

Infecciones múltiples por *Alphapapillomavirus*, especie 9, en mujeres ecuatorianas con lesiones intraepiteliales y cáncer cervicouterino

Multiple infections by *Alphapapillomavirus*, specie 9, in Ecuadorian women with intraepithelial lesions and cervical cancer

César Humberto Bedoya Pilozo^{1,2} <https://orcid.org/0000-0003-0448-8608>

Yudira Soto Brito^{3*} <https://orcid.org/0000-0003-2426-9517>

Maylen Espinosa García⁴ <https://orcid.org/0000-0001-5608-7828>

Peter Chedraui Alvarez⁵ <https://orcid.org/0000-0002-1556-3979>

Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo⁵ <https://orcid.org/0000-0003-1690-3936>

Rita Loja Chango⁵ <https://orcid.org/0000-0001-6560-687X>

Sunny Sánchez Giler⁶ <https://orcid.org/0000-0003-2867-013X>

Vivian Kourí Cardellá³ <https://orcid.org/0000-0001-7878-7542>

¹Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación. Guayaquil, Ecuador.

²Hospital Luis Vernaza. Guayaquil, Ecuador.

³Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual, Departamento de Virología. La Habana, Cuba.

⁴Hospital IESS CEIBOS. Guayaquil, Ecuador.

⁵Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Facultad Ciencias Médicas, Instituto de Biomedicina. Guayaquil, Ecuador.

⁶Universidad de Especialidades Espíritu Santos, Facultad de Ciencias Médicas. Espíritu Santos, Ecuador.

*Autor para la correspondencia: yudira@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El significado biológico de las infecciones múltiples con virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), pertenecientes a la familia *Alphapapillomavirus*, en la carcinogénesis cervical aún es controversial.

Objetivo: Proporcionar información sobre la circulación del VPH-AR del género *Alphapapillomavirus*-especie 9, e infecciones múltiples en mujeres ecuatorianas con lesiones intraepiteliales y cáncer cervicouterino (CaCU).

Métodos: Se estudiaron 300 mujeres, residentes en la región Litoral del Ecuador. Se detectó la infección viral en muestras cervicales, mediante PCR anidada con cebadores genéricos MY09/11 y GP5/GP6. Los genotipos virales fueron identificados con el sistema comercial ANYPLEX II VPH28. La razón de prevalencia (RP) fue utilizada como medida de asociación entre las lesiones citológicas y las infecciones simples, múltiples o combinaciones de genotipos.

Resultados: Se detectó VPH en el 92,00 % (276/300) de las mujeres, con frecuencias altas de infección por genotipos individuales, principalmente de alto riesgo oncogénico. Los VPH-AR más frecuentes fueron VPH58 (18,17 %), 70 (8,64 %), 53 (8,34 %), 35 (7,45 %), 16 (7,37 %), 33 (6,55 %), 31 (5,58 %) y 18 (4,24 %). En el 91,66 % (253/276) de las muestras se detectaron infecciones múltiples, hasta con 13 tipos en una misma paciente, incluyendo varias especies del género *Alphapapillomavirus*. La combinación VPH16/VPH58 fue la más frecuente en lesiones de alto grado (RP = 2,9; p = 0,000), y la coinfección triple VPH16/VPH58/VPH70 predominó en las mujeres con CaCU (RP = 3,5; p = 0,007).

Conclusión: Los resultados demuestran que la combinación VPH16/VPH58 del género *Alphapapillomavirus*, especie 9, podría ser un factor clave en la aparición de lesiones premalignas y su progresión hacia el CaCU.

Palabras clave: virus del papiloma humano; *Alphapapillomavirus*; genotipos oncogénicos; infecciones múltiples; PCR; Ecuador.

ABSTRACT

Introduction: It is still controversial the biological connotation of multiple infections with high-risk human papillomaviruses (hrHPV), that belong to the genus *Alphapapillomavirus*, for the cervical carcinogenesis.

Objective: To provide information on the circulation of hrHPV, genus *Alphapapillomavirus*, specie 9, and the multiple infections in Ecuadorian women with intraepithelial lesions and cervical cancer.

Methods: 300 women, from the coastal region of Ecuador, were screened. Viral infection was detected in cervix samples by nested PCR with MY09/11 and GP5/GP6 generic primers. Viral genotypes were identified using the commercial kit ANYPLEX II VPH28. The prevalence ratio (PR) was used to measure the association between cytological lesions and the simple, multiple or combined genotype infections.

Results: Ninety-two percent of women (276/300) tested positive for HPV. Frequency of infection for single genotypes was high, mainly those of high oncogenic risk. The most frequent hrHPV genotypes were HPV58 (18.17%), 70 (8.64%), 53 (8.34%), 35 (7.45%), 16 (7.37%), 33 (6.55%), 31 (5.58%) and 18 (4.24%). In 91.66% (253/300) of the samples, multiple infections were detected, with up to 13 types in a single patient, including various species from the genus *Alphapapillomavirus*. The combination HPV16/HPV58 was the most frequent on high-grade lesions (PR = 2.9; p = 0,000), and HPV16/HPV58/HPV70 triple co-infection prevailed in women with cervical cancer (PR = 3.5; p = 0.007).

Conclusions: The results evidence that the combination HPV16/HPV58, genus *Alphapapillomavirus*, specie 9, could be a key factor in the occurrence of premalignant lesions and their evolution into cervical cancer.

Keywords: human papillomavirus; *Alphapapillomavirus*; oncogenic genotypes; multiple infections; PCR; Ecuador.

