



**Ministerio de Salud Pública**

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”**

**Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia**

**Departamento de Virología**



**Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI**

**Guayaquil, Ecuador**

**Infección por Virus del Papiloma Humano, sus variantes genéticas  
y factores asociados a lesiones cervicouterinas en mujeres de la  
región Litoral del Ecuador. 2012-2015.**

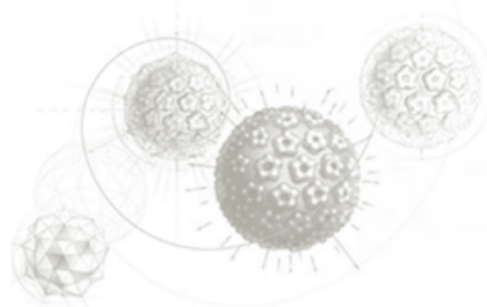
**Autor: César Bedoya Pilozo. MsC.**

**Tesis presentada en opción al grado científico de**

**Doctor en Ciencias de la Salud**

**La Habana**

**2022**





**Ministerio de Salud Pública**  
**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”**  
**Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia**  
**Departamento de Virología**



**Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI**  
**Guayaquil, Ecuador**

**Infección por Virus del Papiloma Humano, sus variantes genéticas  
y factores asociados a lesiones cervicouterinas en mujeres de la  
región Litoral del Ecuador. 2012-2015.**

**Tesis presentada en opción al grado científico de**  
**Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: César Bedoya Piloza. MsC.**

**Tutores: Lic. Yudira Soto Brito, Dr. C. Profesor e Investigador Titular.**

**Dra. Vivian Kourí Cardellá, Dr. Cs. Profesor e Investigador Titular.**

**La Habana**

**2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la energía universal que a veces llamamos Dios, que de una u otra manera me condujo hasta aquí por razones que aún desconozco, a desarrollar una investigación que finalmente transformó mi vida y la cual espero que ayude a mejorar la vida de otros.

En segundo lugar y no menos importante, también deseo agradecer profundamente a la persona que se transformó en el instrumento del “divino” para lograr algo que parecía imposible hace un tiempo atrás, ayudarme a terminar la tesis doctoral, gracias querida Yudi, tutora y amiga.

A mis hermanos, sin ellos no hubiera logrado completar el doctorado, sin su aliento y motivación, el trabajo hubiera quedado trunco.

A la Dra. Vivian Kouri por aceptar ser mi tutora desde los inicios de este largo camino, y a los colegas del departamento de Virología del IPK que me acogieron como uno más del grupo, especialmente a las doctoras Cary y Magilé, gracias por su ayuda.

A las queridas especialistas de docencia, Lic. Maribel y Dra. Martica, por darme una segunda oportunidad y poner todo su empeño para que lograra llegar al final y graduarme como PhD.

Finalmente, deseo agradecer a SENESCYT y al INSPI, pues sin sus aportes y colaboración jamás hubiera conseguido los resultados obtenidos.

## **DEDICATORIA**

A mi madre querida y mi padre adorado, donde quiera que nos volvamos a juntar, gracias, por tanto.

A mi hija, Milca, mi semilla, mi legado, mi futuro, te adoro mi pequeña.

## SÍNTESIS

Se estudió la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH), genotipos circulantes y variantes intratípicas en 320 mujeres mayores de 30 años, con lesiones citológicas y cáncer cervicouterino (CaCU), residentes en la región Litoral del Ecuador; y su relación con variables virales, clínico-epidemiológicas y sociodemográficas entre 2012 y 2015. Se realizó la detección del VPH con iniciadores universales MY09/MY11, genotipado mediante el sistema comercial *Anyplex™ II HPV28* y filogenia de variantes virales. Resultó una frecuencia de infección del 93,75% (300/320), predominio de tipos oncogénicos y 92,00% (276/300) de coinfecciones. Se identificaron mayoritariamente los VPH 58, 70, 53, 35 y 16, en orden de frecuencia. De las secuencias del VPH16, el 69,04% (29/42) se agrupó con el linaje A y el resto con el D. Las 15 secuencias del VPH58 correspondieron al linaje A. El VPH16, en infecciones simples o en coinfecciones, se asoció a lesiones de alto grado y CaCU. Las mujeres con nivel educacional básico, solteras, obreras, con inicio precoz de las relaciones sexuales, tuvieron mayor probabilidad de infección viral ( $p < 0,05$ ). Aunque el VPH58 fue el más frecuente, no se asoció al CaCU, a menos que estuviera coinfectando con VPH16. La frecuencia elevada de VPH58 y de variantes más oncogénicas del VPH16, indica la necesidad de intensificar el programa de detección precoz del CaCU y fortalecer el programa de vacunación en la región Litoral del Ecuador.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ASC-US:** células escamosas atípicas de significado indeterminado (del inglés, *atypical squamous cells of undetermined significance*)

**ASN:** Autoridad Sanitaria Nacional

**ATP:** ácido trifosfatado

**CaCU:** cáncer cervicouterino

**CIOMS:** Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (del inglés, *Council for International Organizations of Medical Sciences*), entidad en la esfera de la Organización Mundial de la Salud.

**dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**E:** temprano (del inglés, *early*)

**ESS:** tamaño de muestra efectivo (de inglés, *effective sample size*)

**FDA:** Agencia de Drogas y Alimentos (del inglés, *Food and Drugs Administration Agency*)

**HPD:** mayor densidad posterior (del inglés, *high posterior density*)

**HSIL:** lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL del inglés, *high grade squamous intraepithelial lesion*)

**IARC:** Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer, (del inglés, *International Agency for Cancer Research*)

**IC:** intervalo de confianza

**ICTV:** Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del inglés, *International Committee for Taxonomy of Viruses*)

**IDH:** Índice de Desarrollo Humano

**INEC:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

**ITS:** infecciones de transmisión sexual

**L:** tardío (del inglés, *late*)

**LCR:** región larga de control (del inglés, *long control region*)

**LSIL:** lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL del inglés, *low grade squamous intraepithelial lesion*)

**MAL:** marco abierto de lectura

**MCMC:** cadena de Monte Carlo Markov (del inglés, *Monte Carlo Markov Chain*)

**MSP:** Ministerio de Salud Pública

**NIC:** neoplasia intraepitelial cervical

nt: nucleótido

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**OR:** razón de productos cruzados (del inglés, *odd ratio*)

**pb:** pares de base

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

**PCR-TR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR, del inglés, *Real Time Polymerase Chain Reaction*)

**pRb:** proteína del Retinoblastoma.

tMRCA: tiempo al antepasado común más reciente (del inglés, *most recent common ancestor*)

**SNP:** polimorfismos de un simple nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*)

**SOLCA:** Sociedad de Lucha Contra el Cáncer

**USD:** dólares estadounidenses

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VLP:** partículas similares a virus (del inglés, *virus like particles*)

**VPH:** Virus del Papiloma Humano

**VPH-AR:** Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico

**VPH-BR:** Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo oncogénico

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
I.1. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	5
I.2. HIPÓTESIS.....	6
I.3. OBJETIVOS.....	6
I.3.1. <i>Objetivo General</i> .....	6
I.3.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	6
I.4. NOVEDAD CIENTÍFICA .....	6
I.5. VALOR TEÓRICO Y PRÁCTICO .....	7
I.6. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS QUE AVALAN EL RESULTADO .....	8
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
II.1 HISTORIA .....	9
II.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VPH .....	10
II.3. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VPH .....	11
II.4. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL VPH.....	13
II.5. TAXONOMÍA.....	13
II.6. VARIANTES GENÉTICAS DEL VPH .....	15
II.7. FILOGENIA Y EVOLUCIÓN DEL VPH .....	17
II.7.1. <i>Coevolución de los homínidos con los Virus del Papiloma Humano tipos 16 y 58</i> ...	18
II.8. TRANSFORMACIÓN E INTEGRACIÓN VIRAL DEL VPH ONCOGÉNICO.....	21
II.9. CICLO BIOLÓGICO DEL VPH.....	22
II.10. EPIDEMIOLOGÍA .....	23
II.10.1. <i>Epidemiología del cáncer cervicouterino. Distribución mundial y en el Ecuador</i> ..	23
II.10.2. <i>Epidemiología molecular de VPH por regiones geográficas</i> .....	25
II.10.3. <i>Epidemiología molecular de las variantes genéticas del VPH</i> .....	26
II.10.4. <i>Epidemiología molecular del VPH en el Ecuador</i> .....	28
II.11. ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR EL VPH.....	29
II.12. MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE LAS INFECCIONES CERVICALES POR EL VPH. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E HISTOLÓGICO DE LAS LESIONES CERVICALES .....	30
II.13. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR VPH .....	32
II.14. VACUNACIÓN CONTRA VPH COMO MÉTODO DE PREVENCIÓN DEL CACU .....	34
II.14.1. <i>Tipos de vacunas, composición y presentación</i> .....	35
II.14.2. <i>Inmunogenicidad, eficacia y efectividad</i> .....	36
II.14.3. <i>Vacunación contra VPH en el Ecuador</i> .....	37
II.15. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DEL VPH.....	38
II.15.1. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de amplio espectro para detectar ADN de VPH</i> .....	38
II.15.1.1. Cebadores MY .....	38
II.15.1.2. Hybrid Capture 2 (HC2; Digene-Qiagen).....	39
II.15.1.3. Cervista® HPV (Hologic, Inc.) .....	39
II.15.1.4. Cobas 4800 HPV (Roche Diagnostics).....	39
II.15.1.5. Abbott Real Time High Risk HPV (ART; Abbott Molecular).....	39
II.15.2. <i>Ensayos para la genotipificación del VPH</i> .....	40
II.15.2.1. Anyplex™ II HPV28 detection (H28) (Seegene®, Corea del Sur).....	40
II.15.3. <i>Ensayos para la detección de ARNm E6/E7 de VPH de alto riesgo oncogénico</i> .....	41



<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
III.1. TIPO DE ESTUDIO Y MARCO DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
III.2. UNIVERSO Y MUESTRA.....	42
III.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	42
<i>III.3.1. Criterios de inclusión .....</i>	<i>42</i>
<i>III.3.2. Criterios de exclusión.....</i>	<i>43</i>
<i>III.3.3. Criterio de salida.....</i>	<i>43</i>
III.4. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES .....	43
III.5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS .....	45
<i>III.5.1. Muestras clínicas.....</i>	<i>45</i>
<i>III.5.2. Citología.....</i>	<i>46</i>
<i>III.5.3. Métodos de extracción y evaluación de ADN.....</i>	<i>46</i>
III.5.3.1. Extracción de ADN .....	46
III.5.3.2. Evaluación de la calidad del ADN extraído .....	46
<i>III.5.4. Método de detección y tipificación universal de VPH .....</i>	<i>47</i>
III.5.4.1. Detección de VPH mediante PCR a punto final con cebadores universales .....	47
III.5.4.2. Método de genotipificación de VPH mediante el sistema comercial Anyplex™ II HPV28 (Seegene) .....	48
<i>III.5.5. Amplificación de las regiones L1, LCR, E6 y E7 del VPH 16.....</i>	<i>48</i>
<i>III.5.6. Método de purificación de productos de PCR.....</i>	<i>48</i>
<i>III.5.7. Método de tipificación por PCR - Secuenciación, por el método de Sanger .....</i>	<i>49</i>
III.5.7.1. Edición de los cromatogramas.....	49
III.5.7.2. Análisis de secuencias .....	49
III.5.7.3. Análisis filogenético de VPH 16 y VPH 58 .....	50
III.5.7.4. Análisis de coalescencia para la región L1 de VPH 16 y VPH 58 a partir de secuencias obtenidas con los iniciadores universales MY09/MY11 .....	51
III.5.7.5. Análisis de polimorfismos en las regiones L1, LCR, E6 y E7 para VPH 16, y región L1 para VPH 58.....	52
<i>III.5.8. Resumen del flujograma de trabajo.....</i>	<i>52</i>
III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
III.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	54
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
IV.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	55
IV.2. FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO, GENOTIPOS CIRCULANTES EN MUJERES CON LESIONES INTRAEPITELIALES CERVICALES Y CÁNCER CERVICOUTERINO, RESIDENTES EN LA REGIÓN LITORAL DEL ECUADOR .....	58
<i>IV.2.1. Frecuencia de infección por VPH en la población estudiada, distribución de acuerdo con las variables sociodemográficas y clínico-epidemiológicas .....</i>	<i>58</i>
<i>IV.2.2. Genotipos de VPH en la población estudiada.....</i>	<i>62</i>
<i>IV.2.3. Distribución de genotipos de VPH en la población estudiada con respecto a las provincias de residencia y al grado de las lesiones citológicas.....</i>	<i>63</i>
<i>IV.2.4. Frecuencia de infecciones múltiples por VPH .....</i>	<i>65</i>
IV.3. RELACIONES FILOGENÉTICAS Y POLIMORFISMOS DE LOS GENOTIPOS DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO TIPOS 16 Y 58 DETECTADOS EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA .....	68
<i>IV.3.1. Análisis filogenético de coalescencia para la región L1 amplificada con iniciadores universales MY09/MY11 de VPH 16 y VPH 58.....</i>	<i>68</i>

