



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana
Informe de pasantía de grado

Estudio de la circulación del Virus del Papiloma Humano en aguas residuales de Salto, Uruguay.

Estudiante: Camila Fernandez Sabatella

Orientador: Dr. Matias Victoria

Co-orientador: Dr. Matias Castells

Lugar de realización: Laboratorio de Virología Molecular, Depto. de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República.

Contacto: camilafsabatella@gmail.com



Departamento de Ciencias Biológicas
CENUR Litoral Norte - Udelar



Dedicada a mi familia, Karina, Wilson y Alejandro,
por ser guía, apoyo y hogar.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer con verdadero aprecio a mis orientadores, Matias Victoria y Matias Castells, por su compromiso y, por sobre todo, la confianza que depositaron en mí. Gracias por acompañarme con paciencia, por todo el conocimiento compartido y por inspirarme a seguir creciendo como científica.

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Virología Molecular y del Departamento de Ciencias Biológicas, por el compañerismo genuino, las charlas técnicas (y las no tanto), las risas y por brindarme su ayuda siempre que lo necesité. Gracias por hacer de ese lugar un espacio donde aprendí muchísimo y donde siempre me sentí parte.

A la Licenciatura en Biología Humana, por abrirme las puertas a un mundo que me apasiona. En especial, un agradecimiento a Ana Egaña, por su cercanía, su apoyo y por sostenernos con tanto compromiso desde su rol como tutora.

A mis amigas del alma —Selena, Victoria y Paulina— por ser refugio, aliento y risa. Por estar siempre, en lo cotidiano y en lo extraordinario, con amor incondicional. Gracias por los abrazos a tiempo, por las palabras justas y por recordarme quién soy cuando más lo necesito.

Por último, a mi familia, mi sostén más profundo. A mis padres, por su amor inmenso, por confiar en mí incluso cuando yo dudaba, y por enseñarme —con el ejemplo— que el esfuerzo y la dedicación son caminos que valen la pena. A mi hermano, por ser ese compañero silencioso pero siempre presente, con su manera tan especial de acompañar. Sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

Gracias por estar, por sostener, por creer. Gracias por caminar conmigo.

Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Historia del Virus del papiloma humano	5
1.2. Clasificación	5
1.3. Principales características, estructura viral y organización genómica.	6
1.4. Replicación viral	10
1.5. Patogenia	11
1.6. Prevención del Virus del Papiloma Humano	12
1.7. Epidemiología	13
1.7.1. Epidemiología mundial	13
1.7.2. Epidemiología en Uruguay	14
1.7.3. Epidemiología ambiental del HPV	16
1.8. Relevancia de este estudio	17
2. Hipótesis	18
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo general	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. Materiales y métodos	19
4.1. Recolección de muestras	19
4.2. Concentración viral	19
4.3. Extracción de ácidos nucleicos	20
4.4. Síntesis de cDNA a partir de ARN viral	21
4.5. Amplificación por PCR	21
4.5.1. Detección por PCR del HPV	21
4.5.2. Detección por PCR del PP7 (control del proceso)	23
4.6. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de amplicones	23
4.7. Cuantificación de ADN	24
4.8. Secuenciación y análisis bioinformático	24
5. Resultados	25
6. Discusión	30
7. Bibliografía	34
8. Anexo	41

Resumen

El virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés) provoca una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más comunes a nivel mundial, caracterizada por su transmisión a través del contacto sexual, ya sea genital, anal u oral. Se han identificado más de 200 genotipos diferentes de HPV, los cuales se clasifican en dos categorías: los de alto riesgo y los de bajo riesgo. Los genotipos de alto riesgo son aquellos que están estrechamente asociados con el desarrollo de distintos tipos de cánceres, principalmente el cáncer de cuello uterino, aunque también pueden estar implicados en cánceres de ano, pene, vagina y orofaringe. Por otro lado, los genotipos de bajo riesgo están vinculados con la aparición de lesiones benignas, como las verrugas anogenitales.

El estudio de la epidemiología del HPV permite comprender su distribución y prevalencia en diferentes poblaciones. Una de las estrategias emergentes para su monitoreo es el análisis de aguas residuales, una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la vigilancia epidemiológica de diversos agentes infecciosos. Este enfoque, denominado epidemiología basada en aguas residuales (EBAR) permite detectar la presencia del virus en la población a partir de los virus excretados en las heces y la orina, brindando información sobre la circulación del virus sin requerir estudios individuales invasivos.

El presente estudio tuvo como objetivo principal la detección y tipificación de los genotipos circulantes del HPV en las aguas residuales de la ciudad de Salto, Uruguay, con el fin de analizar su circulación en la población local. Para ello, se llevó a cabo la recolección de muestras mensuales durante un año en la entrada de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad. Posteriormente, se procedió a la concentración viral presente en las muestras y a la detección y cuantificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los productos amplificados de ADN fueron sometidos a secuenciación masiva, lo que permitió determinar con precisión los genotipos presentes y analizar su distribución en la población salteña.

Se detectó HPV en el 75% de las muestras, con un total de 28 genotipos identificados, incluyendo 9 de alto riesgo. El genotipo 66 fue el único presente en todas las estaciones del año, seguido por otros como el 6, 16 y 31, mostrando una diversidad y circulación variable según la estación. Estos resultados evidencian una circulación sostenida y diversa del HPV en la comunidad salteña. La metodología de vigilancia ambiental demostró ser eficaz para el monitoreo no invasivo del virus y constituye una herramienta valiosa para complementar estrategias de salud pública, especialmente en regiones con acceso desigual al sistema sanitario.

Palabras clave: Papilomavirus humano, agua residual, genotipos.

1. Introducción

1.1. Historia del Virus del papiloma humano

Aunque en la antigüedad griega y romana ya se reconocían las verrugas genitales como entidades clínicas y se agrupaban con otras enfermedades de transmisión sexual como la sífilis y la gonorrea, no fue sino hasta el siglo XX que se estableció su origen viral. Este importante avance se produjo en 1907, cuando Giuseppe Ciuffo demostró experimentalmente que un extracto libre de células obtenido de una verruga común era capaz de inducir nuevas lesiones tras ser inoculado en la piel de humanos sanos, lo cual constituyó una prueba irrefutable de la naturaleza infecciosa de estas lesiones cutáneas (Ciuffo, 1907, citado en zur Hausen, 2008). Años después, en 1933, el virólogo Richard Shope logró aislar por primera vez un virus papiloma a partir de verrugas cutáneas en conejos silvestres de cola de algodón, al que se denominó posteriormente Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV), siendo este el primer virus papilomatoso con capacidad oncogénica identificado en un modelo animal (Shope y Hurst, 1933; zur Hausen, 2008). El estudio del CRPV no solo confirmó la naturaleza transmisible de los papilomas, sino que también proporcionó el primer indicio experimental de que algunos tipos de papilomavirus podrían inducir tumores malignos. Durante varias décadas, el HPV fue clasificado dentro de la familia *Papovaviridae* junto con los poliomavirus, debido a similitudes morfológicas observadas mediante microscopía electrónica, como su cápside icosaédrica de 72 capsómeros, la ausencia de envoltura y su genoma de ADN de doble cadena circular. Sin embargo, con el avance de las técnicas de biología molecular, se descubrieron diferencias sustanciales en la estructura genómica, la organización del genoma y los mecanismos de transcripción de estos virus, lo cual llevó al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) a reclasificarlos. A partir de entonces, los papilomavirus fueron ubicados en una nueva familia independiente denominada *Papillomaviridae*, mientras que los poliomavirus permanecieron en la familia *Polyomaviridae* (Hoory et al., 2008).

1.2. Clasificación

La familia *Papillomaviridae* está compuesta por un conjunto de virus que causan papilomas específicos en sus hospedadores, y han sido identificados en una gran variedad de animales, incluido el ser humano (de Villiers et al., 2004). Hasta la fecha, se han descrito más de 200 genotipos de papilomavirus, de los cuales más de 100 infectan exclusivamente a personas. Aproximadamente 40 de estos genotipos tienen afinidad por la mucosa genital (Trottier y Burchell, 2009).

El gen L1, que codifica para la proteína principal de la cápside viral, es el más conservado del genoma y por eso se utiliza para la clasificación de los papilomavirus y para identificar nuevos tipos. Aunque la clasificación taxonómica de esta familia se revisa constantemente, sigue basándose en el análisis de la secuencia de L1 (de Villiers et al., 2004).

Actualmente, se reconocen 30 géneros dentro de *Papillomaviridae*, nombrados con las letras del alfabeto griego (Alfa, Beta, Gamma, etc.). Solo cinco de estos géneros infectan a humanos: Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu. Los demás infectan otros animales; por ejemplo, los géneros Delta y Lambda afectan a ungulados y perros, produciendo lesiones benignas en piel y mucosas (de Villiers et al., 2004).

Dentro del género *Alfapapillomavirus* se encuentran cerca de 40 genotipos que infectan la mucosa genital humana. Estos genotipos se agrupan en dos categorías principales: los virus papiloma de alto riesgo (HPV-HR), asociados al cáncer cervical y otros tipos de cánceres, y los virus de bajo riesgo (HPV-LR), que se vinculan a lesiones benignas como las verrugas genitales (Muñoz et al., 2003).

Los genotipos clasificados como HPV de alto riesgo incluyen el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, considerados agentes causales del cáncer de cuello uterino. Estos virus tienen la capacidad de alterar las células epiteliales y generar lesiones precancerosas que, sin tratamiento, pueden progresar a cáncer invasivo. Por otro lado, los genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 son considerados de bajo riesgo, ya que se asocian principalmente con verrugas anogenitales y no suelen evolucionar hacia lesiones malignas (Seyoum et al., 2022).

1.3. Principales características, estructura viral y organización genómica.

El HPV pertenece a la familia *Papillomaviridae*, la cual agrupa a un conjunto de virus con genoma de ADN de doble cadena circular, específicos de una determinada especie, que infectan principalmente epitelios escamosos (Hoory et al., 2008).

Desde el punto de vista estructural, el HPV es un virus sin envoltura, con una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros y un tamaño de entre 52 y 55 nanómetros de diámetro. La cápside está compuesta por dos proteínas estructurales principales: L1 y L2. La proteína L1, de aproximadamente 55 kilodaltons (kDa), es el componente mayoritario de la cápside, representando alrededor del 80% del total. Tiene la capacidad única de autoensamblarse espontáneamente en condiciones *in vitro* en estructuras denominadas partículas similares a virus (VLPs, por sus siglas en inglés). Estas VLPs imitan la morfología del virus nativo, aunque carecen de material genético, y han demostrado ser altamente inmunogénicas, lo que ha permitido su uso exitoso como base de las

vacunas profilácticas contra el HPV actualmente disponibles (Buck et al., 2013). Por otro lado, la proteína L2, con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, presente en menor cantidad, cumple funciones críticas tanto en la maduración de la cápside como en el ciclo de replicación viral. L2 facilita el ensamblaje y estabilización de la cápside, y participa en la encapsidación del ADN viral, proceso por el cual el genoma se introduce dentro de la cápside en formación (Wang y Roden, 2013). Además, investigaciones han demostrado que L2 posee secuencias funcionales que le permiten desestabilizar membranas celulares, una propiedad esencial para mediar la liberación del genoma viral desde los endosomas al citoplasma tras la entrada del virión en la célula huésped. Este paso es crucial para que el ADN viral llegue al núcleo y se inicie la infección productiva (Kämper et al., 2006; véase Figura 1).