Recibido: 20/12/2020

Aceptado: 21/12/2021

Introducción

El virus del papiloma humano (VPH) es la causa principal de cáncer cervicouterino (CaCU) y, en general, de las neoplasias del tracto anogenital.⁽¹⁾ El CaCU se ubica en el tercer lugar entre aquellos de mayor incidencia a escala mundial.⁽²⁾ Se han descrito hasta la fecha, cerca de 200 genotipos del VPH⁽³⁾ y aproximadamente entre 15 y 19 son considerados de “alto riesgo” de acuerdo con su potencial oncogénico y su asociación causal con el CaCU.⁽⁴⁾ Estos genotipos del VPH pertenecen al género *Alphapapillomavirus*, especies 7 y 9.^(2,4) Los VPH de una misma especie taxonómica se relacionan genéticamente y causan lesiones clínicamente similares.^(2,4) El VPH 16 es el genotipo de alto riesgo oncogénico perteneciente a la especie 9, más frecuentemente asociado a lesiones precancerosas y al CaCU. Sin embargo, el VPH 18 perteneciente a la especie 7, es menos frecuente que el VPH 16, pero es el segundo con respecto a su relación causal con el CaCU.⁽⁴⁾

De acuerdo con una revisión sistemática realizada por *Picconi y Villa*, hasta 2016 los pocos estudios realizados en América Latina destacan una frecuencia alta de los genotipos 16 y 18 en muestras de CaCU.⁽⁵⁾ En los últimos años esta panorámica ha variado, ya que en investigaciones efectuadas en el noreste de Brasil y el sur de México, se reportan prevalencias elevadas de otros tipos de VPH diferentes al 16 y 18, en particular los genotipos de la especie 9 como los VPH 33 y 58.^(6,7) Actualmente en América del Sur, el VPH 58 es uno de los genotipos de alto riesgo con mayor prevalencia en la región.⁽²⁾ Este tipo de VPH fue detectado en el centro y norte de Brasil, Argentina, Colombia y Ecuador.^(8,9,10)

Con el fin de mejorar el diagnóstico y tamizaje del VPH, especialmente para los genotipos de alto riesgo oncogénico, se han desarrollado varios métodos de detección, entre ellos, los basados en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR), que además permiten la cuantificación del agente infeccioso.⁽¹¹⁾ *Young-Jo Lee* y otros desarrollaron un método de PCR-TR que detecta múltiples dianas en un solo canal de fluorescencia.⁽¹²⁾ Esto permite la detección de varios genotipos de VPH, especialmente de VPH-AR, en muestras de cepillados cervicales, mediante el sistema comercial denominado ANYPLEX II VPH28.⁽¹³⁾

En Ecuador no existen datos oficiales sobre la morbilidad y mortalidad por CaCU. Cada año se diagnostican 2094 nuevos casos de CaCU y se reportan 1026 decesos.⁽¹⁴⁾ Esta neoplasia constituye el tipo de cáncer más común en mujeres ecuatorianas con edades comprendidas entre 15 y 44 años, por lo que también ocupa el primer lugar dentro de las causas de mortalidad femenina, en el grupo de edad fértil.⁽¹⁴⁾

El perfil epidemiológico del VPH en el Ecuador y su asociación con el CaCU en mujeres ecuatorianas, permanece aún sin dilucidar. Frente a la escasa información epidemiológica del VPH en el Ecuador, el incremento de genotipos diferentes al VPH 16^(15,16) en la región, y tomando en cuenta la reciente introducción en el país de vacunas comerciales contra este agente viral, se propone un estudio epidemiológico y molecular para la tipificación del VPH. El objetivo es proporcionar información sobre la circulación de genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, fundamentalmente del género *Alphapapillomavirus*, especie 9, e infecciones múltiples, en mujeres con lesiones cervicouterinas y CaCU.

Métodos

Se realizó un estudio observacional de corte transversal entre agosto de 2013 y enero de 2015. El universo estuvo constituido por todas las pacientes atendidas en centros de salud ginecológicos del Ministerio de Salud Pública (MSP) y de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA), de las Provincias Costeras del Ecuador (Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos, Santa Elena y El Oro).

Se incluyó a todas las mujeres con edades entre 30 y 60 años, sexualmente activas, con diagnóstico de lesiones intraepiteliales cervicales o CaCU, mediante citología vaginal, según el sistema de clasificación de Bethesda 2014.⁽¹⁷⁾ Se excluyó a las mujeres embarazadas, con antecedentes de tratamientos ginecológicos 3 meses antes de la toma de muestras y que tuvieron relaciones sexuales 48 h antes de la prueba o tacto genital previo.

Se estudiaron 300 mujeres entre 30 y 60 años, de las cuales se colectaron los cepillados cervicouterinos con el sistema Cobas®PCR Cell Collection Media (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ 08876, EE.UU.), siguiendo estrictamente las recomendaciones de los fabricantes. Las muestras se almacenaron a -20 °C por un tiempo máximo de 3 meses, hasta la extracción del ADN. Todas las personas incluidas en la investigación confirmaron su participación, a través de la firma del consentimiento informado, antes de la toma de muestra.