IV.3.1.1. Análisis filogenético de coalescencia de la región L1 de VPH 16.....	68
IV.3.1.2. Análisis filogenético de coalescencia de la región L1 de VPH 58.....	73
IV.3.2. Análisis filogenético de máxima verosimilitud para las regiones L1, E6, E7 y LCR de VPH 16 amplificadas con iniciadores específicos .....	76
IV.3.3. Polimorfismos y variantes intratípicas en regiones de los genes L1, E6, E7 y LCR de VPH 16 y VPH 58.....	85
IV.4. ASOCIACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS VIROLÓGICOS Y LAS VARIABLES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS Y SOCIODEMOGRÁFICAS, EN LAS PACIENTES ESTUDIADAS .....	90
IV.4.1. Análisis estadístico bivariado.....	90
IV.5. CONSIDERACIONES GENERALES.....	98
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>101</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>121</b>

---

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

---



## I. INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el agente etiológico del cáncer cervicouterino (CaCU) (1-3). Esta enfermedad se ubica como el cuarto tipo de cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial, y el segundo más común en el grupo de 15 a 44 años (4). Este virus no sólo provoca CaCU, sino que también se encuentra asociado a otros tipos de cáncer, como las neoplasias anogenitales y las de cabeza y cuello (5).

De acuerdo con los datos del último informe GLOBOCAN, realizado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés, *International Agency for Cancer Research*), en el año 2020, en el mundo se diagnosticaron 527 624 nuevos casos de CaCU y 265 672 muertes por esta patología. La incidencia varía sustancialmente por región geográfica. Para ese año, se reportaron en África, 99 038 casos; en Asia, 284 823; en América, 83 195; y en Europa, 58 373 casos (6).

El CaCU está asociado fuertemente con el nivel de desarrollo del país, expresado a través del Índice de Desarrollo Humano (IDH). Países con un bajo IDH poseen una tasa de incidencia, cuatro veces, más elevada que aquellos países con un mayor IDH. Esta relación inversamente proporcional, es aplicable a otros datos epidemiológicos tales como, la tasa de supervivencia de 5 años, que no sobrepasa el 20 % en aquellas mujeres con CaCU de países con bajo IDH, sin embargo, sobrepasa el 65 % en aquellos países que ostentan un IDH alto (5, 6).

Es por ello, que el CaCU es un problema importante de salud pública entre las mujeres que viven en países en vías de desarrollo, especialmente en América Latina y el Caribe (7-9). Se calcula que esta enfermedad provoca la muerte de 37 640 mujeres cada año en la región, lo que representa una pérdida económica mayor a 3,6 mil millones de dólares americanos (USD). Esta patología impacta desproporcionadamente a los estratos sociales más pobres y a las regiones económicas menos desarrolladas. Por ejemplo, Latinoamérica posee una tasa de CaCU tres veces más alta que Estados Unidos y Canadá (7).

Si bien en Latinoamérica se observa una reducción de la mortalidad anual entre los años 2000 y 2019, de 31 000 a 28 000 defunciones, esta disminución no está distribuida de manera equitativa (10). En varios países latinoamericanos la tasa de mortalidad anual ha disminuido, sin embargo,

en otros, aumentó, tal es el caso de Bolivia (7, 10), a pesar de que la Organización Panamericana de la Salud (OPS), ha concentrado esfuerzos adicionales para fortalecer los programas de prevención, detección precoz y control del CaCU (11).

En Ecuador, cada año se diagnostican cerca de 2 094 nuevos casos de CaCU y se reportan aproximadamente 1 026 decesos (12). Esta neoplasia constituye el segundo tipo de cáncer en la población femenina ecuatoriana con una tasa de incidencia de 20 por 200 000 mujeres (12). Es el tipo de cáncer más común en mujeres 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 (12). Esta patología demanda una cantidad considerable de recursos del estado ecuatoriano y por parte de la población afectada (13).

Varios estudios realizados en los últimos 30 años establecen que los genotipos de VPH asociados al desarrollo del CaCU, los cuales se clasifican como genotipos de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), son los tipos 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82 (4, 13-15). En este grupo, se destacan los tipos 16 y 18, a los cuales se les considera como los responsables del 70 % de los casos de CaCU a nivel mundial. De acuerdo a estos datos, el patrón de circulación de los VPH-AR establece que los genotipos 16 y 18, son los más frecuentes en mujeres con lesiones cervicouterinas de alto grado y CaCU (4, 13-17). En el continente asiático, en particular, China y Japón, se señala que después de los VPH 16 y 18, los tipos, 31, 33, 35, 52, 53 y 58, presentan frecuencias altas y asociación significativa con lesiones malignas (18, 19). En Latinoamérica se destaca la prevalencia más elevada para los tipos 16 y 18 (20). Recientemente, en investigaciones efectuadas en el noreste de Brasil y sur de México, se reportan prevalencias altas, también para otros tipos de VPH diferentes al 16 y 18, en particular los VPH 33 y 58 (21-23).

El perfil epidemiológico del VPH en el Ecuador permanece inconcluso, aun cuando la tasa de incidencia y mortalidad por CaCU es notablemente alta dentro del continente Latinoamericano. En los últimos 20 años, al igual que en el resto de Latinoamérica, se han realizado pocas investigaciones sobre la epidemiología del VPH. La mayor parte de los estudios efectuados en Ecuador se basan en métodos variados de detección y tipificación viral, por lo que existen múltiples discrepancias en cuanto a la prevalencia de los genotipos de VPH de mayor circulación (24, 25). Sin embargo, en investigaciones realizadas en los últimos años, se demuestra que aunque el VPH 16 circula con frecuencia elevada en la población femenina ecuatoriana, aunque

el VPH 58 muestra una tendencia al incremento en los casos con lesiones malignas, lo cual constituye un dato con marcada novedad científica para la región, por los pocos trabajos referentes a este tema en el país (26-28).

La infección persistente por VPH puede provocar lesiones cervicales de alto grado, que finalmente conducirán al desarrollo del CaCU (29). La persistencia viral en la condición esencial para la génesis del CaCU y se relaciona específicamente con los genotipos de alto riesgo oncogénico, condicionada por la expresión o sobreexpresión de ciertos genes virales. Se describe la existencia de tres eventos fundamentales durante la infección persistente con VPH-AR como promotores del CaCU: la integración del ácido desoxirribonucleico (ADN) viral al genoma de la célula hospedera, la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 y finalmente las complejas interacciones entre E6/E7 y las proteínas celulares (30).

Además, las variaciones del genoma de los VPH-AR pudieran influir en cualquier etapa de la infección viral y su capacidad para inducir CaCU, por lo que además de la heterogeneidad patogénica de los tipos de VPH, varios estudios indican la importancia de la determinación de las variantes y linajes filogenéticos de VPH y su asociación con diferentes riesgos de progresión al cáncer. Los VPH se clasifican de acuerdo a la similitud de su secuencia de ADN en variantes virales, las cuales han evolucionado a partir de un ancestro común, probablemente originado en África, hace más de 200 000 años. Estas variantes se clasifican en linajes cuando sus genomas completos difieren entre un 1-10 % y en sublinajes entre 0,5-1 %.

Dichas variantes se denominan de acuerdo a su origen geográfico y sus relaciones filogenéticas, como Linaje A (europeas y asiáticas), Linajes B y C (africanas) y Linaje D (asiático-americanas). Una observación interesante es el contraste entre la relativa homogeneidad del linaje A (europeo) en comparación con la heterogeneidad en los linajes no europeos (linajes B/C/D) (31).

El VPH 16 es el más estudiado hasta la fecha, para el cual, además de las variantes de los principales linajes se han identificado hasta la fecha 16 sublinajes, el linaje A abarca 4 sublinajes: A1-3 (donde se incluyen todas las secuencias europeas) y A4 (secuencias asiáticas); los linajes B (africanos 1) y C (africanos 2), incluyen 4 sublinajes cada uno (B1-4 y C1-4, respectivamente) y el linaje D, incluye 4 sublinajes: D1 (norteamericano), D2 y D3 (asiático-americano) y D4. Con respecto a la importancia clínica de estos sublinajes, los estudios de asociación a nivel mundial indican que, en comunidades multiétnicas como las latinoamericanas, las variantes pertenecientes

a los linajes no europeos son más agresivas que las pertenecientes a linajes europeos en su relación con la progresión hacia el CaCU (31).

Un número creciente de datos epidemiológicos, etiológicos y moleculares sugiere que las variantes del mismo tipo de VPH pueden ser biológicamente distintas y pueden conferir riesgos patogénicos diferenciales. Se ha demostrado que la variabilidad de nucleótidos dentro la región no codificante del genoma de VPH conduce a diferencias en la afinidad de unión de algunos factores transcripcionales celulares y al aumento de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (32-37). Además, los estudios *in vivo* e *in vitro* revelan diferencias en las propiedades bioquímicas y biológicas de E6 y E7 entre variantes moleculares. Estos resultados son importantes para el desarrollo de vacunas y para determinar hasta qué punto la inmunización con partículas similares al virus (VLP, del inglés, *virus like particles*) L1 de una variante podría inducir anticuerpos que neutralicen de forma cruzada contra otras variantes (32-37).

No obstante, existen múltiples factores involucrados en la carcinogénesis cervical asociada al VPH. Entre estos factores se encuentran los del hospedero, y los más estudiados son la multiparidad, el tabaquismo, el uso de contraceptivos orales por largos períodos, conductas sexuales de riesgo, como el cambio frecuente de pareja y la práctica de sexo desprotegido, el bajo nivel socioeconómico, y otros factores ambientales, sociales y culturales que han sido identificados por la literatura científica (38, 39). En el Ecuador aún no se definen los factores de riesgo, virales o externos, que se encuentran mayormente asociados con el desarrollo de las lesiones precursoras del CaCU, tampoco se define un patrón de circulación viral por regiones geográficas dentro del país.

Dentro de este contexto, se evidencia que la situación epidemiológica del VPH y del CaCU en el Ecuador representa un punto crucial en el marco de la salud pública, que requiere evidencias desde el punto de vista científico, para lograr acciones encaminadas a la disminución de las tasas de incidencia y mortalidad por CaCU en las mujeres ecuatorianas. En los últimos años se han venido desarrollando algunos estudios encaminados a establecer los genotipos de VPH más prevalentes y los factores de riesgo mayormente asociados al desarrollo del CaCU en la población ecuatoriana (40, 41). En este sentido, algunas investigaciones evidencian el posible papel del VPH 58 y otros genotipos de alto riesgo, diferentes del 16 y 18, en la etiología del CaCU. En dichos estudios, los autores identificaron la presencia del VPH 58 como uno de los más frecuentes, tanto en pacientes con lesiones cervicouterinas como en mujeres sanas (26, 27).

Sin embargo, la información resultante es heterogénea, parcial y representa únicamente realidades locales, sin considerar el contexto nacional.

Con la reciente introducción en el Ecuador de las vacunas comerciales contra el VPH, es esencial identificar los tipos y variantes genéticas virales que circulan en las diferentes regiones del Ecuador, su asociación con características sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas de la población ecuatoriana y en especial, con el desarrollo del CaCU. Por esta razón, el presente trabajo se propone definir la frecuencia de genotipos y variantes genéticas del VPH circulantes en mujeres mayores de 30 años, residentes en la región Litoral del Ecuador, su asociación con el desarrollo de lesiones cervicales y con factores sociodemográficos y clínico-epidemiológicos. Como población de estudio se consideraron a las mujeres residentes en la región Litoral (región más poblada del Ecuador), con una edad igual o mayor a 30 años y que hubieran sido diagnosticadas con lesiones intraepiteliales cervicales o CaCU. Se consideró estudiar este grupo etario ya que, de acuerdo con la literatura científica, es el que tiene mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras y CaCU a mediano y largo plazo (41).