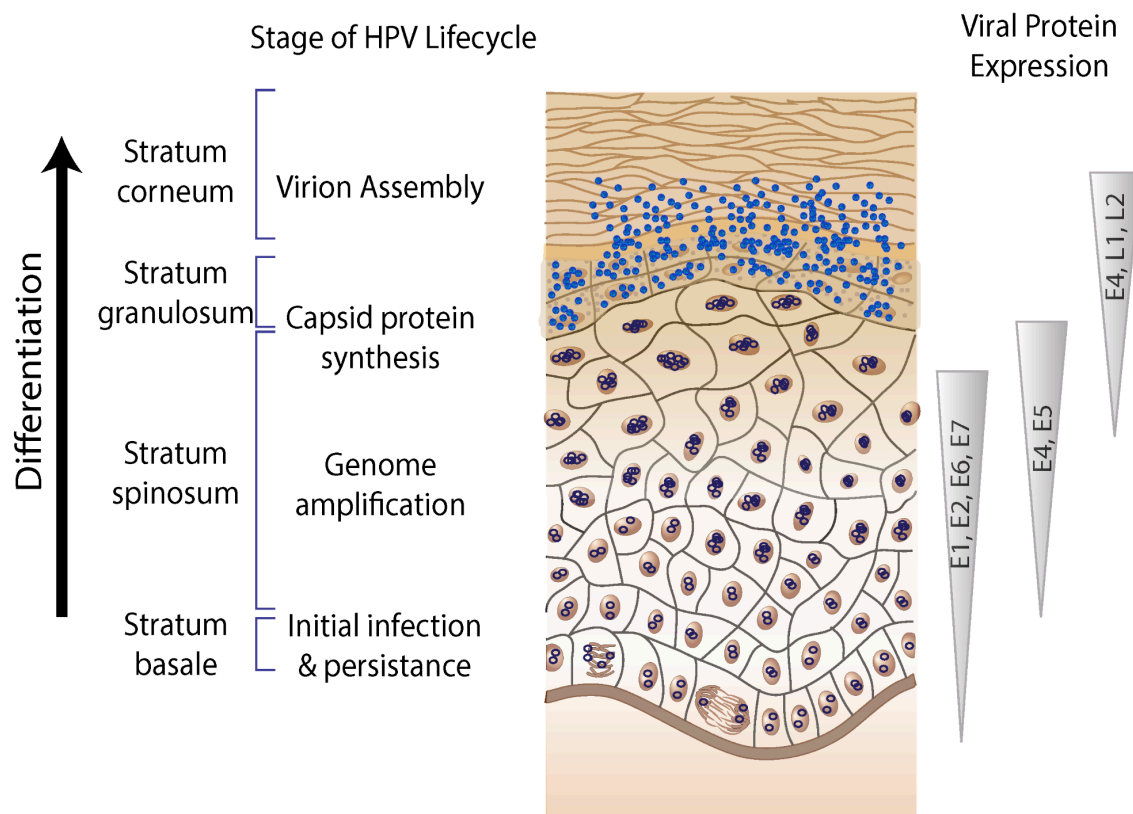


Figura 1. **Esquema del ciclo de vida del virus.** A la izquierda se representan las diferentes capas del epitelio. Los triángulos indican el momento de expresión y los niveles relativos de las proteínas virales. La expresión conjunta de E6, E7, E1 y E2 permite el mantenimiento del genoma viral. El aumento en la concentración de proteínas implicadas en la replicación favorece la amplificación del genoma. La expresión de L1 y L2 conduce al ensamblaje de nuevos viriones infecciosos (Van Doorslaer, et al. 2018)

El genoma del HPV es una molécula de ADN circular de doble cadena que contiene aproximadamente 7900 a 8000 pares de bases. Todos los marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) se encuentran en una sola de las hebras de ADN, la cual actúa como molde para la transcripción. La organización genómica se divide funcionalmente en tres regiones (Figura 2): (1) la región temprana o early (E), (2) la región tardía o late (L) y (3) una región no codificante denominada Long Control Region (LCR), que contiene elementos cis-reguladores (Harden y Munger, 2016). La región temprana codifica para las proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Estas proteínas cumplen funciones clave en la replicación, regulación transcripcional, ensamblaje viral y modulación de la respuesta inmune del hospedador. E1 es una helicasa ATPasa que reconoce el origen de replicación y es fundamental para la duplicación del genoma viral. E2 participa tanto en la replicación como en la transcripción y mantenimiento de los episomas virales. La proteína E4, que se expresa en estadios tardíos del ciclo, actúa sobre el citoesqueleto celular, deteniendo la progresión del ciclo celular en fase G2 para facilitar la replicación viral (Longworth & Laimins, 2004). E5 posee múltiples funciones: interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), evasión de la respuesta inmune mediante la inhibición de la expresión de MHC clase II, y promoción del crecimiento celular (DiMaio y Petti, 2013). Las proteínas E6 y E7, por su parte, son las principales oncoproteínas virales: E6 promueve la degradación de la proteína supresora de tumores p53 mediante la unión a la ubiquitina ligasa E6-AP, lo que conduce a la evasión del punto de control G1/S del ciclo celular; mientras que E7 se une a la proteína del retinoblastoma (pRb), promoviendo su degradación y liberando factores de transcripción como E2F, facilitando la entrada en fase S y la proliferación descontrolada (Jiang y Yue, 2014). Además de la isoforma completa E6, el HPV también genera una variante más pequeña conocida como E6*, la cual se produce a través de un proceso de splicing alternativo del ARN viral. Esta isoforma ha sido menos estudiada en comparación con la proteína E6 completa, pero se ha demostrado que juega un papel importante en la transformación maligna asociada al HPV. La proteína E6* se asocia con la alteración de varias vías celulares que son cruciales para la carcinogénesis. En particular, estudios recientes han identificado que E6* tiene un impacto significativo en la señalización de la β -integrina y en las vías relacionadas con la disfunción mitocondrial, promoviendo tanto el daño en el ADN como el estrés oxidativo dentro de las células infectadas. Estos efectos pueden contribuir a la desregulación celular y a la proliferación descontrolada, características típicas de las células cancerosas. Por ejemplo, se ha observado que la sobreexposición de E6* en células de carcinoma cervical modifica la morfología celular, favoreciendo la expansión y protrusión de la membrana celular, y altera la función de las mitocondrias, lo que aumenta la susceptibilidad a daños genéticos y la evasión de mecanismos de reparación celular. Además, la reducción de la actividad de antioxidantes como el glutatión (GSH) en células que expresan E6* sugiere que esta isoforma también está involucrada en la alteración del equilibrio redox, lo que facilita la acumulación de daño genético. Estos hallazgos indican que E6* puede tener efectos oncológicos

tanto por sus propios mecanismos como por su capacidad para modificar el entorno celular en el contexto de la infección por HPV (Evans et al., 2016).

La región tardía del genoma incluye los genes L1 y L2, responsables de codificar las proteínas estructurales ya mencionadas. Su expresión ocurre en las capas más superficiales y diferenciadas del epitelio, completando así el ciclo productivo viral. Finalmente, la región LCR contiene múltiples elementos cis-regulatorios como promotores, potenciadores, sitios de unión a factores celulares y señales de poliadenilación. Esta región es clave para el control espacial y temporal de la expresión de los genes virales, respondiendo a estímulos derivados del estado de diferenciación de la célula epitelial infectada (Zhi-Ming Zheng, 2006).

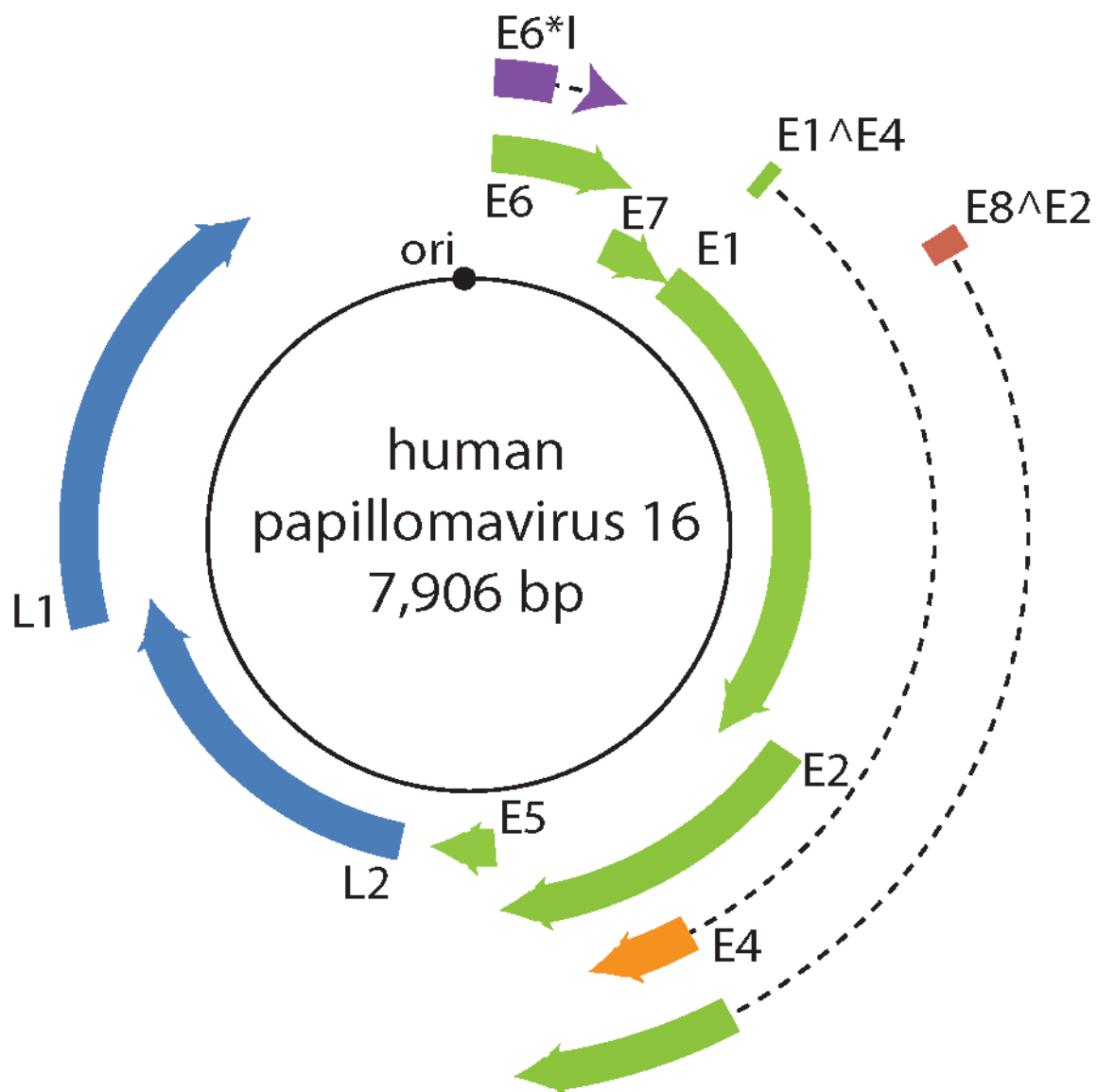


Figura 2. **Diagrama del genoma del virus del papiloma humano 16.** Se indica el ADN de doble cadena (dsDNA, por sus siglas en inglés) viral. Las cajas externas representan los ORF que codifican proteínas. Las líneas punteadas representan las

secuencias de intrones. El círculo negro indica el origen de replicación viral (ori) (Van Doorslaer et al., 2018).

1.4. Replicación viral

El HPV presenta un ciclo de replicación íntimamente relacionado con la diferenciación del epitelio escamoso. El proceso inicia cuando el virión accede a las células basales del epitelio a través de microabrasiones o heridas menores. Luego de la entrada, facilitada por la interacción del virión con proteoglicanos de heparán sulfato y mecanismos de endocitosis como la clatrina o la macropinocitosis (Raff et al., 2013), el genoma viral es transportado al núcleo, donde permanece como un episoma en bajo número de copias, evitando así la activación de la respuesta inmune (Bénéteau et al., 2021).

En las capas basales se expresan principalmente las proteínas virales tempranas E1 y E2. E1 actúa como helicasa y ATPasa iniciadora de la replicación viral, mientras que E2 regula la transcripción, replicación y mantenimiento del genoma viral, incluyendo su correcta segregación durante la división celular (Longworth y Laimins, 2004). A medida que las células migran hacia las capas parabasal e intermedia del epitelio, se incrementa la expresión de E6 y E7. Estas oncoproteínas interactúan con los reguladores del ciclo celular p53 y pRb, respectivamente, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la proliferación celular. Esto permite la amplificación del genoma viral hasta cientos de copias por célula (Jiang y Yue, 2014). En las capas superficiales se expresan las proteínas estructurales L1 y L2, que permiten el ensamblaje de nuevos viriones. Estos son liberados de forma pasiva con la descamación del epitelio, sin causar lisis celular (Harden, 2017).

En la mayoría de los casos, este ciclo productivo concluye con la regresión de la infección. Sin embargo, en infecciones persistentes por HPV de alto riesgo, puede ocurrir la integración del ADN viral en el genoma del hospedador, particularmente entre los genes E1 y E2. Esto provoca la pérdida de E2, que normalmente reprime a E6 y E7, llevando a su sobreexpresión, lo cual favorece la progresión a una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés) y carcinoma invasivo (Schiffman et al., 2007).

También se describe una forma latente de infección, donde el ADN viral permanece en células basales sin transcripción activa, pudiendo reactivarse en condiciones de inmunosupresión (Maglennon y Doorbar, 2012).