Detección y genotipaje del VPH: La extracción del ADN total se realizó a través del estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó con el espectrofotómetro 54 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Madison WI, EE.UU.). Como control interno, para evaluar la calidad del ADN purificado, se amplificó un fragmento del gen de la betaglobina humana mediante PCR, con cebadores descritos previamente.⁽¹⁸⁾

Para la identificación genérica del VPH se normalizó una PCR convencional anidada empleando los cebadores universales MY09/11⁽¹⁸⁾ y los cebadores internos GP5/GP6.⁽¹⁹⁾ Como control negativo se utilizó agua destilada estéril, y como control positivo se empleó un plásmido recombinante de VPH 16 (VR 3240SD™ ATCC).

La tipificación de las muestras positivas a VPH, se realizó con el estuche comercial ANYPLEX II HPV28 (SEEGENE, Corea del Sur), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este estuche comercial detecta 28 genotipos de VPH del género *Alphapapillomavirus*, entre ellos 19 genotipos de alto riesgo oncogénico (16, **18**, 26, 31, 33, 35, **39**, **45**, 51, 52, 53, 56, 58, **59**, 66, **68**, 69, 73, 82)^a y 8 de bajo riesgo (6,11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70).^(2,4)

Los datos sociodemográficos y clínicoepidemiológicos fueron colectados y almacenados en una base de datos de Microsoft Excel versión 15.0. El análisis estadístico se realizó a dos niveles: descriptivo y analítico (bivariado). Para efectuarlo se empleó el paquete estadístico SPSS versión 21.0 (IBM, EE.UU.). La estadística descriptiva se basó en el cálculo de frecuencias absolutas y relativas. Para el análisis bivariado se utilizaron tablas de contingencia donde se evaluó el

nivel de asociación mediante la prueba de X^2 de Pearson. También se estimó la probabilidad de riesgo mediante la prueba de razón de prevalencias (RP) corregida con el estadígrafo de Mantel-Haenszel. Se consideraron significativos valores de RP > 1 , $p < 0,01$, con un intervalo de confianza del 95 %.

El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki⁽²⁰⁾ sobre lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales de la medicina actual, la investigación clínica en humanos y las Normas de la Organización Mundial de la Salud establecidas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (OMS-CIOMS).⁽²¹⁾ La investigación contó con el aval del Comité de Bioética del Hospital Francisco Icaza Bustamante de la ciudad de Guayaquil, reconocido por la Autoridad Sanitaria Nacional del Ecuador.

Resultados

Frecuencia de infección y genotipos del virus del papiloma humano

De las 300 mujeres investigadas, se detectó el VPH en el 92,00 % (276/300). Se hallaron frecuencias altas de infección por genotipos individuales, principalmente los de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), en comparación con los de bajo riesgo (VPH-BR). Los VPH-AR más frecuentes fueron los tipos 58 (18,17 %), 70 (8,64 %), 53 (8,34 %), 35 (7,45 %), 16 (7,37 %), 33 (6,55 %), 31 (5,58 %) y 18 (4,24 %). Entre los VPH-BR se encontraron más comúnmente los tipos 69 (4,84 %), 61 (4,17 %), 6 (2,61 %), 11 (2,16 %) y 42 (2,31 %) (Fig. 1).

Infecciones múltiples por virus del papiloma humano

En el 91,66 % (253/276) de las muestras infectadas se detectaron infecciones múltiples. En una misma muestra, pudieron detectarse hasta 13 genotipos diferentes de VPH. La infección con tres genotipos en una misma muestra fue la forma más frecuente de infección múltiple (21,01 %; 58/276).

Las frecuencias altas del VPH 58 y VPH 16 se reflejaron en las combinaciones siguientes: VPH 58/VPH 70 (8,0 %); VPH 58/VPH 53 (7,1 %); VPH 58/VPH 35 (6,8 %); VPH 16/VPH 58 (6,5 %); VPH 58/VPH 31 (5,1 %); VPH 18/VPH 58 (3,9 %); VPH 16/VPH 70 (3,7 %); VPH 58/VPH 53/VPH 70 (3,6 %); VPH 35/VPH 53 (3,6 %); y VPH 16/VPH 58/VPH 70 (3,5 %) (Fig. 2).