La información generada aportará evidencia homogénea y ampliada sobre la situación epidemiológica del VPH en el Ecuador y hará posible estimar el posible impacto de las vacunas disponibles en el mercado y de los programas para la detección precoz del CaCU.

### **I.1. Preguntas de investigación**

¿Cuáles son las características clínico-epidemiológicas asociadas a las lesiones cervicales precursoras y al CaCU presentes en la población objeto de estudio?

¿Cuáles son los principales genotipos de VPH asociados a las lesiones cervicales precursoras y al CaCU presentes en la población analizada?

¿Existen variantes intratípicas asociadas a lesiones cervicouterinas de alto grado en los genotipos de VPH más frecuentes de la población investigada?

¿Cuál es la frecuencia de las infecciones múltiples por VPH en las mujeres infectadas?

¿Existen combinaciones de VPH que presenten una asociación significativa con lesiones cervicales precursoras y con el CaCU, en las mujeres incluidas en el estudio?

Para dar respuesta a las preguntas de investigación se formuló la siguiente hipótesis y se plantearon los objetivos del trabajo.



## **I.2. Hipótesis**

En mujeres con lesiones cervicales, residentes en la región Litoral del Ecuador, los genotipos del Virus de Papiloma Humano circulantes y sus variantes genéticas asociadas a determinadas características clínicas, epidemiológicas y sociodemográficas, muestran un patrón diferente al de otras regiones de Latinoamérica y el mundo.

## **I.3. Objetivos**

### **I.3.1. Objetivo General**

Determinar la circulación de genotipos y variantes genéticas del Virus de Papiloma Humano en mujeres de la región Litoral del Ecuador, y su asociación con la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales, factores sociodemográficos y clínico-epidemiológicos.

### **I.3.2. Objetivos Específicos**

1. Identificar los genotipos del Virus del Papiloma Humano e infecciones múltiples, en mujeres ecuatorianas con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, residentes en la región Litoral del Ecuador.
2. Definir las relaciones filogenéticas y variantes intratípicas de los genotipos del Virus del Papiloma Humano identificados en la población estudiada, con respecto a los que circulan en América Latina y el Mundo.
3. Determinar la asociación entre los resultados de los estudios virológicos y las variables clínico-epidemiológicas y sociodemográficas, de las pacientes incluidas en el estudio.

## **I.4. Novedad científica**

- Primer estudio realizado sobre la epidemiología del Virus del Papiloma Humano en mujeres con lesiones cervicouterinas de todas las provincias de la región Litoral del Ecuador.
- Primer estudio en la región Litoral del Ecuador que demuestra una frecuencia elevada de infecciones múltiples por VPH en mujeres mayores de 30 años, con lesiones cervicouterinas y CaCU.
- Primer estudio realizado en el Ecuador donde el mayor porcentaje de las mujeres infectadas por VPH son casadas y amas de casa.
- Por primera vez se publican en el banco de genes la mayor cantidad de secuencias parciales del gen L1 de diferentes genotipos de VPH identificados en mujeres ecuatorianas.

- Primer estudio del Ecuador donde se muestra que ciertas combinaciones de genotipos de VPH son factores de riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales premalignas y cáncer cervical en mujeres infectadas.
- Se determina por primera vez que co-circulan en mujeres de la región Litoral, dos linajes diferentes de VPH 16.
- Se determina, por primera vez, que el VPH 58 es el genotipo más prevalente en las mujeres infectadas por VPH procedentes de la región Litoral del Ecuador.

### **I.5. Valor teórico y práctico**

- El porcentaje elevado de mujeres “amas de casa” infectadas con VPH plantea nuevas interrogantes sobre el impacto de esta ITS y del machismo en la transmisión. Estos aspectos deberían ser abordados por nuevos proyectos de investigación social y biomédica y por la Autoridad Sanitaria Nacional del Ecuador para establecer estrategias de control y prevención de este agente infeccioso.
- La circulación predominante de los VPH de alto riesgo, tipos 58, 31, 33 y 35, plantea una actualización del esquema vacunal contra el VPH en el Ecuador, dado que estos genotipos no forman parte de las vacunas comerciales bivalentes que son empleadas actualmente en el plan de inmunización ejercido por la Autoridad Sanitaria Nacional.
- La presente investigación aporta información teórica para proponer la introducción de una vacuna contra el VPH, que incluya los genotipos mencionados, lo que reforzará los esquemas de vacunación.
- La proporción elevada de mujeres positivas a VPH, con lesiones precursoras o CaCU y sin síntomas clínicos o trastornos ginecológicos evidencia la necesidad de intensificar la pesquisa activa para detectar precozmente la infección viral y la presencia de lesiones cervicouterinas.
- El uso de los métodos moleculares de detección y tipificación constituyen herramientas robustas en el de manejo, control y monitoreo de las pacientes infectadas. Estas herramientas podrían ser utilizadas por los hospitales del Ministerio de Salud Pública (MSP) y la red de centros oncológicos nacionales para dar prioridad a aquellas pacientes que requieren intervención médica a corto plazo.
- El hallazgo de la circulación del linaje asiático del VPH 16 en mujeres de la región costera del Ecuador, es un elemento que debería ser considerado en el manejo y pronóstico de las

pacientes infectadas con este genotipo viral, pues son las que poseen un riesgo incrementado para desarrollar CaCU a corto plazo.

- La información generada por esta investigación ha permitido la publicación de dos artículos científicos y su presentación en diversos eventos científicos. También ha contribuido al desarrollo de dos tesis de maestría en biotecnología molecular y cuatro tesis de pregrado en biología.

#### I.6. Publicaciones científicas que avalan el resultado

- **Bedoya C**, Sánchez Giler S, Zambrano D, Herrera A, Silva A, Kuon Yeng C, et al. Caracterización clínica e histopatológica de la infección por Papiloma Virus humano de muestras de cérvix. Hospital Teodoro Maldonado Carbo “IESS.” **Rev Cienc UNEMI. 2017; 10 (23): 105-111.**
- **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; 50 (2):136-46.**
- **César Humberto Bedoya Pilozo**, Yudira Soto Brito, Maylen Espinosa García, Peter Chedraui Alvarez, Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo, Rita Loja Chango, Sunny Sánchez Giler, Vivian Kouri Cardellá. Infecciones múltiples por *Alphapapillomavirus*, especie 9, en mujeres ecuatorianas con lesiones intraepiteliales y cáncer cervicouterino. **Rev Cub Med Trop. 2022; 74 (1).**

Los eventos científicos, los proyectos de investigación y las tesis relacionados con el tema aparecen en el Anexo 1.

---

**CAPÍTULO II**  
**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1 Historia

Desde la antigüedad, los griegos y romanos consideraban a las verrugas cutáneas y genitales productos de la promiscuidad sexual. A mediados del siglo XIX, el médico italiano Rigoni-Stern comprobó que el cáncer cervical era muy frecuente en mujeres casadas, viudas y prostitutas, y bastante raro en mujeres vírgenes. Esta observación lo condujo a la conclusión de que el cáncer cervical tenía una transmisión sexual. Ciuffo, en 1907 establece la naturaleza viral de esta infección, a través de la auto-inoculación de extracto de verrugas, el cual estaba libre de células y fue capaz de provocarle la formación de estas lesiones (42). Este hecho es luego corroborado en los años 40 con la microscopía electrónica (43). Sin embargo, a partir de ese momento, debido a la falta de modelos animales y de aislamiento por cultivo celular, no se dan mayores avances en el campo de la etiología del cáncer cervical. A finales de los años 60 y principios de los 70, se retoma la investigación, con la caracterización del virus presente en las verrugas por microscopía electrónica. Se les define como virus de ADN de doble cadena y se les reconoce como el virus de las verrugas. Se determina, además, la heterogeneidad de este nuevo agente viral mediante estudios de aglutinación, antiseros y ensayos de hibridación (44, 45).

Al principio, el virus de las verrugas se identifica como un virus de la familia *Herpesviridae*, del tipo del Herpes Simplex 2. No obstante, estudios realizados por el grupo del Dr. Harald zur Hausen en 1974 descartan esta hipótesis al no poder identificar el ADN de este virus en muestras de cáncer cervical. Tomando esta evidencia, zur Hausen propone que el virus de las verrugas, llamado entonces Virus del Papiloma Humano (VPH), pertenece a un nuevo grupo taxonómico viral, que al principio se agrupó con los Poliomavirus en la familia *Papoviridae*, pero con la profundización en el conocimiento de sus características biológicas y su papel en la etiología del cáncer cervical, se clasificó en una familia independiente, la familia *Papillomavidae* (46). Así, el Dr. zur Hausen hace un llamado para el desarrollo de nuevas investigaciones sobre el VPH y posibles vacunas para la lucha contra el cáncer cervical. Inicialmente, la comunidad científica se mantiene escéptica con este hallazgo, pero durante la década de los 80s, se realizan grandes avances en este campo. Se descubren nuevos tipos de VPH como el 6 y el 11, y partir de biopsias

de cáncer cervical, los tipos oncogénicos 16 y 18. Se logra reproducir in vitro la oncogénesis de este nuevo virus, primero en células de roedores y luego en queratinocitos (15, 47).

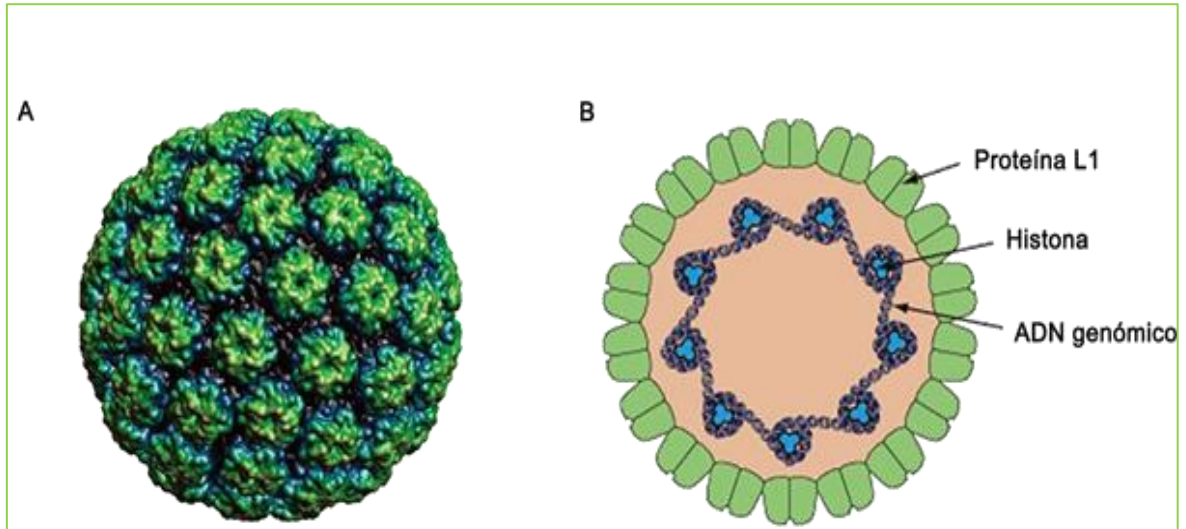
Con el descubrimiento de las funciones oncogénicas de las proteínas virales E6 y E7 se logra definir la vía carcinogénica de este nuevo virus. En los años 90, se demuestra la distribución mundial de este nuevo virus, que está asociado con el 99 % de los casos de cáncer cervicouterino (CaCU), el 90 % de los de la región anogenital y en menor grado, con otras neoplasias localizadas en diferentes sitios anatómicos (44, 45).

## **II.2. Características generales del VPH**

El VPH se considera el virus de transmisión sexual más común, el agente etiológico del CaCU, y en general de los cánceres de la región anogenital (44, 45). En la década de 1990, se confirmó la relación causal entre el VPH y el cáncer de cuello de útero, siendo el carcinoma de células escamosas (CCE), el tipo histológico más frecuentemente diagnosticado (80-90 %), seguido por el adenocarcinoma (15, 47).

El VPH tiene un tropismo definido por los epitelios estratificados de piel y mucosas y es también el causante de verrugas con morfologías variadas en ambas localizaciones. Además, tiene la capacidad de persistir en las células basales infectadas, y durante la persistencia viral determinados genotipos pueden integrar su genoma al ADN nuclear del hospedero, alterando el ciclo celular y originando neoplasias, no sólo cervicouterinas, sino en otros sitios anatómicos, tal es el caso de las neoplasias anales, vulvares, orofaríngeas y laríngeas (48).