1.5. Patogenia

La patogenia del HPV se inicia con la transmisión del virus a través del contacto directo entre epitelios, generalmente durante el acto sexual. La presencia de microtraumas o abrasiones en la mucosa genital facilita el ingreso del virión a las células basales del epitelio escamoso, especialmente en regiones con alta susceptibilidad como la zona de transformación del cuello uterino. Esta región, donde coexisten y se reemplazan los epitelios escamoso y columnar, es el sitio más frecuentemente implicado en la infección persistente y el desarrollo de neoplasias cervicales (Manhart y Koutsky, 2002).

Una vez que el HPV accede a las células basales del epitelio, su genoma de ADN circular bicatenario se mantiene en forma episomal, replicándose de manera controlada junto al ciclo celular del queratinocito. Esta estrategia permite al virus persistir sin inducir una respuesta inflamatoria significativa. En las etapas iniciales de la infección, el HPV evita el reconocimiento inmune limitando la expresión de proteínas virales a niveles bajos y restringiéndola a las células basales, donde la vigilancia inmune es reducida. Además, el virus interfiere activamente con diversas rutas de detección inmunológica, como la señalización del interferón tipo I, la presentación antigénica por moléculas del MHC clase I, y la maduración de células dendríticas. A medida que las células infectadas se diferencian y migran hacia las capas más superficiales del epitelio, el HPV inicia una expresión regulada de sus genes virales, culminando en la producción de nuevas partículas sin necesidad de lisar la célula huésped, lo que contribuye a su baja inmunogenicidad (Grabowska y Riemer, 2012).

En la mayoría de los casos, esta infección es transitoria y es eliminada por el sistema inmune en un plazo de 1 a 2 años. Sin embargo, en alrededor del 10% de los casos, especialmente con genotipos de alto riesgo oncogénico, como los tipos 16, 18, 31, entre otros, la infección persiste. La persistencia viral se asocia con una alteración progresiva de la regulación del ciclo celular, mediada por las oncoproteínas virales E6 y E7. La proteína E6 interactúa con la ligasa E6-AP, induciendo la degradación de la proteína supresora de tumores p53, cuyo rol es fundamental en la detención del ciclo celular y en la inducción de apoptosis ante daño genético. La inactivación de p53 permite que células con ADN dañado continúen dividiéndose, favoreciendo la acumulación de mutaciones y la inestabilidad genómica. Por su parte, E7 se une a la pRb, interfiriendo en su capacidad de controlar el paso de la célula desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Esta unión provoca la liberación del factor de transcripción E2F, que estimula la expresión de genes requeridos para la replicación del ADN, favoreciendo la proliferación celular incontrolada. Adicionalmente, E7 puede inhibir la acción de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas como p21 y p27, lo que incrementa aún más la actividad proliferativa (Jiang y Yue, 2014).

Un evento clave en la progresión hacia HSIL y carcinoma es la integración del genoma viral al genoma del hospedador, la cual ocurre por mecanismos de recombinación no homóloga y con frecuencia interrumpe el gen E2. La pérdida de E2 elimina el control negativo sobre la expresión de E6 y E7, lo que conlleva una sobreexpresión constitutiva de estas oncoproteínas. Este fenómeno está presente en una minoría de lesiones HSIL (5–16%), pero en la mayoría de los carcinomas invasores (hasta un 87%) (Molina et al., 2024).

Durante este proceso, la infección puede evolucionar por distintos caminos: puede permanecer latente, donde el ADN viral persiste en las células basales sin expresión activa de proteínas virales, o puede desarrollarse una infección productiva con formación de nuevas partículas virales. La evolución hacia una infección abortiva, donde no se completa el ciclo replicativo pero se mantiene la expresión de E6 y E7, es la vía más común hacia la transformación maligna (Maglennon y Doorbar, 2012).

Histopatológicamente, las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LSIL, por sus siglas en inglés) representan cambios citológicos relacionados con una infección productiva, mientras que las HSIL son indicativas de un riesgo real de transformación maligna. Si bien no todas progresan a cáncer, su presencia constituye una señal de alarma, en particular cuando están involucrados genotipos altamente oncogénicos como el HPV 16 o 18. Estudios longitudinales han demostrado que las infecciones persistentes por estos genotipos conllevan un mayor riesgo de progresar a carcinoma en un lapso de varios años, si no son detectadas y tratadas a tiempo (Khan et al., 2005).

1.6. Prevención del Virus del Papiloma Humano

La prevención del HPV constituye una estrategia clave para reducir la carga global de enfermedades asociadas, especialmente el cáncer de cuello uterino. Las principales medidas preventivas incluyen la vacunación, el uso de métodos de barrera, la educación sexual integral y el tamizaje periódico. Entre ellas, la vacunación profiláctica ha demostrado ser altamente eficaz en la prevención de infecciones por los tipos de HPV más oncogénicos, en particular los genotipos 16 y 18, responsables de aproximadamente el 70% de los casos de cáncer cervicouterino a nivel mundial (Harper y DeMars, 2017). Existen actualmente tres vacunas aprobadas, bivalente, tetravalente y nonavalente, que difieren en la cantidad de tipos de HPV que cubren (Drolet et al., 2019).

En Uruguay, dos de estas vacunas (bivalente y tetravalente) están disponibles de forma gratuita en el sistema de salud pública y también pueden ser adquiridas en el sector privado. El Ministerio de Salud Pública recomienda su aplicación a niños,

adolescentes y adultos entre los 11 y los 26 años, en un esquema de dos dosis separadas por al menos seis meses. También está permitida su administración en mujeres y hombres fuera de este rango etario, aunque en estos casos el esquema es de tres dosis (MSP, 2023). Es fundamental resaltar que estas vacunas no tienen efecto terapéutico, es decir, no eliminan infecciones ya establecidas, sino que previenen la adquisición de nuevas infecciones por los tipos incluidos. Por lo tanto, para maximizar su eficacia, se recomienda su aplicación antes del inicio de la vida sexual, cuando aún no ha habido exposición al virus.

Además de la vacunación, el uso correcto del preservativo reduce, aunque no elimina completamente, el riesgo de transmisión del HPV, ya que el virus puede infectar zonas no cubiertas por el condón. La educación sexual integral es también una herramienta esencial, ya que promueve decisiones informadas y comportamientos sexuales responsables, especialmente en adolescentes y jóvenes. Por último, el tamizaje cervical mediante la prueba de Papanicolaou o el test de ADN para HPV permite detectar infecciones y lesiones precancerosas de forma precoz y tratarlas antes de que progresen a cáncer invasivo (OMS/OPS, 2023).

1.7. Epidemiología

1.7.1. Epidemiología mundial

El HPV es considerado la infección viral de transmisión sexual más común a nivel global. Se estima que cerca del 80% de las personas sexualmente activas adquirirán la infección en algún momento de sus vidas (CDC, 2024). La carga de enfermedad atribuible al HPV es sustancial, siendo responsable de aproximadamente 660.000 casos de cáncer por año, de los cuales la mayoría corresponden al cáncer de cuello uterino, que constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (WHO, 2024). En regiones de bajos y medianos ingresos, como África subsahariana, América Latina y el sudeste asiático, la incidencia y mortalidad por cáncer cervical es notoriamente superior, lo que evidencia una fuerte inequidad en el acceso a la prevención y el tratamiento (Serrano *et al.*, 2018). Además, el HPV está vinculado a otros cánceres anogenitales (vulva, vagina, pene, ano) y orofaríngeos, afectando también de forma significativa a la población masculina (CDC, 2024).

Los estudios de prevalencia global muestran que las infecciones por HPV son más frecuentes en mujeres jóvenes, alcanzando un pico entre los 20 y 24 años, para luego disminuir con la edad (Bruni *et al.*, 2010). Sin embargo, la persistencia de la infección, particularmente de tipos de alto riesgo como el HPV-16 y el HPV-18, es el factor determinante para el desarrollo de lesiones precursoras y cáncer. Desde la

perspectiva de la epidemiología molecular, los genotipos del virus del papiloma humano se clasifican en alto y bajo riesgo oncogénico según su capacidad para inducir transformación maligna. Los genotipos de alto riesgo, como HPV-16 y HPV-18, se asocian con aproximadamente el 70% de los cánceres cervicales a nivel mundial, debido a su capacidad de integrar su ADN en el genoma del huésped y expresar oncoproteínas E6 y E7 con alta afinidad por las proteínas supresoras tumorales p53 y pRb. Otros tipos como HPV-31, 33, 45, 52 y 58 también presentan una distribución significativa, especialmente en regiones como Asia, América Latina y África, donde contribuyen a lesiones intraepiteliales de alto grado (Wei et al., 2024; Osmani et al., 2025). Por otro lado, los genotipos de bajo riesgo, principalmente HPV-6 y HPV-11, están vinculados a lesiones benignas como condilomas acuminados y papilomatosis respiratoria recurrente. Estos tipos, aunque altamente prevalentes en poblaciones sexualmente activas, especialmente en jóvenes, presentan una escasa capacidad oncogénica debido a una menor eficiencia en la integración genómica y menor actividad transformante de sus proteínas virales (Bruni et al., 2023). Si bien no están implicados en cánceres invasivos, su impacto clínico y psicológico es relevante. La vigilancia molecular mediante técnicas de PCR y secuenciación permite caracterizar la distribución de estos genotipos y evaluar la eficacia de las vacunas profilácticas multivalentes, como la nonavalente, que cubre tanto tipos de alto como de bajo riesgo, contribuyendo así al control integral de las infecciones por HPV.

Se ha observado también un aumento en la incidencia de cáncer orofaríngeo relacionado a HPV, especialmente en hombres de países desarrollados (Chaturvedi et al., 2011). A pesar de la disponibilidad de vacunas profilácticas altamente efectivas, la cobertura vacunal global sigue siendo insuficiente, con marcadas diferencias regionales, lo que limita la reducción de la carga de enfermedad asociada al HPV a nivel mundial (Bruni et al., 2016).

1.7.2. Epidemiología en Uruguay

En Uruguay, el cáncer de cuello uterino es un problema relevante de salud pública, aunque su incidencia y mortalidad han mostrado una tendencia descendente en las últimas décadas. Según datos del Registro Nacional de Cáncer, este tipo de cáncer ocupa el tercer lugar en frecuencia entre las mujeres de 15 a 44 años, con una tasa ajustada de incidencia de aproximadamente 14,4 por 100.000 mujeres y una tasa de mortalidad cercana a 6,4 por 100.000 (ICO/IARC HPV Information Centre, 2023). A pesar de que Uruguay cuenta con programas de tamizaje mediante Papanicolaou desde hace años, aún persisten inequidades en la cobertura y seguimiento de las mujeres en situación de vulnerabilidad. Estudios realizados en población femenina uruguaya han reportado 312 nuevos casos anuales de cáncer de cuello de útero,

con un promedio de 134 mujeres fallecidas por año debido a esta enfermedad. En términos de incidencia, ocupa el tercer lugar entre los cánceres más comunes en mujeres uruguayas, después del cáncer de mama y el colorrectal. La infección por el HPV es la causa identificada de este tipo de cáncer (Muñoz et al., 2003; Rodríguez et al., 2019).

También se destaca un trabajo realizado entre 2014 y 2017, donde se estudiaron 1.010 mujeres asintomáticas entre 30 y 64 años que concurrieron a realizarse el test de Papanicolaou (PAP) a dos unidades de toma de muestras del Programa de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino. El 12,5% de las mujeres examinadas resultaron con un test positivo de HPV y el 16,5% resultaron con un PAP anormal. Esta diferencia se explica porque el PAP tiende a generar un mayor número de resultados anormales, particularmente en la categoría de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US, por sus siglas en inglés), que incluye alteraciones citológicas inespecíficas y de bajo valor predictivo. Según el estudio, estos diagnósticos contribuyen significativamente al aumento en el porcentaje de PAP alterados, aunque no se traducen necesariamente en una mayor detección de lesiones precursoras del cáncer (CIN2+). En cambio, el test de HPV, con menor proporción de resultados positivos, mostró una mayor sensibilidad diagnóstica al identificar el 100% de los casos de CIN2+ confirmados por biopsia, lo que lo convierte en una herramienta más eficaz y eficiente para el tamizaje primario (Rodríguez et al., 2019).

Otros estudios en Uruguay han determinado la frecuencia de infección por HPV en muestras de lesiones de cuello uterino de mujeres con una positividad del 21% al 42%. Si bien este rango puede considerarse bajo considerando el rol etiológico del HPV, existen distintas razones que lo justifican. En primer lugar, es posible que el virus haya estado presente en etapas iniciales y haya sido eliminado por el sistema inmunológico, persistiendo la lesión pero sin detección del ADN viral. En segundo lugar, pueden existir limitaciones técnicas en la toma, conservación o procesamiento de la muestra, que dificultan la detección del virus. Finalmente, aunque es poco frecuente, no puede descartarse que algunas lesiones de bajo grado tengan un origen no vinculado al HPV. En estos estudios el genotipo más prevalente fue el 16, aunque también fue detectada la circulación de otros genotipos tales como el 68, 58, 6, 61, 11, 16, 31, 51, 56 y 39 (Ramas et al., 2013; Berois et al., 2014; Pérez et al., 2020).