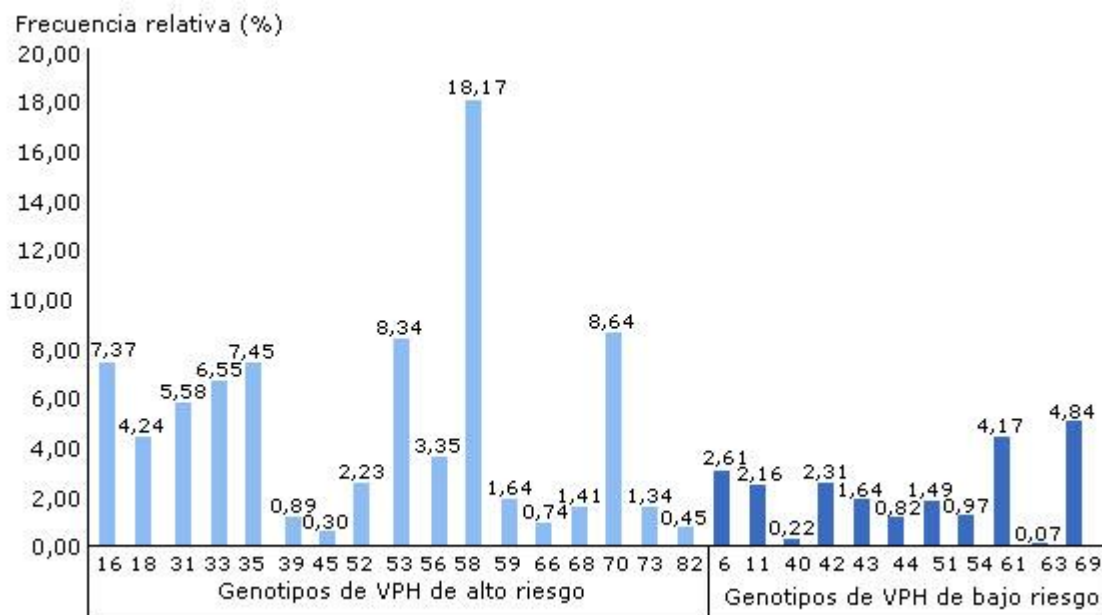


Fig. 1 - Frecuencia relativa de genotipos de VPH en mujeres de la región litoral del Ecuador en el periodo de agosto de 2013 a enero de 2015. Se destacan las elevadas frecuencias individuales de los genotipos de alto riesgo oncogénico (VPH-AR en azul claro), en comparación con los de bajo riesgo (VPH-BR en azul oscuro).

Asociación entre la infección por virus del papiloma humano y las lesiones citológicas

En la tabla se detallan los resultados del análisis estadístico bivariado. El genotipo de bajo riesgo VPH 61 presentó asociación con las lesiones citológicas de bajo grado (LSIL) (RP = 3,5; p = 0,000). Así mismo, los genotipos de alto riesgo, VPH 33 (RP = 3,3; p = 0,000), VPH 56 (RP = 2,9; p = 0,001), VPH 59 (RP = 3,3; p = 0,007) y VPH

69 (RP = 2,4; p = 0,003) tuvieron una mayor probabilidad de ser detectados en este tipo de lesiones.

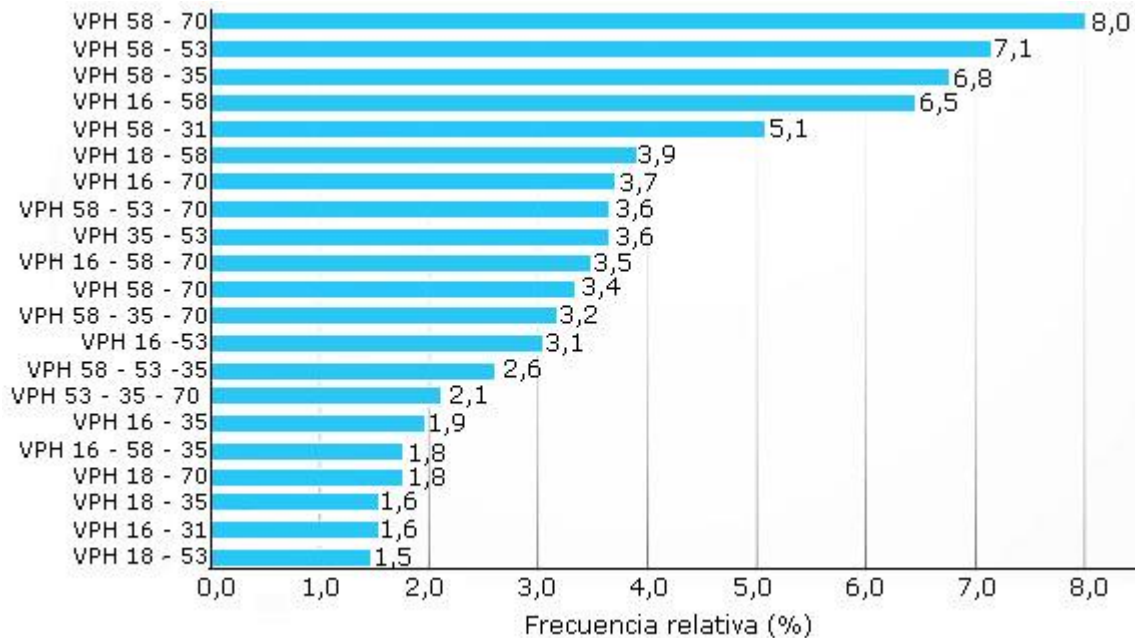


Fig. 2 - Frecuencia relativa de combinaciones de genotipos de VPH en infecciones múltiples, en mujeres de la región litoral del Ecuador en el periodo de agosto de 2013 a enero de 2015.

El VPH 16 tuvo una probabilidad mayor para identificarse en las lesiones de alto grado (HSIL) (RP = 2,5; p = 0,000) y también fue significativamente más frecuente en los casos con CaCU (RP = 5,9; p = 0,000). El genotipo 70 fue casi dos veces más frecuente (RP = 1,95; p = 0,005) en las HSIL.

Las combinaciones entre genotipos de VPH-AR se asociaron tanto con las HSIL como con los casos de CaCU. Las principales combinaciones asociadas estadísticamente con HSIL fueron VPH 16/VPH 58 (RP = 2,9; p = 0,000); VPH 16/VPH 70 (RP = 2,7; p = 0,002); VPH 58/VPH 70 (RP = 1,8; p = 0,017); y VPH 16/VPH 58/VPH 70 (RP = 2,6; p = 0,003). Las combinaciones VPH 16/VPH 31 se asociaron con el CaCU, con una probabilidad hasta cinco veces superior (RP = 5,2; p = 0,004); mientras que la combinación VPH 16/VPH 58/VPH 70 fue aproximadamente tres veces más frecuente en las mujeres con CaCU (RP = 3,5; p = 0,007).