Son virus desnudos, la cápsida viral presenta simetría icosaédrica, tiene un diámetro de 55 nm y está compuesta por 72 capsómeros, de los cuales 60 son hexonas y el resto pentonas. Está formada por dos proteínas estructurales; una de ellas denominada L1, se conoce como la proteína mayoritaria de la cápsida y la otra proteína estructural, L2, que se conoce como proteína minoritaria de la cápsida por representar un menor porcentaje dentro de la misma (Figura 1). Al ser virus desnudos, los VPH son relativamente resistentes al calor y a los solventes orgánicos, incluso muestran una resistencia y estabilidad mayor que otros virus desnudos (49, 50).

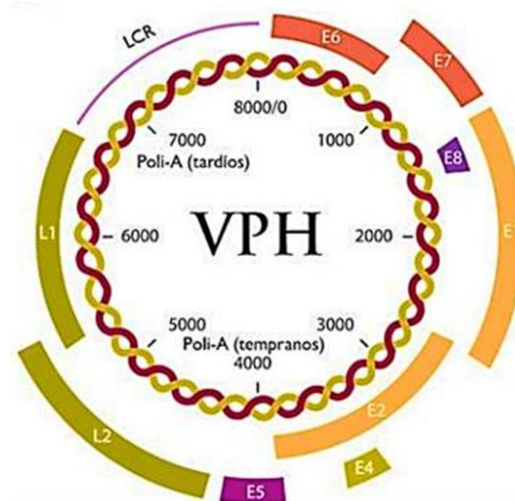


**Figura 1.** Representación estructural del Virus del Papiloma Humano. **Fuente:** (50).

### II.3. Organización genómica del VPH

Los VPH presentan la misma organización genómica para todos los genotipos existentes. Se trata de un ADN circular de doble hebra lineal de 8 kb, con un diámetro de 52-55 nm. Posee en promedio ocho marcos abiertos de lectura (MAL), que son expresados a través de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) policistrónicos (49, 50). Este codifica para nueve genes, los cuales se clasifican en: Regiones tempranas (E, por “*early*” en inglés) y contienen aproximadamente 4000 pares de base (pb). Incluyen los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que codifican para proteínas transformadoras, replicadoras y reguladoras. La Región tardía (L, por “*late*” en inglés), posee 3000 pb y comprende los genes L1 y L2 que codifican para proteínas estructurales de la cápsida. La Región reguladora, conocida como la Región Larga de Control o LCR, por sus siglas en inglés (*Long Control Region*), contiene 1000 pb y en ella se encuentran los sitios donde se unen los factores de transcripción, que controlan la replicación viral y la expresión génica (51, 52). La organización del genoma de VPH se ilustra en la figura 2.

La función de los genes localizados en las diferentes regiones del genoma del VPH, así como de las proteínas codificadas, se resume en la Tabla 1.



**Figura 2.** Estructura del genoma del Virus del Papiloma Humano, género *Alpha*. Región E temprana que contiene los genes E1, E2, E4, E5 y los oncogenes E6 y E7 causantes de la transformación maligna de la célula infectada. E1 y E2 mantienen bajos los niveles de expresión de E6 y E7. La integración al genoma de la célula infectada ocurre en las regiones E1 y E2, produciéndose sobre expresión de los oncogenes virales. **Fuente:** Modificada de Doorbar, J. y cols. 2015 (53).

**Tabla 1.** Principales funciones de regiones del genoma y las proteínas del VPH.

<b>REGIÓN</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>LCR</b>	Sitio de unión de factores de transcripción, controla la expresión génica.
<b>E6</b>	Promueve la inmortalización celular mediante la degradación de p53, modifica la adhesión celular y la diferenciación por la degradación Tap63 y p73.
<b>E7</b>	Promueve la degradación de pRb permitiendo la progresión de la fase S del ciclo celular, induce a la inestabilidad cromosomal.
<b>E5</b>	Induce a la proliferación celular, contribuye a la evasión de la apoptosis, regula a la baja la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad.
<b>E1</b>	ADN helicasa dependiente de ATP, participa en la replicación viral.
<b>E2</b>	Co-activador de la replicación del ADN viral, represor transcripcional de E6 y E7, regula el ciclo celular y la apoptosis, interactúa con la cromatina para la segregación del genoma viral.
<b>E4</b>	Se une a las proteínas del cito-esqueleto para alterar su estructura en la fase G2.
<b>L1</b>	Proteína estructural mayoritaria, se auto ensambla en capsómeros, interactúa con la proteína L2 para formar la cápsida.
<b>L2</b>	Proteína menor de la cápsida.

**Fuente:** (51, 52).



## II.4. Organización estructural del VPH

Las proteínas que forman la cápsida contienen 360 copias de la proteína mayoritaria (L1) y de la proteína minoritaria (L2), sólo 12 copias. L1, es una proteína de 55 kD, constituye el 83 % de la cápsida, posee la capacidad de auto ensamblarse espontáneamente en partículas similares a virus (VLP- del inglés, *virus like particles*). Así mismo, ayuda en el ensamblaje de estos VLP hacia las células diferenciadas de las capas superficiales del epitelio cervical. Las VLP ensambladas, son inmunógenos potentes probablemente debido a la capacidad de reconocimiento de las células B y de sus epítopes de superficie, además presentan una superficie exterior indistinguible del virión nativo. Es por ello que la región L1, es utilizada como diana para el diseño de vacunas profilácticas contra el VPH (51, 52).

## II.5. Taxonomía

Estos virus pertenecen a la familia *Papillomaviridae* (49). Los géneros de esta familia se han designado con letras griegas (Ejemplo *Alphapapillomavirus*). Hasta el momento hay 39 géneros, pero el VPH contiene especies en cinco de estos géneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* y *Nupapillomavirus* (Tabla 2) (51, 52, 54, 55).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica del VPH.

<b>GÉNEROS</b>	<b>ESPECIES</b>	<b>TIPOS</b>
<i>Alphapapillomavirus</i>	14	61
<i>Betapapillomavirus</i>	5	46
<i>Gammapapillomavirus</i>	27	77
<i>Mupapillomavirus</i>	2	1
<i>Nupapillomavirus</i>	1	1

**Fuente:** Tomado de, de Villiers & Fauquet, 2004 (54) y Bernard y cols., 2013 (51), corregido por Van Doorslaer y cols., 2018 (52).

Los «grupos filogenéticos» de los VPH a nivel de especies, se designan por la letra griega asociada con el género, combinado con un número, por ejemplo, *Alpha-9*. A nivel de especie, la nomenclatura es definida por el grupo que se dedica al estudio de los *Papillomavirus* dentro del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Committee for Taxonomy of Viruses*, por sus siglas en inglés) (51, 52, 54, 55).

La clasificación del VPH está basada en la secuencia nucleotídica del MAL, que codifica para la proteína mayoritaria de la cápsida L1, el cual es el más conservado de los genes dentro del genoma. Se usa el término «género», cuando comparten entre el 23% y el 43 % de identidad de secuencia de nucleótidos en la longitud completa de los genomas y menos del 60 % de identidad de secuencia de nucleótidos del MAL de L1. Las «especies» se definen cuando dentro de un género, comparten entre el 60 % y el 70 % de identidad de la secuencia de nucleótidos del MAL de L1 (51, 52, 54, 55).

Dentro de las especies de VPH se encuentran los llamados «tipos» o «genotipos» y se designan como VPH, seguido de un número (Por ejemplo, VPH 16). En el caso de que un genoma completo sea aislado, clonado y secuenciado, se considera que es variable si el MAL de L1 difiere en más de 10 %, a partir del tipo de VPH más cercano conocido, pasando a ser un nuevo tipo (51, 54, 55). Las diferencias entre 2 % y 10 % de homología se definen como subtipo y menos de 2 % definen una variante. A los nuevos tipos de VPH se le asigna un único número, solamente después de que todo el genoma ha sido clonado y registrado por el Centro de Referencia Internacional de VPH (Tabla 2). Hasta la actualidad, se han identificado unos 360 potenciales genotipos diferentes de VPH (51, 52, 54, 55).

En atención a propósitos de salud pública, las investigaciones se centran en el estudio del VPH dentro del género *Alphapapillomavirus* por la asociación con lesiones patológicas y oncogénicas (56). Esta familia está compuesta por los linajes, variantes y sublinajes, que también se organizan en grupos de especies: *Alpha-3* (VPH 61), *Alpha-5* (VPH 26, 51, 69 y 82), *Alpha-6* (VPH 30, 53, 56, 66), *Alpha-7* (VPH 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85 y 97), *Alpha-9* (VPH 16, 31, 33, 35, 52, 58 y 67), *Alpha-10* (VPH 6 y 11) (57).

Los genotipos de la especie *Alphapapillomavirus-9* han demostrado poseer una gran importancia clínica y epidemiológica, pues incluyen al VPH 16, genotipo de VPH de “alto riesgo” (VPH-AR), que es altamente prevalente y carcinogénico, al igual que los VPH 31, 33, 35, 52 y 58; siendo la excepción el VPH 67 debido a su baja prevalencia (51).

Hasta el momento, se han asociado casi 180 genotipos diferentes del VPH a las infecciones de la mucosa genital y se clasifican en tres grandes grupos, de acuerdo al epitelio que infectan: cutáneos, Epidermodisplasia Verrugociforme (EV) y mucosos. Los tipos de VPH mucosos

asociados con lesiones benignas (tipos 6 y 11 principalmente) son conocidos como tipos de “bajo riesgo” (VPH-BR) y se detectan preferentemente en los condilomas acuminados (51).

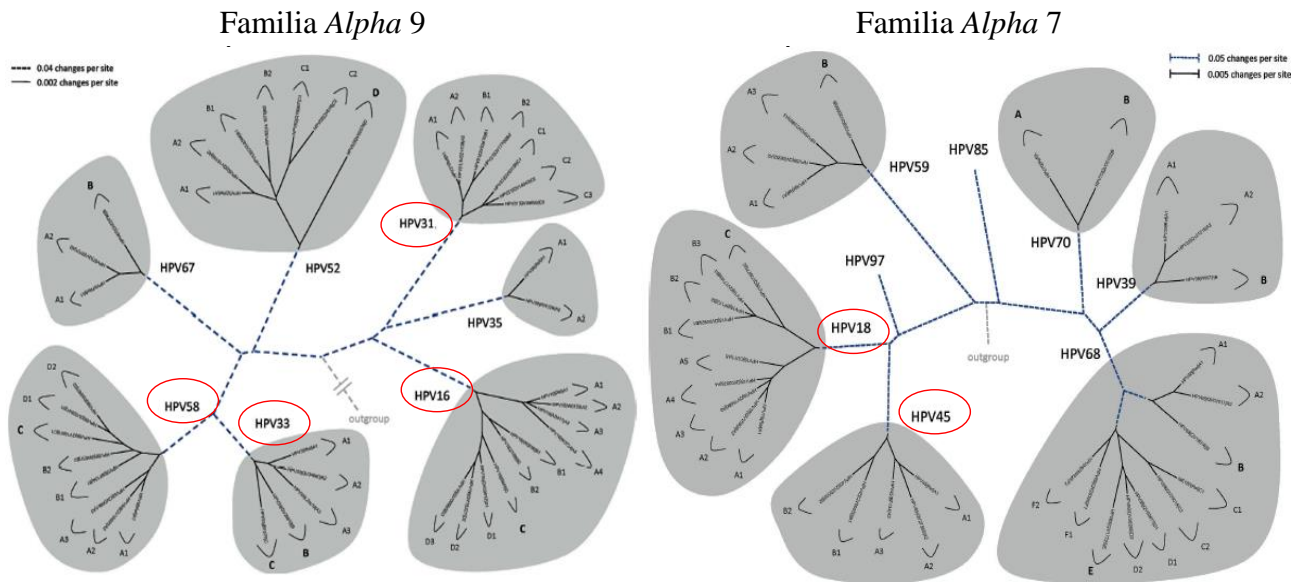
## II.6. Variantes genéticas del VPH

El genoma del VPH 16, con 7904 pb, se secuenció por primera vez por Seedorf y cols., en 1985 (58). Desde entonces, se han encontrado muchas variantes de origen natural. Una variante de VPH es un genoma definido por una combinación única de polimorfismos de un simple nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*), con una variación de menos de 2 % en la región codificante y menos de 5 % en las regiones no codificantes (59). Una propuesta reciente define los linajes como las principales variantes, por una diferencia de aproximadamente el 1,0 % entre los genomas completos del mismo tipo de VPH, mientras que las diferencias de 0,5 % a 0,9 % entre genomas, son considerados sublinajes (57).