En Uruguay, la investigación sobre el HPV ha avanzado en los últimos años, incluyendo no solo estudios clínicos y epidemiológicos, sino también aproximaciones desde la vigilancia ambiental. Un estudio destacado es el realizado por Victoria et al. (2022), que investigó la presencia de genotipos de alto riesgo de HPV en aguas residuales de la ciudad de Salto. Utilizando técnicas moleculares, los autores detectaron una alta abundancia de ADN de HPV oncogénicos en muestras de aguas residuales, principalmente los genotipos HPV-16 y HPV-31, lo que refleja

una circulación significativa del virus en la población. Este hallazgo es relevante desde una perspectiva de salud pública, ya que demuestra que el monitoreo ambiental puede ser una herramienta complementaria para evaluar la circulación comunitaria de virus oncogénicos y apoyar estrategias de prevención. Además, el estudio resalta la persistencia de los genotipos de alto riesgo en el ambiente y sugiere que las aguas residuales pueden ser un reservorio importante para la vigilancia molecular del HPV en poblaciones urbanas. Este enfoque innovador complementa la información obtenida por métodos clínicos y epidemiológicos tradicionales, y podría contribuir a una caracterización más amplia del impacto del HPV en Uruguay.

1.7.3. Epidemiología ambiental del HPV

En las últimas décadas, el monitoreo ambiental de virus humanos a través de aguas residuales se ha convertido en una herramienta clave para la vigilancia epidemiológica, particularmente para el rastreo de enfermedades virales en poblaciones humanas. El HPV, tradicionalmente estudiado por su transmisión sexual y su relación con diversos tipos de cáncer, especialmente el de cuello uterino, ha sido recientemente detectado en aguas residuales, lo cual abre nuevas perspectivas en el campo de la epidemiología ambiental. Esta línea de investigación se ha beneficiado del desarrollo de tecnologías moleculares como la PCR y la secuenciación genómica, que permiten detectar e identificar con precisión diferentes genotipos virales presentes en muestras ambientales (La Rosa et al., 2013).

Estudios internacionales han evidenciado la presencia tanto de genotipos mucosos como cutáneos del HPV en aguas residuales no tratadas, lo que sugiere que las heces humanas, las secreciones vaginales, la orina o incluso el lavado corporal podrían contribuir a la descarga del virus al sistema cloacal. Un ejemplo destacado proviene de Italia, donde se identificaron múltiples genotipos de HPV, incluyendo aquellos de alto riesgo oncogénico como el genotipo HPV-16, en sistemas de alcantarillado urbano (La Rosa et al., 2013). Esta detección plantea preguntas relevantes sobre la viabilidad del virus en ambientes acuáticos y su posible papel como marcador de salud pública. Hasta el momento, la estabilidad del HPV en muestras de agua residual no es clara. Sin embargo, un estudio detectó al HPV-16 manteniéndose infeccioso por al menos siete días en superficies húmedas, aunque con baja infectividad (Ding et al., 2011).

En Uruguay, un estudio piloto realizado en la ciudad de Salto evidenció una alta frecuencia de genotipos de HPV de alto riesgo en aguas residuales, lo que refleja una circulación significativa del virus en la población local y subraya la importancia de la vigilancia ambiental como herramienta para la salud pública (Victoria et al., 2022).

Desde un enfoque preventivo, esta forma de vigilancia puede servir para anticipar situaciones de salud pública, actuar como sistema de alerta temprana ante brotes virales y contribuir a la comprensión de la exposición a virus humanos a través de medios distintos al contacto sexual. No obstante, persisten desafíos importantes: se desconoce si el HPV presente en aguas residuales mantiene su infectividad y cuál es su estabilidad en ambientes acuáticos.

1.8. Relevancia de este estudio

La relevancia de este estudio radica en su aporte al conocimiento epidemiológico del HPV mediante una metodología innovadora y no invasiva como es la vigilancia en aguas residuales. La alta carga sanitaria y social que implica esta infección, sumada a la existencia de múltiples genotipos con distintos niveles de riesgo, hace necesario el desarrollo de estrategias más amplias y representativas. En este sentido, la implementación de EBAR ofrece una herramienta complementaria a los métodos clínicos tradicionales, permitiendo estimar la circulación viral en la comunidad a partir de material genético excretado por individuos infectados, sin requerir muestreo individual o consentimiento informado. Esta aproximación resulta relevante en regiones donde el acceso al sistema de salud se ve limitado o donde el estigma asociado a las ITS dificulta la participación en estudios convencionales.

Además, la detección y tipificación del HPV en aguas residuales mediante técnicas moleculares como PCR y secuenciación masiva no solo permite identificar el virus, sino también discriminar qué genotipos están activos en una población determinada. Esta información es fundamental para evaluar el impacto de las campañas de vacunación, identificar posibles brechas de cobertura inmunológica y anticipar riesgos asociados a la emergencia de aquellos genotipos de alto riesgo. En el caso de la ciudad de Salto, Uruguay, este estudio representa un esfuerzo pionero por caracterizar la circulación del HPV a nivel ambiental, generando datos locales que pueden ser de gran utilidad para las autoridades sanitarias. Al realizar el muestreo en la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), que cuenta con una cobertura de saneamiento representativa del 86% de la ciudad, los resultados obtenidos reflejan el estadio epidemiológico de una amplia proporción de la población urbana. Esto resulta relevante dado que, hasta la fecha, existe escasa información publicada sobre la circulación del HPV en el interior del país, por lo que este trabajo contribuye a llenar un vacío de conocimiento y promueve una vigilancia más equitativa a nivel nacional.

2. Hipótesis

Como hipótesis de este trabajo nos planteamos que el HPV está presente y puede ser detectado en las aguas residuales de Salto, Uruguay, y los genotipos identificados pueden utilizarse como herramienta de monitoreo ambiental para estimar su circulación en la población.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

El objetivo general de esta investigación fue estudiar los genotipos circulantes del virus del papiloma humano en las aguas residuales de la ciudad de Salto, Uruguay como reflejo de la circulación viral en la población.

3.2. Objetivos específicos

1. Detectar los diferentes genotipos del virus del papiloma humano en aguas residuales de la ciudad de Salto.
2. Realizar la cuantificación del virus presente en las muestras de aguas residuales de la ciudad de Salto.
3. Analizar la distribución estacional de los genotipos detectados.

4. Materiales y métodos

4.1. Recolección de muestras

Previo al inicio de esta pasantía, se llevó a cabo un proceso de recolección de muestras de agua residual. Las muestras se obtuvieron con una frecuencia mensual durante un período de doce meses, desde agosto de 2022 a julio de 2023, abarcando así las posibles variaciones estacionales que pudieran influir en la detección del material genético viral. En cada ocasión, se recolectó un volumen de 500 mililitros de agua residual, lo que permitió asegurar una cantidad suficiente de material para realizar los análisis moleculares posteriores.

La colecta se realizó en los afluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Salto de OSE, ubicada en el departamento homónimo, al noroeste del país. Este punto de muestreo fue seleccionado por su capacidad para captar el ingreso de aguas servidas de una amplia zona urbana, representando así una muestra compuesta del 86% de la población salteña. Para garantizar la calidad de las muestras, se siguieron protocolos estandarizados de recolección, transporte y conservación, incluyendo la refrigeración inmediata de las muestras a 4 °C y su posterior traslado al laboratorio.

4.2. Concentración viral

Las muestras de aguas residuales recolectadas fueron sometidas a un proceso de concentración viral con el objetivo de incrementar la cantidad de material genético disponible para los análisis moleculares posteriores. Se utilizó el método de precipitación con polietilenglicol (PEG), una técnica ampliamente empleada en virología ambiental por su eficacia en la concentración de partículas virales desde muestras de aguas residuales.

El procedimiento se basó en el protocolo descrito por Lewis y Metcalf (1988), con modificaciones adaptadas del método empleado por Masachessi et al. (2022), específicamente diseñado para optimizar su aplicación en muestras urbanas de aguas residuales. Inicialmente, cada muestra de 500 mL fue dividida en dos botellas de centrífuga de 250 mL, equilibradas por peso. Se adicionaron 50 µL del fago PP7 como control del proceso. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, tras lo cual se recuperó el sobrenadante (S1), que se conservó a 4 °C.

El pellet resultante fue tratado con una solución compuesta por extracto de carne al 3% en nitrato de sodio 2 M (pH 5,5), en una proporción 1:3 respecto al peso del pellet. La mezcla fue homogeneizada e incubada durante una hora a 4 °C con agitación constante, y luego se centrifugó a 8300 rpm durante 20 minutos. El

segundo sobrenadante (S2) fue combinado con el primero (S1) y se ajustó su pH a un rango de 6,5–7,2.

A la mezcla combinada se le añadió PEG 6000 al 10% (p/v) y cloruro de sodio al 2% (p/v), seguido de agitación a temperatura ambiente y posterior incubación por dos horas a 4 °C. Luego, se realizó una centrifugación a 12000 × g durante 20 minutos a 4 °C. El pellet resultante fue resuspendido en solución tampón PBS (pH 7,4) en una proporción de 1/100 respecto al volumen original de la muestra (5 mL por cada 500 mL), y su pH fue ajustado a 8,0. Tras una nueva incubación con agitación y centrifugación final a 8300 rpm, se obtuvo el concentrado viral final, equivalente a una concentración de aproximadamente 100 veces respecto al volumen inicial.

Este método permitió una recuperación eficiente de partículas virales, favoreciendo la detección molecular mediante técnicas como la PCR, especialmente útil en contextos de baja carga viral o distribución heterogénea de los patógenos.

4.3. Extracción de ácidos nucleicos

Tras la etapa de concentración viral, se procedió a la extracción de ácidos nucleicos a partir del concentrado obtenido de cada muestra de agua residual. Para esto se utilizó un kit comercial basado en tecnología de columnas de sílice. Esta metodología se basa en la afinidad de los ácidos nucleicos por las membranas de sílice en presencia de soluciones con altas concentraciones de sales caotrópicas, lo que permite su adsorción selectiva, seguida de una serie de pasos de lavado para eliminar impurezas, y una elución final en un buffer libre de nucleasas.

Este tipo de abordaje ha demostrado ser eficiente para el análisis molecular de virus en ambientes acuáticos, particularmente cuando la carga viral es baja o está diluida. La pureza y concentración del material genético obtenidas mediante este sistema son adecuadas para su uso en técnicas sensibles de amplificación como la PCR y secuenciación, lo cual es fundamental para garantizar la fiabilidad de los resultados en estudios de vigilancia virológica ambiental.

Para ello, se utilizó el kit QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®), cuyo protocolo consta de una etapa inicial donde se mezclan 140 µL de muestra con 560 µL de un buffer de lisis (AVL) que contiene carrier RNA, lo que permite desnaturalizar las proteínas, inactivar ARNasas y facilitar la unión del ARN viral al material de la columna. Tras una incubación a temperatura ambiente, se agregó etanol absoluto para promover la unión del ARN a la membrana de sílice, siendo aplicado en dos tandas sobre la columna QIAmp, la cual fue centrifugada para retener el ARN. A continuación, se realizaron dos lavados secuenciales utilizando los buffers AW1 y AW2 para eliminar impurezas y posibles inhibidores. Finalmente, el ARN viral fue eluido mediante la adición de 60 µL de buffer libre de nucleasas (AVE).

4.4. Síntesis de cDNA a partir de ARN viral

Con el objetivo de detectar la presencia del marcador viral PP7 mediante PCR, fue necesario convertir previamente el ARN viral extraído en ADN complementario (cDNA), ya que la PCR solo puede amplificar ácidos nucleicos de cadena doble. Para ello, se empleó el kit RevertAid™ RT (Thermo Scientific) utilizando primers randómicos pd(N)6, los cuales permiten una retrotranscripción no dirigida que abarca todo el contenido de ARN presente en la muestra. La reacción se inició mezclando 10 µL de ARN eluido con 4 µL de pd(N)6 (50 ng/µL), seguida de una desnaturalización térmica a 96 °C durante 5 minutos y un enfriamiento rápido a 0 °C durante 4 minutos, lo que favorece el apareamiento de los primers. A continuación, se agregó una mezcla que contenía buffer, dNTPs, agua libre de RNAasas y transcriptasa reversa RevertAid, alcanzando un volumen final de 50 µL. La reacción de síntesis del cDNA se llevó a cabo con un programa de incubación que incluyó 5 minutos a 25 °C, 60 minutos a 42 °C, y una etapa final de inactivación enzimática a 70 °C por 5 minutos.