Tabla - Análisis bivariado de las combinaciones de VPH más frecuentes en mujeres de la región litoral del Ecuador en el periodo de agosto de 2013 a enero de 2015

Variable	Tipo	LSIL		HSIL		CaCU	
		RP	Valor de p	RP	Valor de p	RP	Valor de p
Genotipos de VPH	VPH 6	0,857	0,705	1,176	0,655	4,203	0,040
	VPH 11	2,219	0,044	0,794	0,572	0,000	0,116
	VPH 16	1,181	0,566	2,483	0,000	5,893	0,000
	VPH 18	1,085	0,798	0,878	0,666	1,309	0,61
	VPH 31	1,181	0,566	0,732	0,263	2,295	0,065
	VPH 33	3,319	0,000	0,433	0,002	0,368	0,114
	VPH 35	1,376	0,223	0,864	0,558	0,309	0,063
	VPH 39	1,844	0,307	0,762	0,663	1,182	0,876
	VPH 40	0,000	0,273	0,768	0,83	6,705	0,126
	VPH 42	1,679	0,186	1,125	0,759	1,441	0,574
	VPH 43	1,48	0,396	0,702	0,454	0,597	0,623
	VPH 44	2,161	0,213	1,295	0,675	0,000	0,348
	VPH 45	2,551	0,353	0,509	0,561	0,000	0,575
	VPH 51	2,175	0,097	0,365	0,077	1,476	0,617
	VPH 52	1,29	0,533	1,613	0,214	0,915	0,908
	VPH 53	1,502	0,111	0,743	0,222	1,471	0,379
	VPH 54	0,747	0,663	0,674	0,519	1,08	0,943
	VPH 56	2,856	0,001	0,582	0,124	0,911	0,884
	VPH 58	0,82	0,487	1,441	0,187	3,484	0,097
	VPH 59	3,327	0,007	0,225	0,018	1,319	0,721
	VPH 61	3,499	0,000	0,504	0,036	0,2	0,119
	VPH 63	0,000	0,112	0,000	0,42	0,000	0,78
VPH 66	0,272	0,219	1,027	0,967	1,455	0,728	
VPH 68	1,173	0,755	1,128	0,802	1,569	0,564	
VPH 69	2,383	0,003	0,488	0,021	0,361	0,176	
VPH 70	0,564	0,034	1,952	0,005	1,995	0,112	
VPH 73	2,111	0,129	0,179	0,024	1,673	0,36	
VPH 82	0,498	0,527	3,148	0,189	2,655	0,382	
Infecciones múltiples y combinaciones de infecciones por VPH	VPH 58/VPH 70	0,679	0,155	1,776	0,017	1,919	0,134
	VPH 16/VPH 70	0,297	0,008	2,719	0,002	4,014	0,002
	VPH 16/VPH 58	0,249	0,000	2,887	0,000	4,861	0,000
	VPH 16/VPH 31	0,425	0,181	1,586	0,319	5,222	0,004
	VPH 16/VPH 58/VPH 70	0,324	0,013	2,632	0,003	3,528	0,007
	Infección simple	1,309	0,934	0,612	0,291	0,000	0,156
	Infección múltiple	1,412	0,368	2,143	0,039	0,000	0,047
	Infección doble	1,42	0,327	1,16	0,666	0,301	0,246
	Infección triple	0,612	0,149	2,019	0,014	1,17	0,766
Infección cuádruple	1,326	0,262	0,831	0,42	2,527	0,058	

Leyenda: VPH: virus del papiloma humano; RP: razón de prevalencia; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado (del inglés, *atypical squamous cells of undetermined significance*); LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (del inglés, *low grade squamous intraepithelial lesion*); HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL del inglés, *high grade squamous intraepithelial lesion*);

CaCU: cáncer cervicouterino.

Fuente: Resultados de investigación.

Discusión

La infección persistente por VPH-AR se considera como la condición fundamental para el desarrollo de las lesiones precursoras y el CaCU.⁽⁴⁾ El largo intervalo entre la infección persistente por VPH-AR y el desarrollo de la carcinogénesis cervical explicaría el por qué las lesiones de alto grado y el CaCU son más frecuentes en mujeres mayores de 30 años.⁽²²⁾ La prevalencia de la infección por el VPH en el sexo femenino es diversa según las características de la población estudiada y la técnica empleada. En los resultados obtenidos existe un predominio de lesiones HSIL, y la frecuencia de infección por VPH se incrementa con el grado de la lesión. Estos resultados coinciden con la literatura revisada, donde se reporta que en más del 90 % de las mujeres mayores de 30 años, con lesiones cervicales de alto grado y CaCU, se detecta VPH-AR.^(23,24)

En los primeros estudios de epidemiología molecular del VPH, la detección de pocos genotipos o de infecciones simples era el resultado más común.⁽²⁵⁾ Con el desarrollo de nuevos métodos de detección molecular para el genotipado de amplio espectro, es muy frecuente la presencia de infecciones múltiples, especialmente en las mujeres más jóvenes, en el pico de su actividad sexual.⁽²⁶⁾ Sin embargo, el significado biológico y clínico de las coinfecciones con varios VPH-AR en mujeres mayores de 30 años, con lesiones de alto grado y CaCU es actualmente un tema en estudio. En los resultados presentados, la combinación de genotipos en las infecciones múltiples fluctuó desde dos hasta 13 tipos, aunque la coinfección con tres genotipos fue la más frecuente. Los más detectados fueron VPH 58, 53, 70, 16 y 35, tanto en infecciones simples como múltiples. A nivel mundial los genotipos 16 y 18 son los más frecuentemente asociados a la presencia de lesiones precursoras y CaCU.^(2,4) Sin embargo, en un metaanálisis publicado en 2014, sobre la prevalencia global del VPH, el tipo 18 tuvo una frecuencia relativamente baja, y predominaron otros genotipos como el VPH 52 y VPH 58 (especie 9), fundamentalmente en Asia, mientras que en América Latina, se reporta la presencia significativa del VPH 58.⁽²⁷⁾ En Ecuador, los hallazgos se muestran contradictorios. En una investigación previa realizada recientemente por nuestro grupo de trabajo, se identificó una alta

