o CMV son responsables de algunas de las ITS de importancia médica en la población mundial, su asociación entre la infección con el VPH, la aparición de lesiones premalignas y el cáncer sigue siendo un tema controversial (Troconis *et al.* 2022).

De acuerdo con los resultados obtenidos de Ereira *et al* 2021, la interacción viral (EBV-VPH) ha permitido evidenciar que la infección por VPH es importante, aunque no suficiente, para el desarrollo del cáncer, ya que no todos los individuos infectados por VPH evolucionan a cáncer. Sin embargo, la presencia de otros microorganismos, como el EBV y *C. albicans*, puede desencadenar un mecanismo sinérgico o potenciar la malignidad del VPH.

A pesar de no haber encontrado el VHS tipo 1 o 2 en las muestras de exudados cervicales de acuerdo con el presente trabajo, existe una alta prevalencia de este virus según reportes oficiales. Algunos estudios realizados como Corona *et al.* 2010, mencionan que el VHS 1 tiene tres causas probables para su aumento como agente del herpes genital, la primera es el aumento de la prevalencia de herpes oral, la segunda es por cambios en el comportamiento sexual oral genital y la tercera es la existencia de cepas más virulentas o mejor adaptadas a la mucosa genital.

Nuestros resultados obtenidos de la PCR multiplex punto final arrojó una banda de 292pb que corresponde al VHS, pero fue con el proceso de secuenciación que se confirmó que la secuencia pertenece al VHS tipo 1, este fragmento obtenido cabe aclarar que es de una muestra de exudado bucal que se realizó en este trabajo. Con la información mencionada anteriormente en este estudio es que el VHS 1 es el virus que causa principalmente herpes labial y el VHS 2 es el que causa infección en las zonas genitales. Nuestro control positivo

pertenece al VHS 1, pero las muestras de exudados cervicales ninguna resultó positiva a VHS 1 o 2, es interesante analizar este resultado, siendo el más prevalente el 2 en comparación con otros virus como EBV o CMV, ya que se presenta en mayor riesgo de adquirir esta infección en la población joven, con una prevalencia global del 11.3% (Bhatla *et al.* 2018). Siendo la población de estudio en un intervalo de edad entre 18 a 27 años.

Aunque el VHS es considerado como un factor de riesgo en la adquisición de otras ITS tales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de papiloma humano (VPH), depende de la carga viral para determinar su papel principal o en sinergismo con el VPH en el origen y desarrollo del CCU (Troconis 2022).

Por lo que debido a ese porcentaje bajo se necesita de más estudios a largo plazo para dar seguimiento a estas muestras que resultaron positivas a más de 1 virus para evaluar su persistencia; además se requiere de un mayor número de muestras para verificar si hay o no una prevalencia de estos virus que puedan ser un factor importante en una coinfección viral y de esa manera puede persistir y si no se atiende a tiempo pueda conllevar a un posible cáncer.

Aún quedan muchos estudios por realizar y analizar la presencia de algunos virus de la familia herpes virus en asociación con el VPH a largo plazo. De esa manera detectarlos e investigar si tienen un papel importante en las coinfecciones con otros virus, esto sería de mucha importancia para una detección y tratamiento temprano. Además de realizar estudios a la par con otros agentes de origen bacteriano y fúngico.

10. CONCLUSIONES

En este proyecto se utilizó la técnica de PCR multiplex punto final para la detección de algunos virus causantes de ITS que son importantes para la población a nivel mundial. Para nuestros resultados podemos concluir que el virus predominante fue el CMV, y se encontró en un porcentaje mayor en comparación al virus de EBV.

El EBV fue el menos predominante, pero en ambos virus hubo la existencia de genotipos de alto y bajo riesgo, podemos concluir que ya sean positivas o negativas a VPH hay la presencia de genotipos de alto o bajo riesgo.

La prevalencia de los virus estudiados en muestras de exudados cervicales es baja, pero es importante su identificación en este tipo de muestras por la asociación que puedan tener con genotipos de alto y bajo riesgo de VPH. Para poder afirmar que existe una asociación entre estos virus se necesita de más estudios de prevalencia de estos agentes y estudios de seguimiento a largo plazo específicamente de los pacientes en los que se encontraron más de un virus presente en la muestra.

Aunque no tuvimos alguna muestra positiva a VHS tipo 1 o 2, se espera que en estudios futuros se encuentre la presencia del virus para analizar su presencia con otros virus e identificar si son o no un factor importante para otras ITS que puedan liderar a cáncer.

11.REFERENCIAS

- Alotaibi, H., Almajhdi, F. N., Al-Saleh, A., Obeid, D., Khayat, H., Al-Muammer, T., Tulbah, A., Al-Fageeh, M. B., Al-Ahdal, M. N., & Alhamlan, F. S. (2020). Association of sexually transmitted infections and human papillomavirus co-infection with abnormal cervical cytology among women in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1587-1595. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.021>
- Bascones, M, A., & Pousa, C, X. (2011). Virus del herpes. *Avances en Odontología*. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852011000100002&lng=es&tlng=es.
- Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal Of Gynaecology And Obstetrics*, 143(S2), 22-36. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12611>
- Blazquez, A. C., Berenstein, A., Torres, C., Izquierdo, A., Lezama, C., Moscatelli, G., De Matteo, E. N., Lorenzetti, M. A., & Preciado, M. V. (2021). Comprehensive evolutionary analysis of complete Epstein–Barr virus genomes from Argentina and other geographies. *Viruses*, 13(6), 1172. <https://doi.org/10.3390/v13061172>
- Chen, Z., Zhao, K., Tan, B., Tong, Z., He, Z., Luo, X., Cai, L., Wang, H., Leung, P. H. M., Chow, F. W., Chen, H., & Deng, Y. (2022). Development of a high specificity typing method for the detection of herpes simplex virus. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.955713>
- Corona-Oregón E, Conde-González CJ, Barrón BL, Sánchez-Alemán, M. A. (2010). Virus del herpes simplex tipo 1: un posible agente de transmisión sexual en población universitaria. *Gac Med Mex*. 2010;146(2):98-102.
- Dobbins, G. C., Patki, A., Chen, D., Tiwari, H. K., Hendrickson, C., Britt, W. J., Fowler, K. B., Chen, J. Y., Boppana, S. B., & Ross, S. A. (2019). Association of CMV genomic mutations with symptomatic infection and hearing loss in congenital CMV infection. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4681-0>
- Erira, H. A. T., Navarro, A. F. R., & Robayo, D. A. G. (2021). Human papillomavirus, Epstein–Barr virus, and *Candida albicans* co-infection in oral leukoplakia with