4.5. Amplificación por PCR

4.5.1. Detección por PCR del HPV

Una vez completado el proceso de extracción de ácidos nucleicos, se procedió a la amplificación del ADN viral empleando la técnica de PCR, una herramienta altamente sensible y específica para la detección de material genético de origen viral en matrices ambientales complejas como las aguas residuales. En este estudio se utilizó el protocolo desarrollado por van den Brule et al. (2002), el cual ha sido ampliamente validado en investigaciones clínicas y epidemiológicas para la detección de múltiples genotipos del HPV. Este protocolo se basa en el uso de los cebadores genéricos GP5+ y GP6+, que permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 140 pares de bases dentro de una región altamente conservada del gen L1. Esta región codifica la proteína mayor de la cápside viral, una estructura fundamental para la integridad y antigenicidad del HPV, y constituye un blanco óptimo para la identificación molecular y la clasificación filogenética de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico (Schmitt et al., 2008).

Para mejorar la sensibilidad de detección, se utilizó la técnica de PCR anidada (nested PCR), la cual consiste en realizar dos rondas sucesivas de amplificación con dos pares de cebadores diferentes. El primer par amplifica una región más amplia del ADN blanco, mientras que el segundo par se encuentra ubicado dentro del producto amplificado inicialmente, lo que permite amplificar específicamente un

segmento interno del mismo (Fuessel Haws et al., 2004). Este enfoque incrementa la especificidad y sensibilidad de la detección, minimizando el riesgo de amplificación inespecífica y permitiendo detectar secuencias blanco incluso en muestras con baja carga viral o ADN degradado (Coser et al., 2010).

La técnica PCR empleada se optimizó previamente en el Laboratorio de Virología Molecular, donde se ajustaron las condiciones de amplificación, incluyendo la concentración de cebadores, la composición del mix de reacción, los parámetros térmicos y la incorporación de controles positivos y negativos para cada corrida. Se aplicó un protocolo de PCR anidada, que consta de dos rondas sucesivas de amplificación. En la primera ronda, se utilizó un mix de 20 µL que incluye los cebadores MY09 y MY11, DMSO y un kit comercial llamado MangoMix™ que contiene una mezcla de dNTPs, tampón de reacción, MgCl₂ y Taq polimerasa. A esta mezcla se le añadió ADN molde, y se sometió a ciclos térmicos que incluyen desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 46 °C por 45 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una extensión final a 72 °C por 5 minutos y conservación a 4 °C indefinidamente.

La segunda ronda utilizó los cebadores GP5+ y GP6+ en una mezcla de reacción de 22 µL compuesta por MangoMix™, los cebadores y DMSO. A esta mezcla se le añadieron 3 µL de la primera ronda de PCR como molde. Las condiciones térmicas iniciaron con una desnaturalización a 95 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 48 °C por 4 segundos, 38 °C por 30 segundos, 42 °C por 5 segundos, 66 °C por 5 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C y posterior conservación a 4 °C.

Este protocolo permite la obtención de bandas de 449 pb para la primera ronda (MY09/MY11) y de 140 pb para la segunda (GP5+/GP6+), lo que mejora la sensibilidad de detección de HPV incluso en muestras con baja carga viral, consolidándose como una herramienta eficaz para estudios de vigilancia ambiental.

Adicionalmente, se realizó una PCR en tiempo real utilizando el protocolo descrito por de Araujo et al. (2009), con el mix SensiFAST SYBR® No-ROX y los cebadores GP5+ y GP6+. La mezcla de reacción final fue de 15 µL, a la que se añadieron 5 µL de ADN molde. El protocolo consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 48 °C por 10 segundos y 72 °C por 20 segundos. Se realizó una curva de melting que va desde 65 °C hasta 95 °C con incrementos de 0.5 °C/segundo. Las muestras positivas se identificaron por un melting entre 77 °C y 82 °C, mientras que los dímeros de cebadores mostraron un melting a 73 °C.

4.5.2. Detección por PCR del PP7 (control del proceso)

Como control del proceso se empleó la detección del bacteriófago PP7 por qPCR, evaluando así la eficiencia del proceso de concentración, extracción y detección molecular de ácidos nucleicos en muestras ambientales, tal como se describe en Rajal et al. (2007). Como virus ARN que infecta *Pseudomonas aeruginosa*, PP7 presenta características fisicoquímicas similares a las de virus humanos como el poliovirus, incluyendo un tamaño aproximado de 25 nm. Estas propiedades lo convierten en un sustituto adecuado para evaluar la eficiencia de recuperación durante la concentración por ultrafiltración. Además su ausencia natural en aguas residuales permite su detección sin falsos positivos (Morales-Morales et al., 2003; Rajal et al., 2007). Se utilizó un sistema de qPCR basado en sondas TaqMan dirigido al gen de la replicasa del PP7, siguiendo un protocolo optimizado que incluyó una reacción de 20 µL compuesta por SensiMix II Probe 2X, los primers 247f y 320r, una sonda marcada con HEX (274p), agua libre de ARNasa y 4 µL de molde. Los ciclos térmicos consisten en una primera instancia de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 50 segundos para la hibridación y la extensión. La inclusión de PP7 como estándar interno permite estimar eficiencias de recuperación y efectos inhibitorios.

4.6. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de amplicones

Una vez finalizada la nested PCR, los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa, una técnica estándar para la separación y visualización de ácidos nucleicos según su tamaño molecular. Se utilizó un gel al 2% de agarosa teñido con Good View o GelRed™ que fue corrido por una hora, lo cual permitió visualizar los amplicones específicos del HPV bajo luz ultravioleta. Esta etapa resulta fundamental para confirmar la presencia del fragmento amplificado correspondiente a la región del gen L1, previamente seleccionada en la PCR, y para verificar la especificidad de la amplificación.

Los fragmentos que mostraron bandas de tamaño esperado, en este caso de aproximadamente 140 pb, fueron posteriormente purificados utilizando un kit comercial de purificación de ADN, basado en la tecnología de unión a columnas de sílice. En este estudio, se empleó el kit Zymo Research DNA Clean & Concentrator. Esta metodología permite eliminar eficientemente contaminantes como cebadores, nucleótidos libres, enzimas y sales, que podrían interferir en procesos posteriores como la secuenciación o genotipificación.

4.7. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN del HPV amplificado por PCR se realizó mediante el análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Good View o GelRed™ para la visualización del ADN bajo luz ultravioleta. Los productos de PCR correspondientes a cada muestra fueron cargados junto a un marcador de peso molecular (DNA ladder, por sus siglas en inglés) con bandas de concentración conocidas, como el GeneRuler 100 bp de DNA Ladder, el cual contiene fragmentos de ADN con pesos moleculares y cantidades específicas (en ng/0,5 µg de carga). Esto permitió estimar de forma visual la cantidad relativa de ADN presente en cada muestra. La intensidad de fluorescencia de las bandas observadas en las muestras fue comparada con las bandas del marcador que servían como referencia, en particular aquellas bandas resaltadas como estándar de cuantificación (por ejemplo, las bandas de 500 bp con 40 ng y 1000 bp con 45 ng). Aquellas muestras cuya banda presentó una fluorescencia similar o superior al umbral de referencia fueron consideradas adecuadas para su posterior secuenciación.

Este método semi-cuantitativo permite verificar simultáneamente la presencia, el tamaño esperado y la concentración aproximada de los amplicones generados.

4.8. Secuenciación y análisis bioinformático

Finalmente, para la caracterización de los genotipos de HPV presentes en muestras ambientales, se empleó la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés). Los amplicones obtenidos de cada estación del año fueron cuantificados mediante fluorometría (Qubit, ThermoFisher Scientific) y posteriormente agrupados en proporciones equimolares. Los amplicones fueron mezclados equimolarmente según la estación del año y secuenciados de esa manera, obteniendo un total de cuatro muestras de NGS. Las bibliotecas fueron preparadas utilizando el kit TruSeq Nano DNA (Illumina) y secuenciadas en el sistema HiSeq2500 con lecturas pareadas de 100 pb. Las secuencias crudas fueron procesadas utilizando el software Geneious Prime® 2021, que permitió el recorte de adaptadores, eliminación de duplicados, ensamblado de lecturas pareadas y eliminación de secuencias quiméricas. Para la asignación de genotipos, se construyó una base de datos de referencia personalizada con 442 genomas completos de HPV obtenidos del repositorio PapillomaVirus Episteme (PaVE), contra la cual se alinearon las lecturas curadas.

5. Resultados

En este estudio, se analizó la presencia del HPV en un total de 12 muestras, recolectadas mensualmente en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de OSE de la ciudad de Salto. Como parte del control del proceso de concentración, extracción y detección, en todas las muestras se evaluó la presencia del fago PP7 (Figura 3). Los resultados mostraron que el control fue exitosamente recuperado en el 100% de las muestras analizadas, evidenciando una eficiencia adecuada y constante en el procedimiento metodológico empleado a lo largo del año. La cuantificación de PP7 arrojó valores en un rango de $7,1 \times 10^6$ a 5.6×10^7 copias genómicas/mL. Las oscilaciones observadas en la cuantificación del fago PP7 a lo largo del año se deben principalmente a la variabilidad de la matriz de las muestras, que puede afectar la eficiencia de filtración, extracción y amplificación. Factores como la presencia de inhibidores, cambios estacionales en la composición del agua, así como algunas diferencias operativas también contribuyen a éstas fluctuaciones. Sin embargo, la detección constante del control en todas las muestras valida la robustez del procedimiento metodológico.

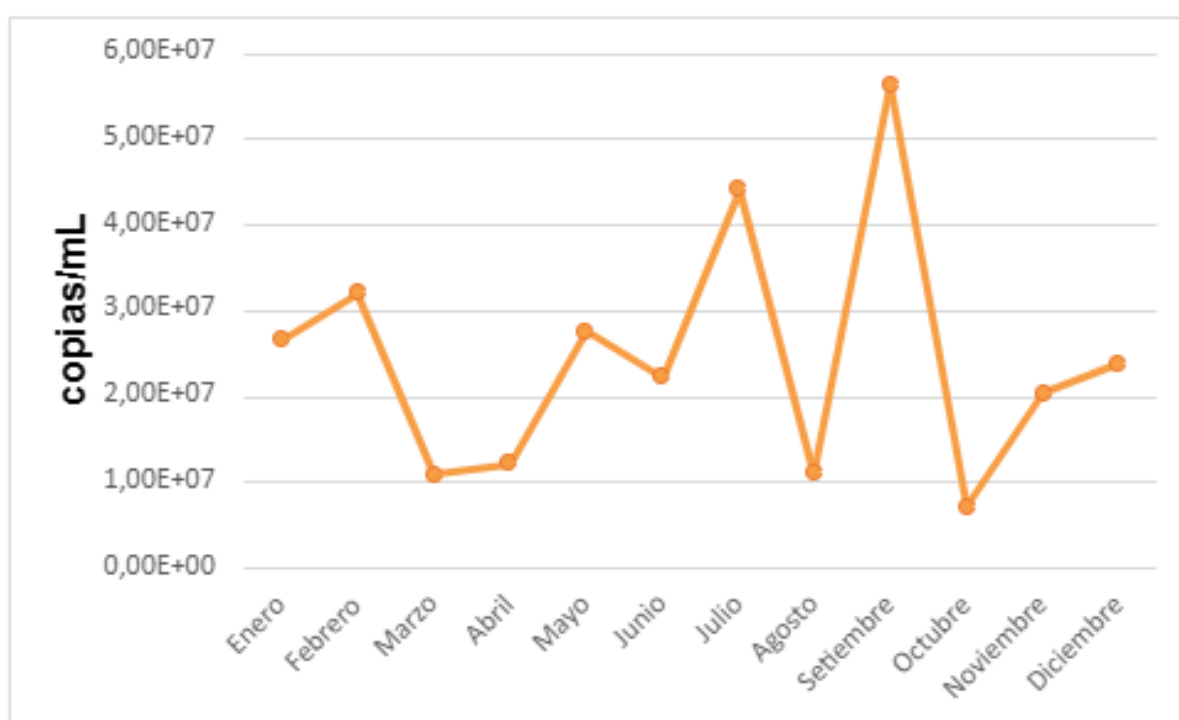


Figura 3. **Cuantificación del fago PP7 como control del proceso en muestras analizadas durante un año.** La gráfica muestra las concentraciones de PP7 (copias genómicas/mL) recuperadas en cada mes del año.