prevalencia del VPH 16 y VPH 58 en mujeres de la región costera del Ecuador.⁽¹⁵⁾ Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos en estudios independientes realizados tanto en mujeres de la ciudad de Quito (región sierra norte del Ecuador)⁽¹⁰⁾ como de la ciudad de Cuenca (región sierra sur del Ecuador).⁽²⁸⁾ Sin embargo, no concuerdan con estudios anteriores al año 2010.⁽²⁹⁾

Los métodos de genotipado amplio pueden detectar varios genotipos en una muestra clínica, lo cual dificulta conocer la contribución de los genotipos individuales a los diferentes estadios de las lesiones precursoras del CaCU. Algunos investigadores han abordado esta dificultad, atribuyendo la contribución de cada genotipo o combinaciones de genotipos específicos al desarrollo de las lesiones de forma jerárquica. *Wentzensen* y otros establecieron una nomenclatura para determinadas combinaciones de genotipos que se presentan coinfectando y que pueden contribuir de manera jerárquica, aunque no sinérgica, al desarrollo del CaCU.⁽³⁰⁾ Por ejemplo, definieron que en coinfecciones donde están presentes los VPH 16 y 18, existe un riesgo superior para desarrollar CaCU: esta combinación ocuparía el primer nivel jerárquico. De la misma forma, coinfecciones con VPH 31; 33; 35 y 39 ocuparían el segundo nivel jerárquico con respecto al riesgo para desarrollar CaCU.⁽³⁰⁾

Por su parte, *de Brot* y otros, en el 2017 plantearon, según un metaanálisis realizado a partir de una investigación mundial en 15 áreas geográficas diferentes, que la prevalencia de infecciones múltiples por VPH pudo alcanzar hasta un 46 %. También describen la asociación entre dichas infecciones múltiples y la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado y CaCU. Esas coinfecciones se pudieron relacionar con una probabilidad cinco veces mayor para desarrollar fallo a las radioterapias, en mujeres con CaCU. El riesgo incrementado para desarrollar CaCU y lesiones precursoras en mujeres con infecciones múltiples por VPH, según estos autores, pudiera compararse con la suma de los riesgos individuales adjudicados a cada VPH-AR. Sin embargo, no existieron evidencias de interacciones sinérgicas entre estos.⁽³¹⁾

En cuanto a combinaciones de genotipos identificadas en la presente investigación, la más común fue la mezcla de los VPH 16/VPH 58/VPH 70, en lesiones de alto grado y CaCU. Como se mencionó, en Asia, la presencia del VPH 58 es frecuente, por lo que es común encontrarlo coinfectando con el VPH 16.⁽²⁷⁾ En el caso de América del Sur y Ecuador, al no existir información concluyente sobre esta asociación, este reporte sería uno de los primeros en comunicar sobre la presencia de esta combinación en lesiones cervicales precancerosas y cancerosas en mujeres de la región. Los datos muestran que la combinación de los genotipos de VPH de alto riesgo de la especie 9 de la familia *Alphapapillomavirus* (VPH 16 y VPH 58) presenta un nivel de asociación significativa con la aparición de lesiones cervicales precancerosas y cancerosas.

El mecanismo, desde el punto de vista biológico, que desempeñan las infecciones múltiples en el desarrollo del CaCU, se explica desde diferentes aristas. Según *Salazar* y otros, algunas investigaciones concluyen que las infecciones múltiples con VPH-AR actúan sinérgicamente en la evolución de la carcinogénesis cervical, pero otras muestran que las coinfecciones no tienen ningún efecto sinérgico o aditivo en el desarrollo del CaCU o en el incremento del riesgo de padecer lesiones cervicales de alto grado, cuando se comparan con infecciones simples.⁽³²⁾ Los hallazgos descritos por *Sobota* y otros, publicados en 2018, son los más concluyentes hasta el momento, al demostrar mediante diferentes estudios de cohorte, que pueden existir interacciones competitivas o cooperativas entre diferentes genotipos de VPH-AR en las coinfecciones. Particularmente, se plantea que las coinfecciones con genotipos de VPH-AR de la misma especie taxonómica pueden reducir la progresión de las lesiones cervicales de alto grado, mientras que la coinfección con genotipos de diferentes especies, no confiere protección a la progresión tumoral, en lesiones de alto grado. Según los autores, el curso de estos eventos está dado por una respuesta inmunitaria diferente en cada caso.⁽³³⁾ De acuerdo con esta última hipótesis, las combinaciones de genotipos donde aparecen virus de las especies 7 y 9, encontradas en el presente estudio, pudieran constituir un factor de riesgo para el desarrollo del CaCU.