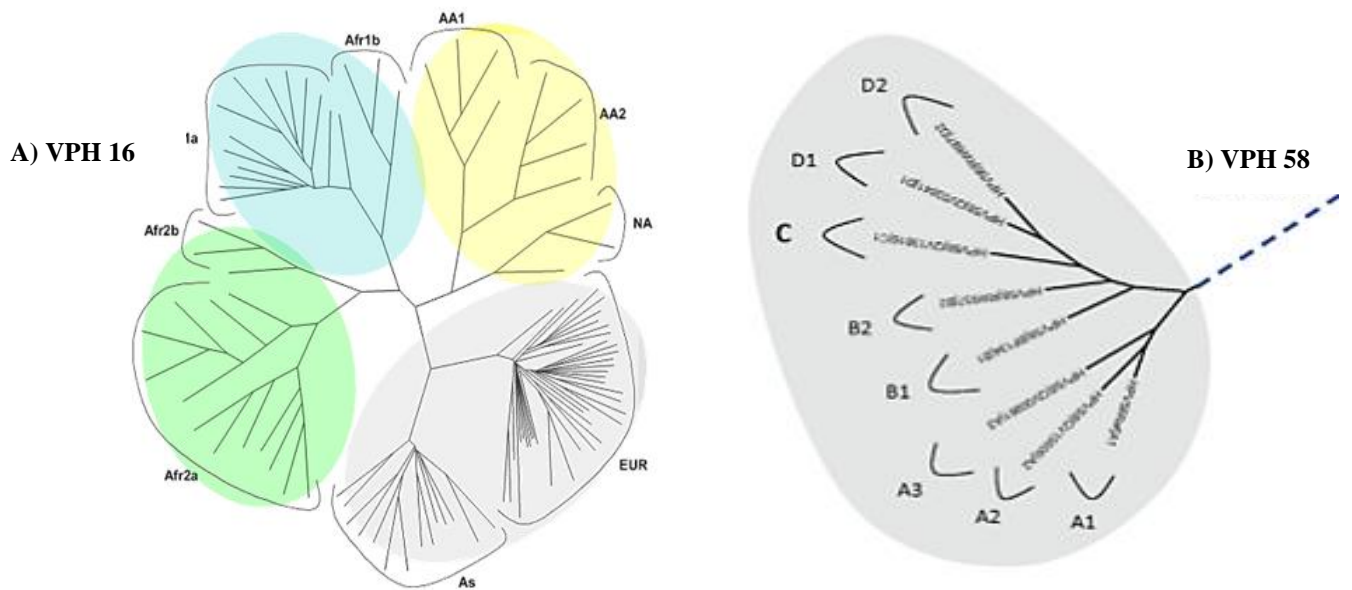
La diversidad genómica es, a menudo, menor en regiones conservadas, pero muy alta en regiones no codificantes, especialmente en la región LCR. Numerosas variantes de todos los tipos de virus del papiloma que son diagnosticados en la rutina clínica, se han encontrado en humanos. Ciertas variantes de cada tipo parecería que han evolucionado en las poblaciones humanas de acuerdo a las zonas geográficas. Esto parece evidente, ya que muchos tipos de VPH son más prevalentes en algunos grupos étnicos y ausentes o raros en otros (57, 60, 61).

De acuerdo a estos datos, las variantes de VPH se denominan en correspondencia con su origen geográfico y sus relaciones filogenéticas como: Linaje A (europeas y asiáticas), Linajes B y C (africanas) y Linaje D (asiático-americanas). Una observación interesante es el contraste entre la relativa homogeneidad del linaje A (europeo) en comparación con la heterogeneidad en los linajes no europeos (linajes B/C/D) (31).

Se han identificado variantes o linajes, y sublinajes, para una gran variedad de VPH, en el Anexo 2 se muestran las variantes genéticas del género *Alphapapillomavirus*, asociadas principalmente a lesiones en humanos. Sin embargo, es importante destacar que la variabilidad genética del VPH se ha estudiado con mayor profundidad en los genotipos oncogénicos más frecuentemente asociados al CaCU, específicamente los de las especies *Alpha 7* y *9* (Figura 3).



**Figura 3.** Árboles filogenéticos que muestran tipos representativos y variantes de linajes y sublinajes de las especies *Alpha 7* y *9*. La longitud de las líneas discontinuas y sólidas representa la distancia entre los aislamientos, aunque el número de cambios es diferente para estas dos líneas; la escala se indica en la esquina superior izquierda de la figura. **Fuente:** Adaptada de Burk y cols., 2013 (57).



**Figura 4.** Árboles filogenéticos que muestran tipos representativos y variantes de linajes y sublinajes de A) VPH 16 y B) VPH 58. La longitud de las líneas discontinuas y sólidas representa la distancia entre los aislamientos. **Fuente:** Adaptada de Burk y cols., 2013 y de Cornet y cols., 2012 (57, 60).

El VPH 16 es el más estudiado hasta la fecha, para el cual, además de las variantes de los principales linajes se han identificado hasta la fecha 16 sublinajes, el linaje A abarca 4 sublinajes: A1-3 (donde se incluyen todas las secuencias europeas) y A4 (secuencias asiáticas); los linajes B (africanos 1) y C (africanos 2), incluyen 4 sublinajes cada uno (B1-4 y C1-4, respectivamente) y el linaje D, incluye 4 sublinajes: D1 (norteamericano), D2 y D3 (asiático-americano) y D4 (31). El VPH 58 también refleja una variabilidad genética asociada con su distribución geográfica y sus relaciones filogenéticas, pero la heterogeneidad de los sublinajes, hasta el momento, es mucho menor a la observada para VPH 16 (Figura 4) (57).

Con respecto a la importancia clínica de estos sublinajes, los estudios de asociación a nivel mundial indican que, en comunidades multiétnicas como las latinoamericanas, las variantes pertenecientes a los linajes no europeos son más agresivas que las pertenecientes a linajes europeos en su relación con la progresión hacia el CaCU (31).

La contribución de las variantes genéticas a la carcinogénesis del cáncer cervicouterino puede ser dividida en 4 formas: (1) Adquisición de la infección por exposición (diferencias en la infectividad); (2) persistencia a largo plazo (mayor a uno o dos años puede reflejar diferencias virales en la respuesta inmunitaria del hospedero u otras propiedades biológicas); (3) el desarrollo de lesiones cervicales precursoras debido a la persistencia (diferencias en la desregulación de la diferenciación celular o acumulación de cambios celulares somáticos en las células premalignas o del estroma; y por último, (4) invasión de células que contienen VPH. Se asumen que el cáncer cervicouterino más invasivo pasa a través de todas las fases de lesión cervical, sin embargo, existen diferencias significativas entre el carcinoma de células escamosas, más común y el adenocarcinoma de cérvix, más raro (57).

Los patrones de distribución de las variantes en las poblaciones humanas actuales probablemente pudieran tener dos orígenes, antiguos cuellos de botella durante la evolución y dispersión de los grupos étnicos, y las infecciones luego del viaje y mezcla de poblaciones en tiempos más recientes. En algunos casos, las variantes de VPH se diseminan como genes que se heredan de manera mendeliana y la carga viral de la población refleja su composición étnica (62).

## **II.7. Filogenia y evolución del VPH**

Según los estudios filogenéticos se sugiere que estos virus tienen un origen monofilético y han co-evolucionado con la especie humana, especulándose un origen africano (62, 63). Se ha

demostrado que los diferentes genes tienen diferentes tasas de evolución entre y dentro de los tipos de VPH, por lo tanto, la diversificación del VPH ha sido impulsada por múltiples mecanismos, incluyendo la recombinación, y no sólo por la co-evolución con los hospederos (64-66). La variación genómica del VPH 16 y del VPH 18 se ha estudiado ampliamente. El VPH 58 presenta un proceso evolutivo muy similar al ocurrido con el VPH 16. Las variantes de estos tipos virales forman árboles filogenéticos con ramas que contienen variantes con alta prevalencia en cohortes de África, Europa o Asia oriental, con una de las ramas filogenéticas de Asia oriental, que incluye las variantes que predominan en las poblaciones de nativos americanos. Por tanto, estos árboles son un reflejo de la evolución y la migración del ser humano, su hospedero, en todo el mundo. Se sugiere que ciertas variantes aparecieron aproximadamente en el mismo momento en que se formaron los principales grupos étnicos (64-66).

### **II.7.1. Coevolución de los homínidos con los Virus del Papiloma Humano tipos 16 y 58**

La filogeografía integral del VPH 16 muestra que el linaje A es dominante en Eurasia y las Américas, las variantes de los linajes B y C son las más prevalentes en África subsahariana y el linaje D tiene una prevalencia más alta en las Américas (67).

Esta dispersión geográfica de las diferentes variantes del VPH 16 no puede ser explicada tan solo por el proceso de coevolución con las poblaciones humanas. La distribución geográfica actual de la diversidad genética humana explica como máximo entre el 10 y el 15 % de la distribución geográfica, observada para la diversidad genética del VPH 16. Por lo tanto, la reciente co-divergencia virus-hospedero por sí sola, proporciona poca capacidad explicativa para comprender la evolución del VPH 16. El escenario más parsimonioso propone en cambio, un origen antiguo de las variantes de VPH 16, donde cada población de homínidos antiguos inicialmente coexistía con una colección similar de variantes de VPH 16 (68).

La teoría más reciente, expuesta en una investigación de 2017, sugiere que los VPH tomaron dos líneas evolutivas diferentes que co-divergieron con sus hospederos, dentro de cada población de homínidos antiguos en África y en Eurasia. Se plantea que el mestizaje posterior en Eurasia, entre los neandertales/denisovanos y los ancestros de los humanos modernos, probablemente condujo a eventos de persistencia de una fracción de los VPH, debido al cambio de hospedero entre homínidos antiguos, lo cual condujo a la coevolución de un grupo de virus con relevancia clínica hasta el día de hoy (69).

Una co-divergencia exclusiva en Eurasia creó una variante de VPH 16 distinta en los neandertales/denisovanos que condujo al linaje A. En un punto de tiempo evolutivo posterior, en los ancestros de los humanos modernos de África aparecen variantes de VPH 16 con una diversidad genética distinta (B, C y D). Después ocurre la migración fuera de África y la introgresión repetida entre neandertales/denisovanos y ancestros humanos modernos en Eurasia, como eventos paralelos. De esta forma se transmitió el linaje A de VPH 16 a los ancestros de los humanos modernos, el linaje B solo queda en África y el linaje D en Eurasia (67).

Con estos hallazgos, podríamos explicar la pregunta sin resolver: por qué la variante A de VPH 16 está prácticamente ausente en África subsahariana, mientras que es la más común entre las poblaciones fuera de África (67).

- Es muy probable que las formas ancestrales de los linajes de VPH 16 hayan infectado a todas las poblaciones humanas antiguas, al menos desde el *Homo erectus* en África.
- Cuando las poblaciones de neandertales y denisovanos divergieron exclusivamente en Eurasia hace unos 400 000 a 800 000 años, portaban una muestra de variantes de VPH 16, que evolucionaron hacia el linaje A.
- Cuando ciertas poblaciones de ancestros de los humanos modernos emigraron desde África hace unos 60 000 a 120 000 años, llevaron consigo una muestra de infecciones por VPH 16, donde estaban incluidos los linajes ancestrales B, C y D.
- El mestizaje, en gran medida entre los neandertales/denisovanos y las poblaciones de ancestros de los humanos modernos, resultó en una introgresión que moduló profundamente las respuestas inmunitarias de los ancestros de humanos modernos contra las infecciones virales.
- El mestizaje persistente entre humanos antiguos y modernos permitió la transmisión sexual de la variante A de VPH 16 de poblaciones antiguas a los ancestros de humanos modernos.
- La variante B de VPH 16 desapareció fuera de África con la primera ola de humanos anatómicamente modernos que abandonaron el continente. Eventos históricos posteriores (por ejemplo, el comercio de esclavos) llevaron a la reintroducción más reciente de esta variante en las Américas.

- El linaje CD de VPH 16 evolucionó a linaje C en África y a linaje D en Eurasia. Este último linaje se extendió con más éxito que otras variantes entre las poblaciones humanas que originalmente colonizaron las Américas (68).