En cuanto a la detección del HPV, se observó una presencia positiva en 9 de las 12 muestras analizadas (75%), indicando una circulación frecuente de este virus en la

comunidad durante el período de estudio. La confirmación de la presencia de HPV se realizó mediante PCR utilizando los primers GP5+/GP6+, y los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 4). Se observaron bandas correspondientes al tamaño esperado (~150 pb), lo que respalda la validez de los resultados de cuantificación. La cuantificación del HPV en las muestras positivas (Figura 5) mostró una distribución desigual a lo largo del tiempo, con concentraciones que van desde 8967 a 23 copias genómicas/L.

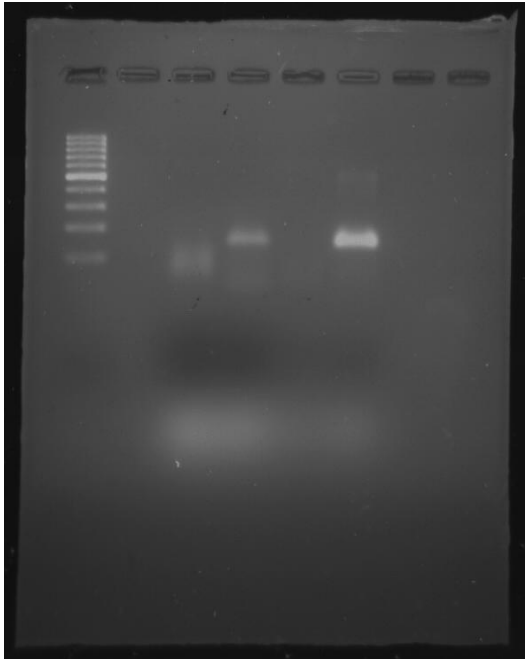


Figura 4. **Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para detección de HPV utilizando los primers GP5+/GP6+.** En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb), en el carril 4 una muestra positiva, en el 5 el control negativo y en el 6 el control positivo (banda de 140 pb).

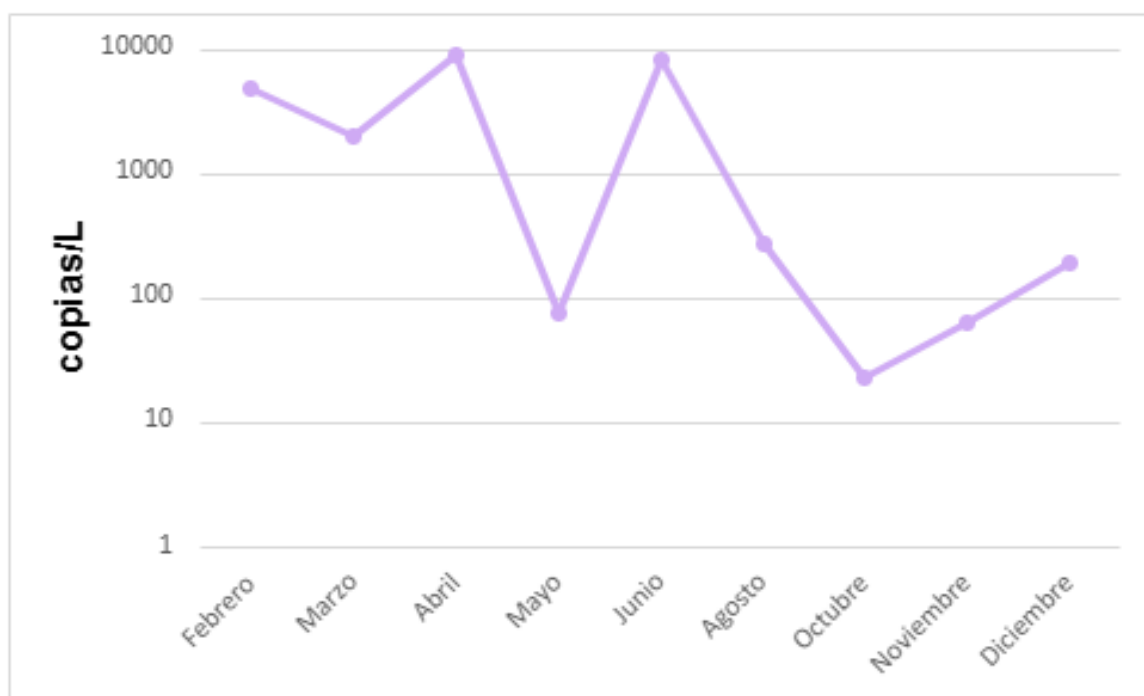


Figura 5. **Cuantificación del HPV en muestras positivas a lo largo del tiempo.** Se muestra la concentración de HPV (copias genómicas/L) en los distintos meses del año.

Para caracterizar en mayor profundidad la diversidad del HPV presente en las aguas residuales, se realizó un mapeo de las secuencias obtenidas contra una base de datos personalizada de genotipos de HPV. Se identificaron un total de 258.866 lecturas correspondientes a 28 genotipos distintos, de los cuales 9 pertenecían a genotipos de alto riesgo oncogénico, 6 a bajo riesgo, y 13 no clasificados como HPV-HR ni HPV-LR (Figura 6). Este hallazgo refleja una importante diversidad genética del HPV en la población local.

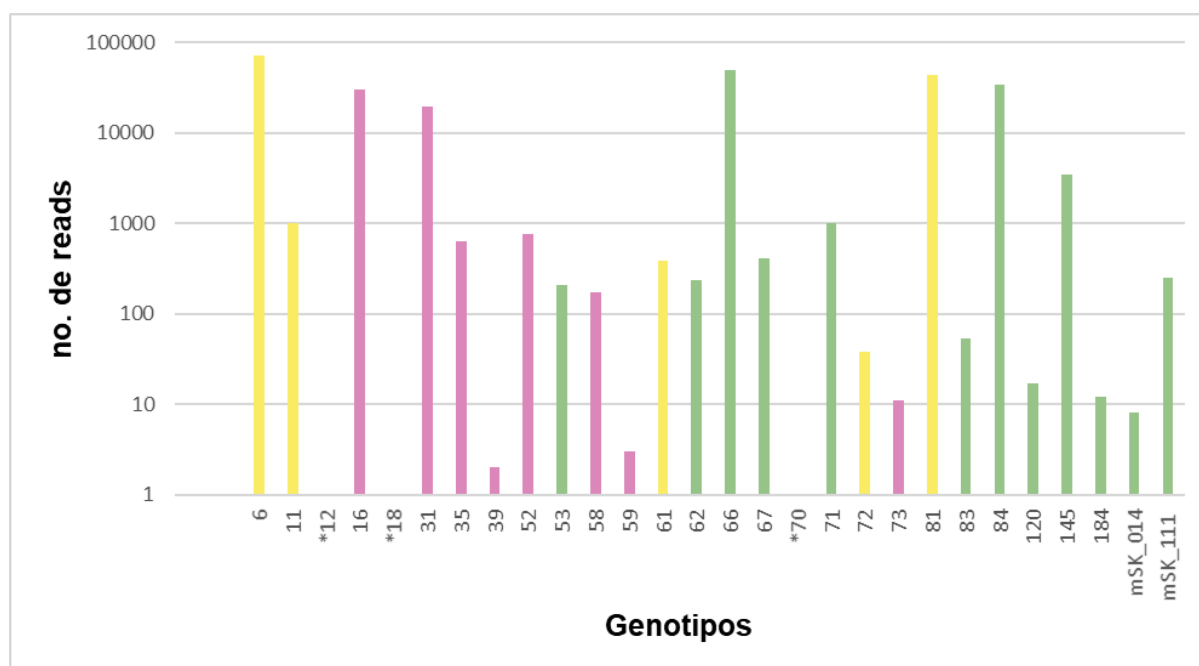
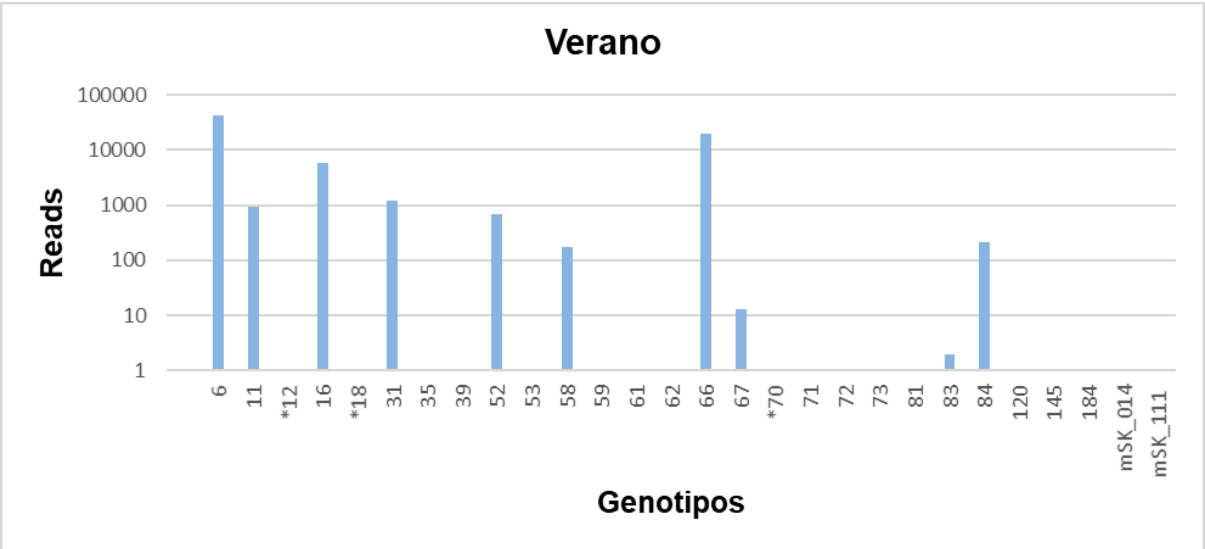
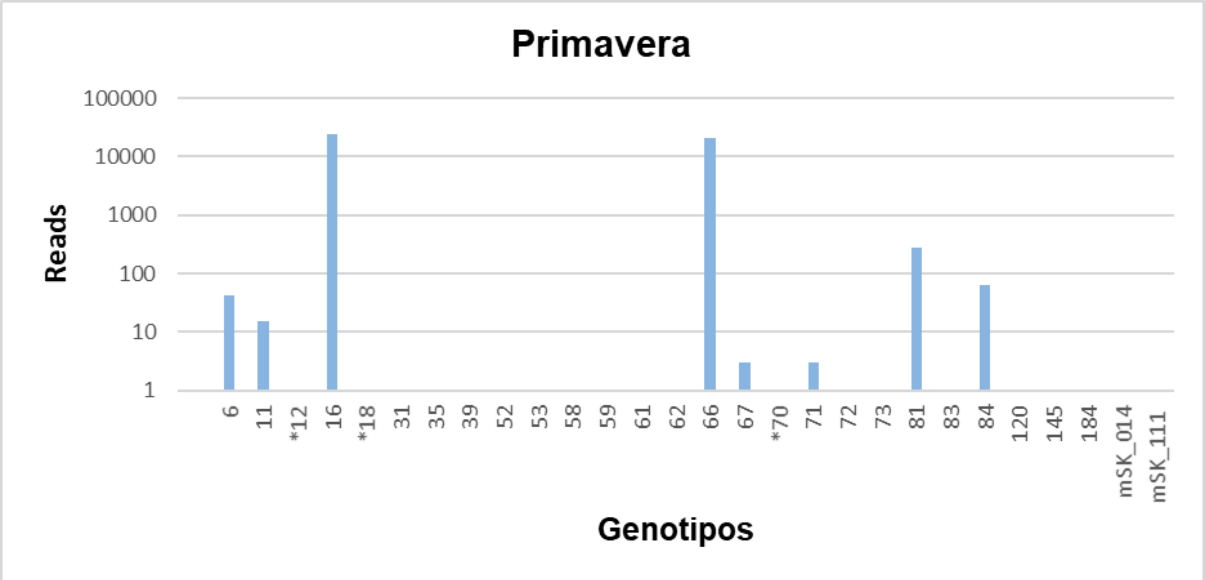
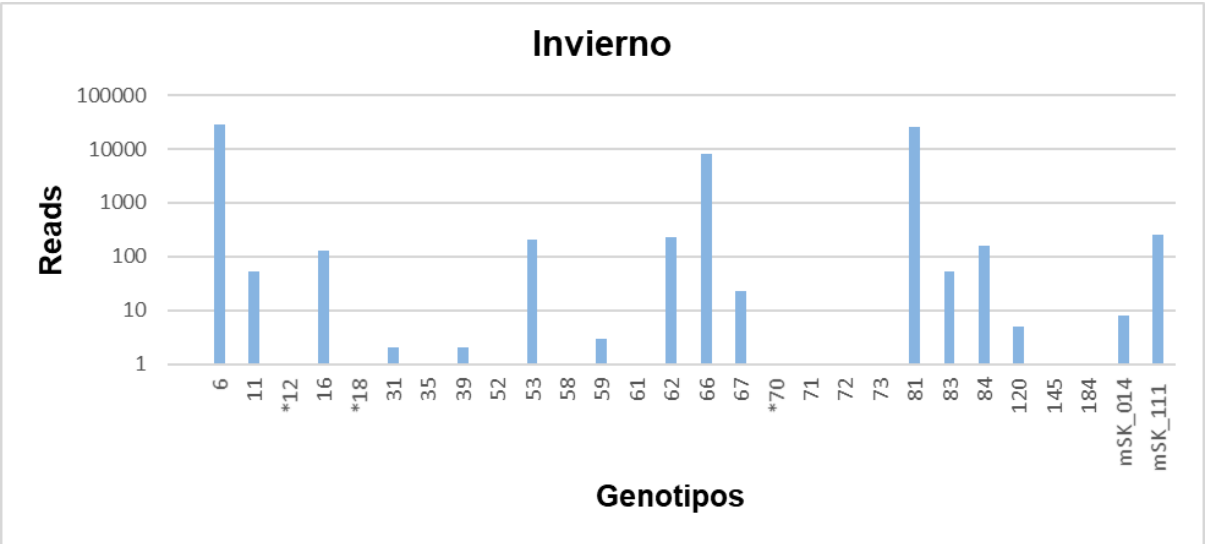