Existen investigaciones básicas que demuestran, desde el punto de vista de la biología molecular y celular, que las implicaciones biológicas de las infecciones múltiples están dadas por varios factores. La integración de los genomas de VPH-AR y no así los de bajo riesgo, en el genoma del hospedero, la interacción de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR con las proteínas supresoras de tumores, la respuesta inmunitaria y los mecanismos de evasión de estos virus son los elementos cruciales en el mecanismo de la carcinogénesis cervical.⁽³¹⁾ Por lo tanto, las coinfecciones con varios VPH-AR pudieran potenciar o amplificar fenómenos como la integración del ADN viral, la expresión de oncoproteínas y los diferentes mecanismos de evasión de los VPH-AR a la respuesta inmunitaria.

Conclusiones

A pesar de que la repercusión de las infecciones múltiples con varios VPH-AR en la carcinogénesis cervical aún está en discusión. Los resultados demuestran que la combinación VPH 16/VPH 58 del género *Alphapapillomavirus*, especie 9, podría ser un factor clave en la aparición de lesiones premalignas y su progresión hacia el CaCU. Esta información aporta elementos para evaluar el posible impacto de las vacunas contra VPH en la población femenina del Ecuador.

Agradecimientos

A los especialistas y técnicos Lex Medina, Martha Sánchez, Johanna Parrales, Denisse Molina, Maria Ibarra, Maria Quimis, Karool España, Karla Parraga, Nancy Cajas, Alberto Orlando, Cecibel Ramirez, Jasson Espinoza y Luis Solorzano, por la cooperación técnica para llevar a cabo los procedimientos de toma de muestras y procesamiento técnico de los especímenes.

Referencias bibliográficas

1. zur Hausen H. Papillomavirus infections –a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996 [Acceso 10/09/2020];1288(2):F55-78. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304419X96000200?via%3Dihub>
2. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, *et al*. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre); 2021. [Acceso 10/06/2021]. Disponible en: <https://hpcvcentre.net/statistics/reports/XFX.pdf>
3. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015 [Acceso 12/09/2020];476:341-4. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/reader/pii/S0042682214005777/pdf>
4. Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, *et al*. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 [Acceso 12/09/2020];23(10):1997-2008. Disponible en: <https://cebp.aacrjournals.org/content/cebp/23/10/1997.full.pdf>
5. Picconi MA, Villa LL. Human Papillomavirus Research in Latin America. In: Ludert JE, Pujol FH, Arbiza J, eds. *Human Virology in Latin America*. Buenos Aires: Springer International Publishing; 2017. [Acceso 09/10/2020]. Disponible en: <https://www.springer.com/fr/product-marketing-tool/flyer/9783319545660?downloadType=BOOKSELLERFLYER>
6. Molina-Pineda A, López-Cardona MG, Limón-Toledo LP, Cantón-Romero JC, Martínez-Silva MG, Ramos-Sánchez HV, *et al*. High frequency of HPV genotypes 59, 66, 52, 51, 39 and 56 in women from Western Mexico. *BMC Infect Dis*. 2020 [Acceso 09/10/2020];20(1):889. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7690193/pdf/12879_2020_Article_5627.pdf
7. Batista JE, Saddi VA, Carvalho KPA, Ribeiro AA, Segati KD, Carneiro M, *et al*. Human papillomavirus genotypes 68 and 58 are the most prevalent genotypes in

- women from quilombo communities in the state of Maranhao, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2017 [Acceso 09/10/2020];55:51-5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/reader/pii/S1201971217300048/pdf>
8. Colpani V, Soares Falcetta F, Bacelo Bidinotto A, Kops NL, Falavigna M, Serpa Hammes L, *et al.* Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(2):e0229154. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229154>
9. Chiesa IJ, Perez MS, Nuñez GG, Pirola DA. Genetic variability and phylogeny analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina. *Virusdisease.* 2016 [Acceso 08/11/2020];27(1):41-7. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758316/pdf/13337_2015_Article_295.pdf
10. Mejía L, Muñoz D, Trueba G, Tinoco L, Zapata S. Prevalence of human papillomavirus types in cervical cancerous and precancerous lesions of Ecuadorian women. *J Med Virol.* 2016;88(1):144-52. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24310>
11. Molet L, Girlich D, Bonnin RA, Proust A, Bouligand J, Bachelerie F, *et al.* Identification by high-throughput sequencing of HPV variants and quasispecies that are untypeable by linear reverse blotting assay in cervical specimens. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands).* 2019 [Acceso 08/11/2020];8:100169. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/4/729/htm>
12. Lee YJ, Kim D, Lee K, Chun JY. Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. *Sci Rep.* 2014 [Acceso 15/11/2020];4:7439. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262828/pdf/srep07439.pdf>
13. Marcuccilli F, Farchi F, Mirandola W, Ciccozzi M, Paba P, Bonanno E, *et al.* Performance evaluation of Anyplex™ II HPV28 detection kit in a routine diagnostic setting: comparison with the HPV Sign® Genotyping Test. *J Virol Methods.* 2015 [Acceso 15/11/2020];217:8-13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343909/pdf/pone.0210997.pdf>
14. Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, *et al.* Human Papillomavirus and Related Diseases in Ecuador. ICO/IARC Information Centre on

HPV and Cancer (HPV Information Centre); 2020. [Acceso 15/11/2020]. Disponible en: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/ECU.pdf>

15. Bedoya-Pilozo CH, Medina Magües LG, Espinosa-García M, Sánchez M, Parrales Valdiviezo JV, Molina D, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human papillomavirus infection in women with cervical lesions and cancer from the coastal region of Ecuador. *Rev Argent Microbiol.* 2018 [Acceso 20/11/2020];50(2):136-46. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117301372?via%3Dihub>