Por otra parte, el VPH 58 presenta un proceso evolutivo muy similar al ocurrido con el VPH 16. Es conocido que el VPH 58 es uno de los tipos oncogénicos que se asocia a una alta proporción de cánceres de cuello uterino en el este de Asia. Existen evidencias que indican que las variantes de VPH son diferentes en cuanto a persistencia, carga viral y oncogenicidad, lo que sugiere que cada linaje de VPH tiene una historia evolutiva diferente en su población hospedera. Se estima que la división inicial de las variantes de VPH 58 ocurrió hace 478 600 años. Este tiempo de divergencia está dentro de la era de la especiación entre el *Homo sapiens* y los neandertales/denisovanos, y es alrededor de tres veces mayor que los tiempos de divergencia del *Homo sapiens* moderno. Las variantes de VPH 58 pueden haber coevolucionado con homínidos antiguos y dispersarse por todo el planeta a través del cruce entre hospederos y el flujo de genes (70).

Existe una dispersión predominante de variantes A de VPH 58 en todo el mundo y de variantes A1/A3 en Asia. Lo que es más importante, los tiempos de divergencia estimados para las variantes de VPH 58 son anteriores, en gran medida, a la reciente migración fuera de África de las poblaciones humanas modernas. Estos hallazgos confirman un escenario de cambio de hospedero homínido, estimado previamente para VPH 16, y que muestra que la antigua co-divergencia homínido-hospedero y los recientes eventos de cambio de hospedero, dieron forma a la radiación que observamos en el árbol filogenético de las variantes de VPH existentes (24). La mayoría de las variantes del VPH que actualmente predominan en las poblaciones euroasiáticas, podrían ser descendientes de la transmisión viral de los neandertales/denisovanos a las poblaciones humanas modernas, a través del entrecruzamiento y el flujo de genes (68, 70).

Este escenario también puede confirmarse, en parte, por las prevalencias muy bajas de ciertas variantes del linaje A del VPH 58 (particularmente los sublinajes A1 y A3) en las poblaciones africanas actuales, lo que indica claramente que estas variantes eran de origen neandertal. La transmisión viral de los humanos modernos a los neandertales/denisovanos fue posible, en base a la evidencia del flujo de genes antiguos de los primeros humanos modernos a los neandertales orientales. Ciertos genes y codones específicos en las variantes de VPH 58, las cuales tienen un mayor potencial carcinogénico y/o que están bajo selección positiva, pudieran tener



implicaciones importantes para la especificidad del hospedero que infectan, la patogénesis y la prevención de enfermedades asociadas a este genotipo (68, 70).

## **II.8. Transformación e integración viral del VPH oncogénico**

Cuando ocurre una transformación celular causada por los VPH-AR, la célula es incapaz de reparar los errores durante la replicación del ADN, mediante el bloqueo de proteínas del ciclo celular (71, 72).

De los tipos de VPH-AR que son principalmente asociados al CaCU, el 16 y el 18 se encuentran presentes en un gran número de lesiones neoplásicas avanzadas. La integración viral ocurre con mayor frecuencia en la región E1 o E2, que termina con su delección o silenciamiento, lo cual conduce a una sobreexpresión de los oncogenes virales E6 y E7 (73, 74). Así mismo, los transcritos resultantes del virus integrado, son más estables que los pertenecientes al ADN viral episomal, y tienden a sobre expresarse (74).

Los oncogenes virales E6 y E7, que forman parte del genoma del VPH, son considerados responsables de la transformación de la célula epitelial infectada, así como del mantenimiento del fenotipo maligno. Estas proteínas virales pueden afectar muchas proteínas celulares, tales como la proteína del Retinoblastoma (pRb), la proteína 53 (p53), y otras proteínas supresoras de tumores. Estas afectaciones conducen a la extensión de la duración de la vida celular (incluyendo la resistencia a la apoptosis), la síntesis de ADN, la inestabilidad genómica, y la interferencia con respuestas antivirales y respuestas inmunes antitumorales (75).

Cuando la infección es transitoria, el VPH se encuentra de forma episómica en el núcleo, sin integrarse al ADN del hospedero. Para integrarse necesita de las proteínas virales E6 y E7, las cuales inician la degradación de las proteínas, productos de los genes supresores tumorales, p53 y la pRb. La supresión de la p53 induce a la célula a perder su capacidad de monitoreo del estado del ADN de la célula, inhibiendo además la apoptosis. Por otro lado, al suprimir la acción de la pRb, la célula se divide permanentemente (71-75).

La suma de estas dos acciones, resultan en la inmortalización de la célula infectada y acumulación de defectos en su material genético. Esta desregulación de control del ciclo celular, favorece la transformación de la célula, lo cual genera la progresión al cáncer cervical. De igual manera, el ADN se duplica con los mecanismos de división celular de la célula infectada, lo que favorece la replicación viral y la producción de viriones maduros en las capas o estratos más

superficiales del epitelio; todo esto, conlleva a la acumulación de células infectadas con errores genéticos que pueden sufrir transformación maligna en algún momento (71-75).

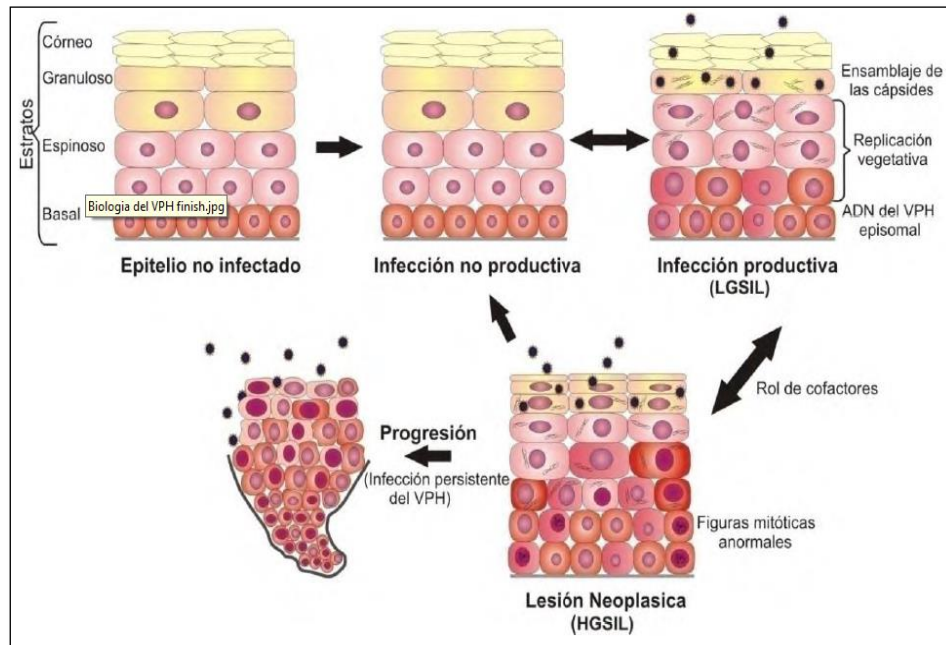
Según Ziegert y cols., la integración de secuencias genómicas del VPH en el ADN de la célula del hospedero, no es un requisito necesario para la inducción de la transformación celular, ya que esta se puede dar por mecanismos distintos a la expresión de E6 y E7, como por ejemplo la elevada carga viral, que puede ser suficiente para una transformación neoplásica (76).

## **II.9. Ciclo biológico del VPH**

El ciclo biológico del VPH está relacionado con el proceso de diferenciación celular de la piel o las mucosas, cuyo objetivo es infectar al epitelio estratificado buscando llegar a las células basales. La forma en que penetran los viriones es a través de áreas dañadas del epitelio, provocadas en su mayoría por abrasiones menores, las cuales pueden suscitarse durante las relaciones sexuales (56).

A través de un receptor de membrana, la molécula  $\alpha 6$ -Integrina, el VPH se une a su célula blanco. El VPH inicia su ciclo infectando a las células de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. Una vez que penetra a las células por endocitosis, se produce un proceso de desnudamiento y el ADN se dirige al núcleo donde se mantiene de forma episomal. El DNA viral permanece en ese estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular (49, 56, 77).

El proceso de replicación queda limitado al ciclo celular, debido a que el VPH no codifica para proteínas con actividad ADN polimerasa, por lo que usa la maquinaria de la célula. Para poder hacerlo, los genes tempranos del virus provocan una mayor replicación celular, lo que favorece la replicación del virus. En un inicio, la proteína E2 es la que controla la replicación viral pero, cuando las células han avanzado a la superficie del epitelio, estas maduran, proceso durante el cual las proteínas E6 y E7 actúan en el ciclo celular posibilitando el ensamblaje de los viriones y la replicación viral (Figura 5). Las células basales se diferencian en queratinocitos y dejan de replicarse, y cuando alcanzan las capas superficiales, se posibilita la expresión de los genes tardíos y se produce el ensamblaje de las partículas del virus y su posterior liberación (49, 56, 77).



**Figura 5.** Biología de la infección por VPH. Tomado de Barbisan, G. (2015). **Fuente:** (78).

## II.10. Epidemiología

### II.10.1. Epidemiología del cáncer cervicouterino. Distribución mundial y en el Ecuador

El CaCU es la cuarta forma de cáncer más frecuente en las mujeres y una de las principales causas de fallecimiento por cáncer a nivel global (segundo en el grupo de mujeres entre 15 a 44 años), con un estimado de 528 000 nuevos casos y 266 000 defunciones por año (6).

Más del 84 % de los casos son diagnosticados en países en vías de desarrollo, siendo en estos países la segunda causa de cáncer, solo después del cáncer de mama. Asia acumula la vasta mayoría de casos (285 000) y muertes (144 000), seguido de África (99 000 casos y 60 000 muertes) y las Américas (83 000 nuevos casos y 36 000 muertes) (Tabla 3) (4, 79).

En la mayoría de las poblaciones europeas y norteamericanas, las tasas de incidencias de CaCU comienzan a incrementarse entre los 20 y 24 años de edad, por lo tanto, el riesgo se incrementa alcanzando un pico usualmente alrededor de los 35 y 39 años. El CaCU es diagnosticado más frecuentemente a las edades entre 35 y 64 años (66% de los casos), con una edad media de 49 años. Generalmente tiene un buen pronóstico cuando se detecta en su estadio inicial (estadio I), lo cual ocurre en la mayor parte de las mujeres (96 %). En estos casos la sobrevida es mucho mayor, en comparación a la esperanza de vida relativa de 5 años, para aquellas que son diagnosticadas en el estadio IV (5 %) (80, 81).

**Tabla 3.** Estadísticas mundiales del cáncer cervicouterino y la infección por VPH.

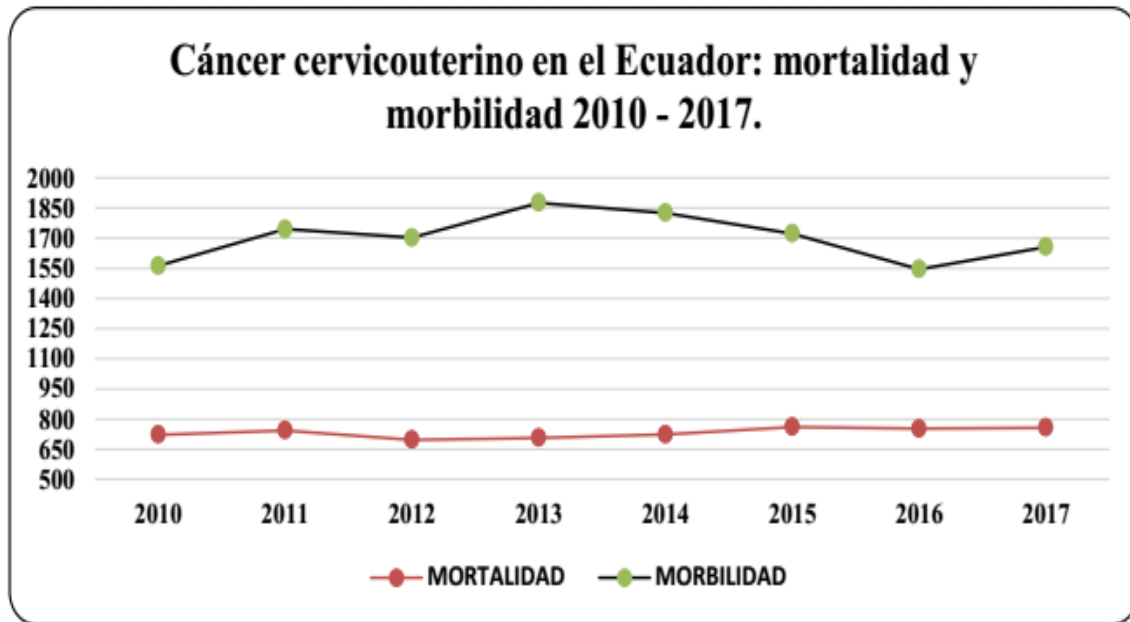
<i>Población</i>	<i>Mundo</i>	<i>Países en vías de desarrollo</i>	<i>Países desarrollados</i>
Mujeres en riesgo para desarrollar cáncer cervical (Población femenina con una edad mayor o igual a 15 años) en millones.	2 716 830	2 174 580	542 250
<b><i>Carga del cáncer cervicouterino</i></b>			
Número anual de nuevos casos de cáncer cervicouterino.	527 624	444 546	83 078
Tasas de incidencias de cáncer cervical estandarizadas por 100 000 habitantes.	14,0	15,7	9,9
Número anual de fallecimientos por cáncer cervicouterino.	262 672	230 158	35 514
Tasas de mortalidad de cáncer cervical estandarizadas por 100 000 habitantes.	6,8	8,3	3,3
<b><i>Carga de la infección cervicouterina por VPH</i></b>			
Prevalencia (%) de VPH 16 y/o VPH 18 entre mujeres con:			
Citología normal	3,9	3,8	3,8
Lesiones cervicales de bajo grado (LSIL - NIC 1)	25,5	24,5	25,9
Lesiones cervicales de alto grado (HSIL - NIC 2/NIC 3)	51,5	46,1	53,6
Cáncer cervicouterino	70,0	71,9	71,5

**Fuente:** Adaptado de Bruni y cols., 2021. Reporte del Virus del Papiloma Humano y Enfermedades Relacionadas del Instituto Catalán de Oncología (4).