Figura 6. Distribución de los genotipos detectados en las muestras de aguas residuales. En rosado se indican los genotipos de alto riesgo (HPV-HR), en amarillo los genotipos de bajo riesgo (HPV-LR) y en verde los genotipos que no pertenecen a ninguna de estas dos categorías. *: genotipos con una sola lectura.

Para un análisis más detallado, los genotipos detectados en las aguas residuales se examinaron según las cuatro estaciones del año. En invierno, los genotipos más frecuentes fueron HPV-6, 66 y 81; en primavera, HPV-16 y 66; en verano, HPV-6, 16, 31 y 66; y en otoño, se observó una mayor diversidad con la presencia frecuente de los genotipos HPV-6, 31, 66, 81, 84 y 145 (Figura 7). Considerando únicamente los genotipos más frecuentes (con un mínimo de 1000 reads), podemos observar que el genotipo HPV-66 fue detectado en las cuatro estaciones del año, seguido del genotipo HPV-6 que fue detectado en tres estaciones, y por último el HPV-16, 31 y 81 que fueron detectados de en dos de las cuatro estaciones (Tabla 1).



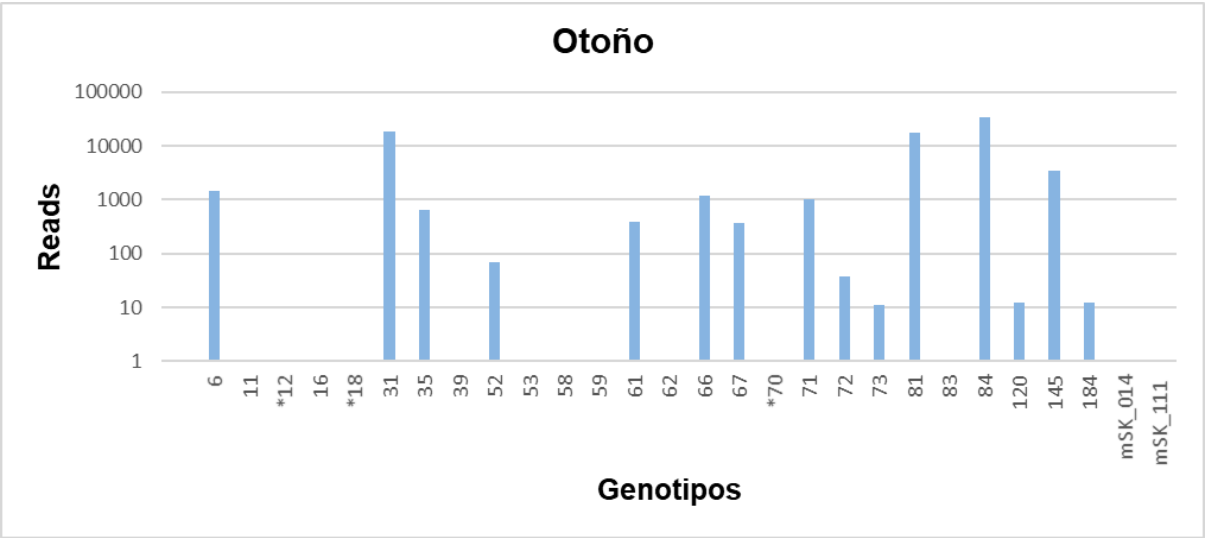


Figura 7 . Frecuencia de reads por genotipo en muestras de aguas residuales según la estación del año.

	Genotipo					
Muestra de agua residual (Invierno) ^a	6		66	81		
Muestra de agua residual (Primavera) ^a		16	66			
Muestra de agua residual (Verano) ^a	6	16	31	66		
Muestra de agua residual (Otoño) ^a	6		31	66	81	84 145

^a: genotipos con más de 1000 reads.

Tabla 1: Distribución de genotipos de HPV prevalentes en muestras de agua residual.

6. Discusión

La detección de HPV en el 75% de las muestras analizadas durante el periodo de estudio sugiere una circulación frecuente en el sistema de alcantarillado y, por ende, en la comunidad de Salto, Uruguay. Este porcentaje es considerablemente superior al reportado en el estudio de Victoria et al. (2022) en la misma ciudad, donde se encontró una prevalencia del 34%. También supera lo observado en otros contextos internacionales. Por ejemplo, Ahmed et al. (2024) y Shaheen et al. (2024) reportaron detecciones en un 24,4% y 35% respectivamente, en muestras de aguas residuales

urbanas de Egipto. Otros estudios llevados a cabo en Estados Unidos e Italia, arrojaron un rango de detección que varía de 17 a 81% (Symonds 2008; La Rosa et al. 2013). Este contraste podría atribuirse a factores locales como diferencias en la circulación viral, cobertura vacunal, hábitos sexuales de la población, sensibilidad metodológica o características del sistema de alcantarillado.

Los resultados de la cuantificación de HPV de este estudio, que mostraron una distribución desigual a lo largo del año y concentraciones que oscilaron entre 8977 y 23 copias genómicas/L, contrastan con los hallazgos reportados por Shaheen et al. (2024), quienes detectaron concentraciones de HPV considerablemente más altas en aguas residuales urbanas de Egipto, con valores que oscilaron entre $6,02 \times 10^4$ y $5,3 \times 10^4$ copias genómicas/L. Esta diferencia podría atribuirse a diversos factores, como la densidad poblacional, el tipo de sistema de saneamiento, la tasa de eliminación viral, o la cobertura de vacunación de la población. Asimismo, las condiciones climáticas y la degradación ambiental del ADN viral podrían influir en la estabilidad del virus en el ambiente, generando variaciones en los niveles detectados. Por lo tanto, aunque ambos estudios coinciden en que el HPV puede ser detectado en aguas residuales de forma consistente, las diferencias en las concentraciones y en la distribución temporal sugieren la necesidad de considerar el contexto local en los estudios de vigilancia ambiental.

Como control de proceso se utilizó el bacteriófago PP7, por ello se evaluó su presencia en todas las muestras. Los resultados mostraron que el control fue exitosamente recuperado en el 100% de las muestras analizadas, evidenciando una eficiencia adecuada y constante en el procedimiento metodológico empleado a lo largo del año. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Victoria et al. (2022), donde también se reportó la detección de PP7 en el 100% de las muestras ambientales analizadas, reforzando la utilidad de este bacteriófago como control de proceso confiable. La incorporación de PP7 permite monitorear simultáneamente la eficiencia de recuperación viral durante la filtración, la extracción de ácidos nucleicos y la ausencia de inhibición en la PCR, aspectos críticos en estudios ambientales donde los virus patógenos suelen encontrarse en bajas concentraciones. Además, su tamaño y propiedades fisicoquímicas similares a las de virus entéricos humanos lo convierten en un modelo conservador, asegurando que el sistema puede recuperar eficientemente partículas virales pequeñas. Al no encontrarse de forma natural en aguas residuales, su detección puede atribuirse exclusivamente al control agregado, lo que valida los resultados obtenidos (Rajal et al., 2007).

Los genotipos detectados con mayor frecuencia fueron el 66, 31 y 16. Este hallazgo es consistente con los resultados del estudio realizado previamente por Victoria et al. (2022), en el que los genotipos 31, 16 y 58 fueron los más prevalentes dentro de los de alto riesgo. Así como el genotipo 6, siendo de bajo riesgo, que fue detectado con gran frecuencia en ambos estudios. Se han implementado diversas estrategias

para estudiar la diversidad viral en aguas residuales, destacándose la técnica de secuenciación profunda por amplicones como una metodología adecuada para el análisis específico de una familia viral. En muestras recolectadas en España utilizando esta tecnología, se identificó una amplia variedad de genotipos de HPV a lo largo de todo un año, encontrándose los genotipo 6 y 66 de manera sostenida (Martínez-Puchol et al., 2020), lo cual coincide con los hallazgos del presente estudio, donde el genotipo 66 también fue detectado durante todo el periodo de muestreo. Además, este estudio aporta evidencia novedosa sobre la variación estacional en la circulación de genotipos de HPV en aguas residuales. Se observaron diferentes frecuencias de genotipos a lo largo del año, con predominancia de los tipos 6, 66 y 81 en invierno; 16 y 66 en primavera; 6, 16, 31 y 66 en verano; y una mayor diversidad genotípica en otoño, con la presencia sostenida de los tipos 6, 31, 66, 81, 84 y 145. Este hallazgo contrasta con estudios previos como el de Ahmed et al. (2019), que identificaron al 16 como el genotipo dominante sin explorar su distribución temporal, y complementa el trabajo de Shaheen et al. (2024), donde se informó una mayor frecuencia de detección de HPV en invierno, aunque sin discriminar genotipos. Por lo tanto, este estudio amplía el conocimiento actual al evidenciar que, más allá de su mera presencia, los genotipos de HPV podrían presentar una circulación diferencial a lo largo del año.

La estacionalidad observada podría estar relacionada con múltiples factores, tales como cambios en los comportamientos sociales, variaciones ambientales que afectan la estabilidad del ADN viral en el ambiente, o diferencias en la dinámica de eliminación viral por parte de las personas infectadas. No obstante, los mecanismos específicos que explicarían estas variaciones aún no se encuentran claramente establecidos. A diferencia de otros virus más estudiados en aguas residuales, como los enterovirus y adenovirus, el conocimiento sobre la persistencia, excreción y estacionalidad del HPV en este tipo de matrices sigue siendo limitado. En consecuencia, los hallazgos del presente trabajo señalan la necesidad de profundizar en esta línea de investigación, para comprender mejor los factores que regulan la circulación estacional de los distintos genotipos de HPV en el ambiente y su posible valor como indicador epidemiológico.

La estrategia de EBAR ha sido utilizada desde la década de 1930 para el seguimiento del poliovirus y ha cobrado relevancia nuevamente durante la pandemia de COVID-19 (Rashid et al., 2024; WHO, 2003). Si bien varios estudios han aplicado esta estrategia centrándose exclusivamente en muestras ambientales para el HPV (Martínez-Puchol et al., 2020; Mejías-Molina et al., 2024; Victoria et al., 2022), este trabajo aporta nuevos datos sobre la circulación de distintos genotipos del virus en el ambiente en un país en desarrollo con baja cobertura vacunal.

Este trabajo pone de manifiesto la coexistencia de diversos genotipos de HPV de alto y bajo riesgo en las muestras ambientales. La metodología EBAR se presentó como una herramienta valiosa para comprender la epidemiología del HPV desde

una perspectiva ambiental, brindando información crítica que puede fortalecer las políticas de salud pública, particularmente en lo referente a programas de prevención más integrales.

Como producto de este trabajo, se elaboró un artículo científico titulado “Wastewater-Based Epidemiology for Analysis of Human Papillomavirus Infections in a Uruguayan Urban Area”, en la revista Food and Environmental Virology (Vol 17. 2025). Este artículo se incluye en anexo.