16. Carrión-Ordoñez JI, Soto-Brito Y, Escandón F, García-Pupo L, Pupo-Antúnez M. Human papillomavirus infection and associated risk factors in Ecuadorian women from two communities of Cañar province. *J Cervical Cancer Res.* 2020 [Acceso 20/11/2020];3(1):307-17. Disponible en:

<https://scholars.direct/Articles/cervical-cancer/jccr-3-005.pdf?jid=cervical-cancer>

17. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. 3rd ed. Nayar R, Wilbur DC, eds. Chicago, IL: Springer; 2014. 342 p. [Acceso 20/11/2020]. Disponible en:

<http://fosp.saude.sp.gov.br:443/docs/The+Bethesda+System+for+Reporting+Cervic.pdf>

18. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 [Acceso 10/12/2020];38(1):357-61. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88724/pdf/jm000357.pdf>

19. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995 [Acceso 10/12/2020];76(4):1057-62. Disponible en:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-76-4-1057#tab2>

20. World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-94. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
21. van Delden J, van der Graaf R. Revised CIOMS International Ethical Guidelines for Health-Related Research Involving Humans. *JAMA*. 2017;317(2):135-6. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2016.18977>
22. Guo M, Khanna A, Wang J, Dawlett MA, Kologinczak TL, Lyons GR, *et al*. Three-year risk of high-grade CIN for women aged 30 years or older who undergo baseline Pap cytology and HPV co-screening. *Cancer Cytopathol*. 2017 [Acceso 10/12/2020];125(8):644-51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5555795/pdf/nihms871451.pdf>
23. Pimple SA, Mishra GA, Deodhar KK. Evidence based appropriate triage strategies for implementing high risk HPV as primary technology in cervical cancer screening. *Minerva Ginecol*. 2020;72(2):96-105. DOI: <https://doi.org/10.23736/S0026-4784.20.04511-6>
24. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening and Vaccination-Review of Current Perspectives. *J Oncol*. 2019 Oct 10;2019:3257939. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/3257939>
25. Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM. Role of HPV Genotype, Multiple Infections, and Viral Load on the Risk of High-Grade Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019 [Acceso 10/12/2020];28(11):1816-24. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8394698/pdf/nihms-1730809.pdf>
26. Romero-Morelos P, Uribe-Jimenez A, Bandala C, Poot-Velez A, Ornelas-Corral N, Rodriguez-Esquivel M. Genotyping of human papilloma virus in a group of Mexican women treated in a highly specialist hospital: Multiple infections and their potential transcendence in the current vaccination programme. *Med Clin (Barc)*. 2017 [Acceso 10/12/2020];149(7):287-92. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2387020617305818>

27. Chan PK, Ho WC, Chan MC, Wong MC, Yeung AC, Chor JS, *et al.* Meta-analysis on prevalence and attribution of human papillomavirus types 52 and 58 in cervical neoplasia worldwide. PLoS One. 2014 [Acceso 10/12/2020];9(9):e107573. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168000/pdf/pone.0107573.pdf>
28. Campoverde A, Arcentales M, Caguana J. Caracterización de los genotipos frecuentes del virus del papiloma humano en mujeres atendidas en los hospitales monte SINAI y del seguro social Cuenca-Ecuador. 2008-2014. Rev Fac Cien Méd Univ Cuenca. 2017 [Acceso 10/12/2020];(1):7-19. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27478>
29. Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo S, Lopez G, Vega X, Maldonado Reyes CF, *et al.* A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from Ecuadorian women. J Med Virol. 2008 [Acceso 10/12/2020];80(11):1959-65. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jmv.21317>
30. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. J Infect Dis. 2014 [Acceso 10/12/2020];209(6):855-64. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935473/pdf/jit577.pdf>
31. De Brot L, Pellegrini B, Moretti ST, Carraro DM, Soares FA, Rocha RM, *et al.* Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. Cancer Cytopathol. 2017 [Acceso 10/12/2020];125(2):138-43. Disponible en: <https://reproductive-health-journal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12978-021-01244-2.pdf>
32. Salazar KL, Zhou HS, Xu J, Peterson LE, Schwartz MR, Mody DR, *et al.* Multiple Human Papilloma Virus Infections and their Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions. Acta Cytol. 2015 [Acceso 10/12/2020];59:391-8. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Pdf/442512>

33. Sobota RS, Ramogola-Masire D, Williams SM. Co-infection with HPV types from the same species provides natural cross-protection from progression to cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 2018 [Acceso 10/12/2020];9(2):26-30. Disponible en: <https://infectagentscancer.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1750-9378-9-26.pdf>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Financiamiento

Proyecto del SENESCYT, Código: PIC-12-INHTM-001: Epidemiología molecular del virus del papiloma humano para la prevención del cáncer cérvico-uterino en mujeres de la región litoral del Ecuador.

Contribución de los autores

Conceptualización: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez.

Curación de datos: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Maylen Espinosa García, Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo, Rita Loja Chango.

Adquisición de fondos: César Humberto Bedoya Pilozo.

Investigación: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Maylen Espinosa García, Rita Loja Chango.

Metodología: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo.

Administración de proyecto: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez.

Supervisión: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez,

Validación: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez,

Visualización: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez, Sunny Sánchez Giler.

Redacción - borrador original: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez, Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo, Sunny Sánchez Giler.

Redacción - revisión y edición: César Humberto Bedoya Pilozo, Yudira Soto Brito, Peter Chedraui Alvarez, Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo, Sunny Sánchez Giler, Vivian Kouri Cardellá.