En Latinoamérica, el CaCU tiene un enorme peso para los sistemas de salud de la región, en países como Honduras, Nicaragua, El Salvador, Bolivia, Paraguay y Ecuador, donde representa la principal causa de muerte por cáncer. Aunque, en los últimos veinte años se observa en la región, una reducción en la mortalidad femenina por dicha causa, esta tendencia no está proporcionalmente distribuida, mientras que en algunos países hubo una reducción, en otros la tasa de mortalidad, por el contrario, ha aumentado (6, 81, 82).

Tomando los datos de los estudios de GLOBOCAN para Ecuador, en el año 2020, murieron 813 mujeres por CaCU y se diagnosticaron 1 534 nuevos casos de este mismo cáncer (12, 83).

Por otro lado, considerando las cifras publicadas por el Instituto Nacional de estadísticas y Censo del Ecuador (INEC), en su página web (84), las cuales están basadas en los registros de casos de tumores en la red nacional de hospitales oncológicos de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA), desde el año 2010 hasta el 2017, se evidencia un mantenimiento de la mortalidad con una tendencia al crecimiento lineal positivo (Figura 6).



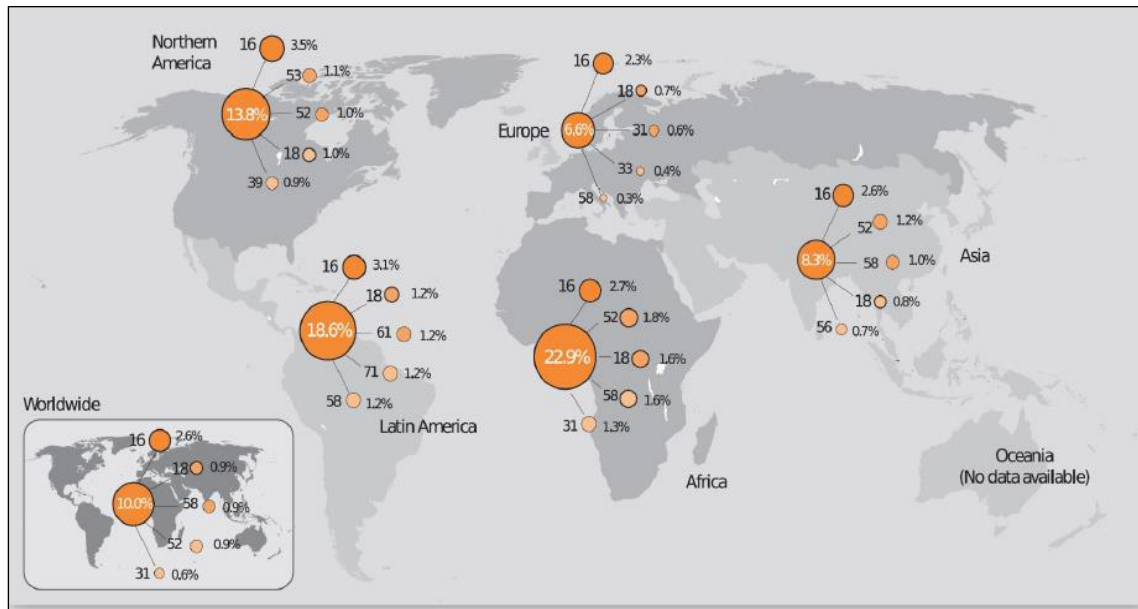
**Figura 6.** Evolución de la mortalidad y morbilidad del cáncer cervicouterino 2010-2017. **Fuente:** Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador (84).

Se considera al VPH como el principal agente etiológico del CaCU. No obstante, existen otros factores, que en conjunto con la presencia del virus pueden aumentar el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Entre los principales factores descritos se encuentran aquellos derivados del hospedero y los relacionados con el virus (85, 86).

Dentro de los factores dependientes del hospedero se deben tener en cuenta la edad de inicio de las relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales, la historia de una enfermedad de transmisión sexual, factores genéticos, hábitos tóxicos como el tabaquismo, enfermedades asociadas que afecten la respuesta inmunitaria del hospedero, el bajo nivel socioeconómico, la multiparidad, la utilización de anticonceptivos hormonales, co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otras infecciones de transmisión sexual (ITS) (85-87). En relación con las características del virus son importantes la carga e integración viral, el genotipo, las variantes y la infección por múltiples tipos y variantes (88-90).

### **II.10.2. Epidemiología molecular de VPH por regiones geográficas**

La distribución mundial de los VPH de alto riesgo varía, aunque el VPH 16 el más común en todo el mundo (Figura 7).



**Figura 7.** Prevalencia de los genotipos de alto riesgo oncogénico en varias regiones del mundo. Tomado de Sanjose S y cols. Fuente: (91, 92).

La prevalencia de VPH 16 y 18 en los casos de CaCU representa más del 70 % del total de muestras positivas al VPH en el mundo, siendo el VPH 16 el más prevalente (4). Los genotipos más frecuentes como el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58, están asociados al 90 % de los casos de carcinomas cervicales y entre un 65 % y 76 % de los casos con lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL, *high grade squamous intraepithelial lesions*, por sus siglas en inglés) (93).

La distribución de los genotipos presenta variaciones que pueden estar determinadas por factores étnico-geográficos (68, 94). Es conocido que la prevalencia de VPH 16 y 18 en el carcinoma de cuello uterino en Europa y Norteamérica es semejante (74 % y 76 %, respectivamente). Por otro lado, las prevalencias en Centro y Sudamérica son muy similares a las de Asia (65 % y 67 %, respectivamente), mientras que África posee una distribución intermedia (70%) (4, 92, 95).

Los genotipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 y 59 se encuentran con mayor frecuencia en África y Latinoamérica. En Indonesia y Argelia el más común es el VPH 18. Los VPH 33, 39 y 59 se dan con mayor frecuencia en Centro América y el VPH 45 en África Occidental (91, 92).

### II.10.3. Epidemiología molecular de las variantes genéticas del VPH

Los estudios más extensos realizados acerca de la variabilidad intratípica del VPH se han dirigido fundamentalmente para VPH 16, también para VPH 18 y VPH 45, VPH 6 y 11, VPH 5 y 8, y

más recientemente, VPH 31, 33, 35, 52, 53, 56, 58 y 66. La heterogeneidad intratípica de secuencias se usa como una importante herramienta para dilucidar el origen y dispersión de los VPH en las poblaciones humanas. El análisis del gen LCR de muestras positivas para VPH 16 recolectadas alrededor del mundo sugiere no solamente una co-evolución hospedador-virus, sino que también la existencia de cinco linajes. La prevalencia de las variantes de cada rama en diferentes áreas geográficas varía significativamente y se correlaciona con el nivel de mezcla de cada población (91, 92).

Estudios conducidos en Brasil y Estados Unidos muestran una asociación entre variantes no europeas de VPH 16 con un riesgo incrementado de lesiones intraepiteliales cervicales comparado con las variantes europeas. El análisis de la variabilidad intratípica del VPH en los cánceres positivos a VPH 16, sugiere además una asociación específica entre variantes específicas y características histopatológicas de lesiones neoplásicas cervicouterinas. La evidencia indica que las variantes no europeas comparadas con los aislados europeos, poseen un riesgo que se incrementa de dos a cuatro veces más para el desarrollo de neoplasias en general, y en especial para las HSIL. Hay una fuerte evidencia de que las variantes no europeas de VPH 16 tienen riesgos elevados para producir cáncer, principalmente las del linaje D. Los estudios realizados indican que el linaje D del VPH 16 está desproporcionadamente asociado con adenocarcinoma (96).

El polimorfismo común dentro del linaje europeo es el T350G, denominada E350G del VPH 16 o VPH 16 EUR350G y, se localiza en el oncogén E6. Consiste en que el nucleótido de la posición 350, que es timina es sustituido o cambiado por una guanina. Esto conduce al cambio de un aminoácido de leucina a valina (L83V). Se sugiere que este polimorfismo influye en la persistencia y el riesgo de progresión a lesiones cervicales precancerosas (97, 98). La persistencia de las variantes no europeas de VPH 16, es dos veces mayor que el de las variantes europeas. Sin embargo, este efecto biológico puede ser modificado por el historial genético del hospedero. En las poblaciones europeas, donde predominan los aislados de VPH 16 del linaje A, el cual está fuertemente asociado a carcinoma de células escamosas; la variación del VPH 16 EUR-350T vs -350G representa un riesgo de persistencia dos veces mayor. Por otro lado, las variantes asiáticas-americanas de VPH 16 estimulan la degradación de p53 y también aumentan la actividad del promotor p97 (99).

El VPH 18 es el segundo genotipo más común asociado con el CaCU, pero es mucho menos prevalente que el VPH 16 en la población, lo cual ha limitado su estudio. Existe información contradictoria sobre si los aislados europeos del linaje A o las variantes africanas (B/C) están asociados con el fenómeno de la persistencia. Estos análisis pueden ser aún más confusos por el historial genético del hospedero. Existe muy poca evidencia acerca del papel del VPH 18 en el desarrollo de lesiones precursoras de CaCU porque en parte, las lesiones asociadas al VPH 18 no se detectan de manera regular. No hay evidencia convincente de que las diferentes variantes de VPH 18, estén asociadas con un riesgo mayor de cáncer. Aunque algunos estudios sugieren que entre los sublinajes europeos, A1/A2 son cuatro veces más comunes en adenocarcinomas que A3/A4 (100, 101).

Evidencias recientes muestran que el linaje C del VPH 31 es más persistente que los linajes A o B. Por otro lado, parece que los linajes A/B del VPH 31 están comúnmente asociados con el desarrollo de HSIL (102).

La heterogeneidad del VPH 58 dificulta el estudio acerca del potencial oncogénico de sus variantes. Estudios realizados en Taiwán, demuestran la influencia de los sublinajes A1 y A3 en el desarrollo de HSIL (103). No obstante, se muestra que los otros linajes: B/C/D, poseen un papel más importante que el linaje A, en el desarrollo de lesiones HSIL. Sin embargo, en un estudio del 2016, la mutación de gen E7 del VPH 58, T20I/G63S, perteneciente al sublinaje A3, fue más frecuente en el este de Asia y mostró un riesgo para el cáncer cervical, entre siete y nueve veces más alto que los otros linajes (104).