different degrees of dysplasia. *Clinical and experimental dental research*, 7(5), 914-923. <https://doi.org/10.1002/cre2.435>

- Escuredo, J. P., Llorente, J. L., Melón, S., De Oña, M., Martínez, J. G., Marcos, C., & Hermsen, M. (2007). Las infecciones por virus herpes simplex, Epstein-Barr, varicela zoster, papiloma humano, citomegalovirus o adenovirus no tienen relación con los adenocarcinomas nasosinuales. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 58(7), 311-315. [https://doi.org/10.1016/s0001-6519\(07\)74934-8](https://doi.org/10.1016/s0001-6519(07)74934-8)
- Grabarek, B. O., Ossowski, P., Czarniecka, J., Ożóg, M. K., Prucnal, J., Dziuba, I., Остаенда, А., Dziobek, K., Boroń, D., Peszek, W., Kras, P., Januszyk, S., Dąbala, M., Kasela, T., & Opławski, M. (2023). Detection and genotyping of human papillomavirus (HPV16/18), Epstein–Barr virus (EBV), and human cytomegalovirus (HCMV) in endometrial endometrioid and ovarian cancers. *Pathogens*, 12(3), 397. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030397>
- Jiao, X., Sui, H., Lyons, C. J., Tran, B., Sherman, B. T., & Imamichi, T. (2019). Complete genome sequence of Herpes simplex Virus 1 strain MacIntyre. *Microbiology resource announcements*, 8(37). <https://doi.org/10.1128/mra.00895-19>
- Kosaki, R., Nakamura, T., Higaki, S., Yamamoto, S., Inoue, Y., Hayashi, K., Shimomura, Y., & Tano, Y. (2003). The use of competitive PCR for quantitation of HSV-1 DNA. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 47(3), 240-245. [https://doi.org/10.1016/s0021-5155\(03\)00010-8](https://doi.org/10.1016/s0021-5155(03)00010-8)
- Louten, J. (2016). *Virus Structure and Classification*. En *Elsevier eBooks* (pp. 19-29). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800947-5.00002-8>
- Minaya, M., Jensen, T. L., Goll, J., Korom, M., Datla, S. H., Belshe, R. B., & Morrison, L. A. (2017). Molecular Evolution of Herpes simplex virus 2 Complete genomes: Comparison between primary and recurrent infections. *Journal of Virology*, 91(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.00942-17>
- Mofrad, M. G., Sadigh, Z. A., Ainechi, S., & Faghiloo, E. (2021). Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients. *Virology Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01498-z>
- Mosmann, J. P., Talavera, A. D., Criscuolo, M., Venezuela, R. F., Kiguen, A. X., Pánico, R., De Prato, R. F., De Blanc, S. A. L., Ré, V. E., & Cuffini, C. (2019).

Sexually transmitted infections in oral cavity lesions: human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, and herpes simplex virus. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1632129. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1632129>

- Núñez-Troconis, J. (2022). Herpes virus simple tipo 2 ¿factor y/o cofactor en el cáncer del cuello uterino? Revisión narrativa de la literatura. *Revista de obstetricia y ginecología de Venezuela*, 82(02), 213-227. <https://doi.org/10.51288/00820211>
- Ricardo, A. T. (2013). Determinación del virus papiloma humano y virus herpes simple y su posible relación con la presencia y tipo de lesiones preinvasivas del cuello uterino. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222013000200007
- Tălmaci, R., Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., Coriu, D., Coliță, D., & Gavrilă, L. (2004). Scanning of β -globin gene for identification of β -thalassemia mutation in Romanian population. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 8(2), 232-240. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00278.x>
- Tanaka, T., Kogawa, K., Sasa, H., Nonoyama, S., Furuya, K., & Satō, K. (2009). Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (Herpes simplex virus, Varicella-Zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. *Biomedical research*, 30(5), 279-285. <https://doi.org/10.2220/biomedres.30.279>
- Victória, J. M. N., Guimarães, A. L. S., Da Silva, L. M., Kalapothakis, E., & Gomez, R. S. (2005). Polymerase chain reaction for identification of herpes simplex virus (HSV-1), cytomegalovirus (CMV) and human herpes virus-type 6 (HHV-6) in oral swabs. *Microbiological Research*, 160(1), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.011>
- Viscarra A, Tamara, Brebi M, Priscilla, Andana V, Alejandra, & Sánchez G, Raúl. (2013). Infecciones de Transmisión Sexual en Semen: El Hombre como Vector de Transmisión. *International Journal of Morphology*, 31(1), 254-263. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000100041>