7. Bibliografía

- Ahmed, N. I., Elmahdy, M. M., Allayh, A. K., Mohamed, E.-C. B., Loutfy, S. A., Barakat, A., y Ali, M. A. (2019). Prevalence of human polyomavirus and papillomavirus in wastewater and in stool of Egyptian patients. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(2), 29–41. <https://doi.org/10.21608/EJABF.2019.29237>
- Bénéteau, T., Selinger, C., Sofonea, M. T. y Alizon, S. (2021). Episome partitioning and symmetric cell divisions: Quantifying the role of random events in the persistence of HPV infections. *PLOS Computational Biology*, 17(9), e1009352. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009352>
- Berois, N., Heard, I., Fort, Z., Alonso, R., Sica, A., Moerzinger, P., Rodriguez, G., Sancho-Garnier, H., Osinaga, E., y Favre, M. (2014). Prevalence of type-specific HPV infection in Uruguay. *Journal of Medical Virology*, 86(4), 647-52. <https://doi.org/10.1002/jmv.23870>
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., Bosch, F. X., y de Sanjosé, S. (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1789–1799. <https://doi.org/10.1086/657321>
- Bruni, L., Diaz, M., Barrionuevo-Rosas, L., Herrero, R., Bray, F., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., y Castellsagué, X. (2016). Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. *The Lancet Global Health*, 4(7), e453–e463. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30099-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30099-7)
- Bruni, L., Albero, G., Rowley, J., Alemany, L., Arbyn, M., Giuliano, A. R., Markowitz, L. E., Broutet, N., y Taylor, M. (2023). Global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 11(9), e1345–e1362. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00305-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00305-4)
- Buck, C. B., Day, P. M., y Trus, B. L. (2013). The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*, 445(1-2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2024). *Clinical overview of HPV*. <https://www.cdc.gov/hpv/hcp/clinical-overview/index.html>

- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruze, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., y Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 29(32), 4294–4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
- Coser, J., da Rocha Boeira, T., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., y Lunge, V. R. (2011). Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(5), 467–472. [https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70229-x](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70229-x)
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., y zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- de Araujo, M. R., De Marco, L., Santos, C. F., Rubira-Bullen, I. R. F., Ronco, G., Pennini, I., Vizzini, L., Merletti, F., y Gillio-Tos, A. (2009). GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. *Journal of Clinical Virology*, 45(2), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.03.020>
- DiMaio, D., y Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, 445(1-2), 99-114. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.006>
- Ding, D. C., Chang, Y. C., Liu, H. W., y Chu, T. Y. (2011). Long-term persistence of human papillomavirus in environments. *Gynecologic Oncology*, 121(1), 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.11.040>
- Drolet, M., Bénard, É., Pérez, N., y Brisson, M., on behalf of the HPV Vaccination Impact Study Group. (2019). Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 394(10197), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30298-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30298-3)
- Evans, W., Filippova, M., Filippov, V., Bashkirova, S., Zhang, G., Reeves, M. E., y Duerksen-Hughes, P. (2016). Overexpression of HPV16 E6* alters β -integrin and mitochondrial dysfunction pathways in cervical cancer cells. *Cancer Genomics & Proteomics*, 13(4), 259–274. Recuperado de <https://cgp.iiarjournals.org/content/13/4/259.long>
- Fuessel Haws, A. L., He, Q., Rady, P. L., Zhang, L., Grady, J. J., Hughes, T. K., Stisser, K., König, R., y Tyring, S. K. (2004). Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *Journal of Virological Methods*, 122(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.007>

- Grabowska, A. K., y Riemer, A. B. (2012). The invisible enemy—How human papillomaviruses avoid recognition and clearance by the host immune system. *The Open Virology Journal*, 6, 249–256. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010249>
- Harden, M. E., y Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.002>
- Harper, D. M., y DeMars, L. R. (2017). HPV vaccines – A review of the first decade. *Gynecologic Oncology*, 146(1), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.04.004>
- Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P., y Wu, T.-C. (2008). Molecular epidemiology of human papillomavirus. *Journal of the Formosan Medical Association*, 107(3), 198-217. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(08\)60138-2](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(08)60138-2)
- ICO/IARC HPV Information Centre. (2023, marzo 10). *Uruguay: Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2023*. Institut Català d'Oncologia / International Agency for Research on Cancer. <https://www.hpvcentre.net>
- Jiang, P., y Yue, Y. (2014). Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(1), 3-7. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1374>
- Kämper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H-C., Florin, L., Bolscher, J. Hilbig, L. Schiller, J. T., y Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *Journal of Virology*, 80(2), 759–768. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.759-768.2006>
- Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., Rush, B. B., Glass, A. G., y Schiffman, M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(14), 1072-9. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji187>
- La Rosa, G., Fratini, M., Accardi, L., D'Oro, G., Della Libera, S., Muscillo, M., y Di Bonito, P. (2013). Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewages. *PLoS One*, 8(1), e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>
- Longworth, M. S., y Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 362-72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>
- Maglennon, G. A., y Doorbar, J. (2012). The biology of papillomavirus latency. *Open Virology Journal*, 6, 190-7. <https://doi.org/10.2174/1874357901206010190>

Manhart, L. E., y Koutsky, L. A. (2002). Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sexually Transmitted Infections*, 29(11), 725-35. <https://doi.org/10.1097/00007435-200211000-00018>

Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Fernández-Cassi, X., Timoneda, N., Itarte, M., Andrés, C., Antón, A., Abril, J. F., Girones, R., y Bofll-Mas, S. (2020). Characterisation of the sewage virome: Comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Science of the Total Environment*, 713, 136604. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136604>

Masachessi, G., Castro, G., Cachi, A. M., Marinzalda, M. L. Á., Liendo, M., Pisano, M. B., Sicilia, P., Ibarra, G., Rojas, R. M., López, L., Barbás, G., Cardozo, D., Ré, V. E., y Nates, S. V. (2022). Wastewater based epidemiology as a silent sentinel of the trend of SARS-CoV-2 circulation in the community in central Argentina. *Water Research*, 219, 118541. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118541>

Mejias-Molina, C., Pico-Tomás, A., Martínez-Puchol, S., Itarte, M., Torrell, H., Canela, N., Borrego, C. M., Corominas, L., Rusiñol, M., y Bofll-Mas, S. (2024). Wastewater-based epidemiology applied at the building-level reveals distinct virome profiles based on the age of the contributing individuals. *Human Genomics*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40246-024-00580-1>

Ministerio de Salud Pública [Uruguay]. (2018). *Vacuna contra el virus del papiloma humano: Información para madres, padres y referentes* (Comunicado). https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/campanas/info%20vacuna%20HPV_0.pdf

Molina, M. A., Steenbergen, R. D. M., Pumpe, A., Kenyon, A. N., y Melchers, W. J. G. (2024). HPV integration and cervical cancer: A failed evolutionary viral trait. *Trends in Molecular Medicine*, 30(9), 890–899. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2024.05.009>

Morales-Morales, H.A., Vidal, G., Olszewski, J., Rock, C.M., Dasgupta, D., Oshima, K.H., y Smith, G.B. (2003). Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 4098–4102. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4098-4102.2003>

Muñoz N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., y Meijer, C. J. (2003). International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>

Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS). (2023). *Vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH)* [Hoja informativa]. OPS/OMS.

<https://www.paho.org/es/vacuna-contraviruspapiloma-humano-vph>

Osmani, V., Hörner, L., Nkurunziza, T., Rank, S., Tanaka, L. F., y Klug, S. J. (2025). Global prevalence of cervical human papillomavirus in women aged 50 years and older with normal cytology: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, 6(1), 100955. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.100955>

Pérez, N. M., Tedesco, S., González, F., Jordi, J. M., y Rey, G. (2020). Prevalencia de los genotipos de HPV en lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino en la población del Hospital de Clínicas.

Montevideo-Uruguay. *Anales de la Facultad de Medicina (Universidad de la República, Uruguay)*, 7(2), e2020v7n2e202.

<https://doi.org/10.25184/anfamed2020v7n2a10>

Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Yan, L., Da Silva, D. M., Schelhaas, M., y Kast, W. M. (2013). The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *Journal of Virology*, 87(11), 6062-72. <https://doi.org/10.1128/JVI.00330-13>

Rajal, V. B., McSwain, B. S., Thompson, D. E., Leutenegger, C. M., Kildare, B. J., y Wuertz, S. (2007). Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, 41(7), 1411–1422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.034>

Ramas, V., Mirazo, S., Bonilla, S., Mendoza, L., Lago, O., Basiletti, J., González, J., Picconi, M. A., y Arbiza, J. (2013). Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from Uruguayan women. *Journal of Medical Virology*, 85(5), 845-51. <https://doi.org/10.1002/jmv.23479>

Rashid, S. A., Rajendiran, S., Nazakat, R., Mohammad Sham, N., Khairul Hasni, N. A., Anasir, M. I., Kamel, K. A., y Muhamad, R. R. (2024). A scoping review of global SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology in light of COVID-19 pandemic. *Heliyon*, 10(9), e30600. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30600>

Rodríguez, G., García, L., Beracochea, A., Alonso, R., Caserta, B., Pérez, N., Larrosa, D., Vero, M., Ardao, G., Santos, M. N., Hernández, M. L., Almonte, M., Herrero, R., y grupo ESTAMPA Uruguay. (2019). Tamizaje del cáncer de cuello uterino con test de HVP: Primeros resultados en el sistema público de Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*, 35(4), 267-280. <https://doi.org/10.29193/RMU.35.4.3>

Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., y Pawlita, M. (2008). Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel

broad-spectrum GP5+/6+ primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1050–1059. <https://doi.org/10.1128/jcm.02227-07>

Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodríguez, A. C., y Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370, 890-907. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61416-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61416-0)

Serrano, B., Brotons, M., Bosch, F. X., y Bruni, L. (2018). Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 47, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006>

Seyoum, A., Assefa, N., Gure, T., Seyoum, B., Mulu, A. y Mihret, A. (2022). Prevalence and genotype distribution of high-risk human papillomavirus infection among sub-saharan African women: a systematic review and meta-analysis. *Front. Public Health*, 10, 890880. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.890880>

Shaheen, M. N. F., Ahmed, N., Badr, K. R., y Elmahdy, E. M. (2024). Detection and quantification of adenovirus, polyomavirus, and papillomavirus in urban sewage. *Journal of Water and Health*, 22(2), 401–413. <https://doi.org/10.2166/wh.2024.322>

Shope, R. E., y Hurst, E. W. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits: With a note on the histopathology. *Journal of Experimental Medicine*, 58(5), 607–624. <https://doi.org/10.1084/jem.58.5.607>

Symonds, E. M. (2008). *Viruses found in raw sewage and their potential to indicate fecal pollution in coastal environments* (Tesis de maestría). University of South Florida. <https://digitalcommons.usf.edu/etd/522>

Trottier, H., y Burchell, A. N. (2009). Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*, 12(5-6), 291-307. <https://doi.org/10.1159/000214920>

Van Doorslaer, K., Chen, Z., Bernard, H.-U., Chan, P. K. S., DeSalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., McBride, A. A., Villa, L. L., y Burk, R. D. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *Journal of General Virology*, 99(8), 989–990. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>

van den Brule, A. J. C., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. L. M., y Snijders, P. J. F. (2002). GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 779–787. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.779-787.2002>

Victoria, M., Moller, A., Salvo, M., Baccardatz, N., y Colina, R. (2022). High abundance of high-risk Human Papillomavirus genotypes in wastewater in Uruguay. *Journal of Water & Health*, 20(12), 1748-1754. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.330>

Wang, J. W., y Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1-2), 175–186.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.017>

Wei, F., Georges, D., Man, I., Baussano, I., y Clifford, G. M. (2024). Causal attribution of human papillomavirus genotypes to invasive cervical cancer worldwide: a systematic analysis of the global literature. *The Lancet*, 404(10451), 435–444.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01097-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01097-3)

World Health Organization. (2003). *WHO guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation: Vaccines and biologicals*.
<https://www.who.int/vaccines-documents>

World Health Organization. (2024, 5 de marzo). *Cervical cancer* [Hoja informativa]. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>

zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers—A brief historical account. *Virology*, 384(2), 260–265.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>

Zheng, Z.-M., y Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2286–2302.
<https://doi.org/10.2741/1971>

8. Anexo

Anexo 1. Artículo científico.

Título: Wastewater-Based Epidemiology for Analysis of Human Papillomavirus Infections in a Uruguayan Urban Area.

Autores: C. Fernandez-Sabatella, G. Corrales, L. Monzon, E. Andrade, N. Sica, E. Cardozo, N. Baccardatz, J. Jacques, S. Castro, M. Castells, M. Victoria, R. Colina.

Revista: *Food and Environmental Virology*.

Volumen: 17.

Año: 2025.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12560-025-09642-6>