#### **II.10.4. Epidemiología molecular del VPH en el Ecuador**

Debido a la desinformación acerca del VPH dentro de la población ecuatoriana y a la escasa evidencia disponible, pocos estudios se han enfocado en la epidemiología molecular del VPH en Ecuador, a pesar de que el CaCU es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (83). En un estudio piloto del 2008, con 71 casos de mujeres ecuatorianas con lesiones cervicales, se evidenció que el 43,7 % de la población resultó positiva para VPH. Se reportaron, además, frecuencias de infección por VPH de 37,5 %, 44,8 % y 60 %, en pacientes con cervicitis crónica, NIC 1 (LSIL) y NIC 2-3 (HSIL), respectivamente. Los tipos de VPH más frecuentes fueron el 16 (64,5 %) y el 81 (29 %) seguidos por el 31, 53, 56 y 58 (105).



En el 2009, una investigación en la provincia de Santa Elena (106) evidenció una alta circulación del VPH en mujeres (24,2 %), detectándose de manera más frecuente los tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) (16, 52, 58, 59) y bajo riesgo (VPH-BR) (62, 71, 72 y 83). En ese año, González y Sánchez analizaron 127 mujeres mestizas de la ciudad de Quito, encontrando una prevalencia de infección por VPH (67 %). Los genotipos de alto riesgo más frecuentes fueron el VPH 16 y 31 (107).

Una investigación realizada en el 2016 realizada por Mejía y cols., en mujeres de Quito, identificó como genotipos más prevalentes en las lesiones cervicales al VPH 16 (42 %) seguido del VPH 58 (31 %). Cabe señalar, que el VPH 18 se encontró solamente en el 2,4 % (108). Sin embargo, estudios realizados en la región sur del Ecuador entre el 2014 y 2017 por diferentes investigadores, si bien presentan un perfil de genotipos similar al trabajo anterior, el VPH 18 aparece con una frecuencia relativamente más alta, en especial en las muestras con lesiones cervicales precancerosas y cancerosas (25, 109).

### **II.11. Enfermedades asociadas a la infección por el VPH**

Los VPH se dividen en tres grupos principales, de acuerdo a sus características clínicas: cutáneos, muco-cutáneos y aquellos asociados con el desorden recesivo autosomal raro, Epidermodisplasia Verruciforme (EV). Los VPH cutáneos pertenecen al género *Beta*, con pocos miembros en los géneros, *Gamma*, *Mu* y *Nu*; mientras que el género *Alpha* contiene a todos los VPH mucosos y algunos del tipo cutáneo.

También, pueden ser agrupados de acuerdo con las zonas anatómicas donde son encontrados: piel externa, mucosas anogenitales y orales, (Tabla 4).

Mientras ciertos tipos de VPH se asocian con características morfológicas particulares, la asociación no es absoluta y la infección por VPH puede ser productiva, subclínica o latente, tanto en piel como en mucosas. Las lesiones productivas como las verrugas pueden ser vistas clínicamente, mientras que las infecciones subclínicas de las mucosas necesitan herramientas adicionales tales como el examen microscópico con la ayuda del ácido acético aplicado tópicamente (110).

**Tabla 4.** Enfermedades provocadas por diferentes tipos de VPH en humanos.

Localización	Enfermedad característica	Tipo de VPH	
		Bajo riesgo	Alto Riesgo
Cutánea	Verrugas vulgares	1, 2, 4, 7, 26, 27, 29, 57	
	Verrugas planas	3, 10, 28, 41	
	Verrugas plantares	1, 4, 57, 60, 63, 65	66
	Epidermodisplasia Verruciforme	9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 46, 47, 49, 50	5, 8
Genital	Condiloma acuminado	6, 11, 30, 32, 40, 41, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 70, 72, 81	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 59
	LSIL	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
	HSIL Carcinomas escamosos invasivos Adenocarcinoma Carcinomas Adenoescamosos		16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Cabeza y Cuello	Papiloma laríngeo	6, 11, 32	
	Papilomas orales	13, 16, 32, 57	
	Carcinomas escamosos invasivos (cavidad oral, orofaringe, laringe)	6, 11	16, 18, 31, 33, 35, 51

**Fuente:** Adaptado de Medicina Interna de Farreras (111).

Los VPH latentes son detectables solamente a través de la demostración del ADN del VPH en piel y mucosas clínicamente sanas. Las infecciones productivas están asociadas con la expresión total de genes virales y la producción de partículas virales maduras, mientras que, en infecciones persistentes, se suspenden las funciones celulares normales y se anulan los eventos tardíos del ciclo de vida de los virus. Aproximadamente el 70 % de las infecciones por VPH se resuelven de forma espontánea en un año y el 90 % en dos años, mientras que la persistencia por VPH se desarrolla en el resto de los casos. Las lesiones de alto grado y el CaCU aparecen en un periodo de cinco años, como promedio (112, 113).

## II.12. Manifestaciones clínicas e histológicas de las infecciones cervicales por el VPH.

### Diagnóstico citológico e histológico de las lesiones cervicales

La mayor parte de las infecciones con VPH en mujeres jóvenes son transitorias y tienen poca importancia a largo plazo. El 70 % de las infecciones desaparecen en un año y el 90 % en dos años (112, 113).

Los VPH de bajo riesgo causan generalmente verrugas genitales y lesiones cervicales de bajo grado. En el caso de los VPH de alto riesgo, cuando la infección persiste, entre el 5 % y el 10 % de las mujeres infectadas, existe el riesgo de desarrollar lesiones precancerosas en el cuello uterino, que pueden progresar a CaCU. Este proceso normalmente lleva entre 15 y 20 años, dando muchas oportunidades a la detección y el tratamiento de las lesiones precancerosas, a menudo con altas tasas de curación (48). El CaCU se origina fundamentalmente en la zona de transición o transformación celular del cuello uterino. Las células normales se transforman gradualmente, pasando por diferentes estadios hasta convertirse en células neoplásicas (114).

El sistema de Bethesda posibilita normalizar los resultados de los estudios histopatológicos de frotis cervicales. Este sistema fue creado en 1988; en virtud de los avances en las técnicas de tamizaje y la masiva utilización de las vacunas contra VPH, y ha sido objeto de varias actualizaciones, la última se realizó una actualización en el año 2014 (115, 116) (Figura 8). Este sistema permite interpretar las anomalías en las células epiteliales, clasificándolas en dos grandes grupos: de células escamosas y de células glandulares (115). Las de células escamosas son de dos tipos: Atípicas, que a su vez se dividen en cuatro categorías en orden creciente del grado de displasia y Carcinoma de células escamosas. La división en la terminología para el reporte de la atipia está relacionada con la historia natural y la evolución de la infección por VPH. En este sentido se pueden producir cambios de bajo grado por infecciones transitorias o lesiones de alto grado por infecciones persistentes de larga evolución. Las de células glandulares, que se dividen en atipias, adenocarcinomas de diverso grado y otros tipos de cáncer.

Con respecto a la histología, existe una clasificación histológica, publicada en el año 1995, conocida como Sistema de Richart (117) y que es todavía el método utilizado para el diagnóstico histológico de las lesiones cervicales. Mediante este sistema, las lesiones cervicales se clasifican en: no útil, negativo para células neoplásicas, infección con VPH, neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (NIC 1), neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 (NIC 2), neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 (NIC 3), carcinoma *in situ*, carcinoma invasor, célula neoplásica de otro origen e infecciones por gérmenes específicos u otras observaciones. En este caso la clasificación de NIC 1 incluye los casos con displasia leve, la NIC 2 incluye casos con displasia moderada y la NIC 3 incluye aquellos casos con displasia severa o carcinoma *in situ*. Este sistema de clasificación histológica se actualizó durante los últimos años, para homogenizar criterios con el sistema de clasificación citológica de Bethesda (117).

<p><b>INTERPRETACIÓN/RESULTADO</b></p> <p>Negativa para Lesión Intraepitelial o Malignidad</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No existe evidencia celular de neoplasia.</li> </ul> <p>Hallazgos no neoplásicos (opcional):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Variaciones celulares no neoplásicas: metaplasia escamosa, cambios queratóticos, metaplasia tubal, atrofia y cambios asociados al embarazo</li> <li>• Cambios celulares reactivos asociados a: inflamación (incluida reparación típica), cervicitis folicular, radiación, dispositivo intrauterino.</li> <li>• Células glandulares en mujeres con histerectomía.</li> </ul> <p>Organismos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Trichomonas vaginalis</i></li> <li>• Elementos micóticos morfológicamente compatibles con <i>Candida</i>.</li> <li>• Cambios de la flora vaginal sugestivos de vaginosis bacteriana.</li> <li>• Bacterias de características morfológicamente compatibles con <i>Actinomyces</i>.</li> <li>• Cambios celulares compatibles con herpes simple.</li> <li>• Cambios celulares compatibles con citomegalovirus.</li> </ul> <p>Anormalidad en células epiteliales</p> <p>Células escamosas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células escamosas atípicas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células escamosas con atipias de significado indeterminado (ASC-US).</li> <li>• Células escamosas con atipias que no excluyen una lesión de alto grado (ASC-H).</li> <li>• Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL): VPH / NIC 1 / displasia leve.</li> <li>• Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL): NIC 2-3 / CIS / displasia moderada y severa.</li> </ul> </li> <li>• Carcinoma de células escamosas.</li> </ul> <p>Células glandulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células glandulares atípicas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endocervicales, endometriales, glandulares (cuando no se puede precisar origen).</li> </ul> </li> <li>• Células glandulares con atipias a favor neoplasia.</li> <li>• Adenocarcinoma endocervical in situ.</li> <li>• Adenocarcinoma <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endocervical, endometrial, extrauterino.</li> <li>• Sin especificar.</li> </ul> </li> <li>• Otras neoplasias malignas (especificar)</li> </ul> <p>Otro</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células endometriales en mujeres de 45 años de edad o más (especificar si es negativa para lesión intraepitelial escamosa).</li> </ul>
--

**Figura 8.** Sistema Bethesda. Adaptado de la actualización en el reporte de citología cérvicovaginal basado en el Sistema Bethesda 2014, tomado de Nayar y Wilbur. **Fuente** (115).

### II.13. Respuesta inmune a la infección por VPH

Debido a su ciclo de vida y tropismo estricto, el VPH debe superar barreras físicas significativas para entrar en los queratinocitos basales. Primero necesita penetrar a través de la piel y mucosas, lo cual puede ser facilitado por el daño tisular. Para que la infección por VPH se establezca, el virus debe entrar a través de rupturas que se producen en la membrana nuclear, durante la prometafase. En el interior de la célula hospedera, el ADN viral puede ser reconocido por sensores innatos de patógenos, los cuales pueden inducir el proceso de inflamación y un bloqueo de la

replicación y transcripción del VPH mediada por la proteína Gamma-interferón-inducible (IFI-16). Otro de los efectos inducidos por los sensores, es la producción de interferón alfa (IFN $\alpha$ ) y beta (IFN $\beta$ ), los cuales promueven la destrucción de los episomas de VPH latentes en las células infectadas persistentemente. En el proceso de la respuesta inmunitaria contra la infección por VPH también se involucran células del sistema inmune como las células dendríticas, de Langerhans, linfocitos T asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos (118).

A pesar de los mecanismos inmunitarios descritos, que se activan para frenar la infección, el VPH logra interactuar con el sistema inmune del hospedero para evadirlo. Entre los mecanismos que posee para lograrlo, está el hecho de que es un virus no citolítico y, por ende, no genera una respuesta inmune generalizada. Entre sus estrategias de evasión se incluyen la inducción de una mínima respuesta inflamatoria en el lugar primario de la infección, una reducción de señalización inmunológica y de los mecanismos antivirales. La falta de inducción de una respuesta inflamatoria mayor es una consecuencia del ciclo de vida natural del virus que ocurre en las células epiteliales en diferenciación, las cuales están programadas para una muerte natural o apoptosis (119).

La infección persistente por VPH oncogénico es la evidencia de que los VPH emplean mecanismos intrínsecos para evadir o reducir la vigilancia inmunológica del hospedero, lo que puede aumentar la susceptibilidad hacia la persistencia viral cuando los individuos infectados están expuestos a factores de riesgo adicionales. Dentro de estos factores se describen mecanismos biológicos de interacciones específicas entre determinantes del antígeno leucocitario humano (HLA, del inglés, *human leucocyte antigen*) del hospedero, y antígenos virales que pueden proteger o incrementar el riesgo de desarrollar cáncer asociado a la infección por VPH oncogénico. Sin embargo, los VPH de alto riesgo oncogénico también pueden evadir la detección del sistema inmune a través de la baja expresión de proteínas virales, minimizando así la presentación al sistema inmunitario del hospedero, en la fase temprana de la infección. En la fase tardía de la infección, los VPH aumentan la expresión de proteínas altamente inmunogénicas, sin embargo, estas proteínas se desprenden rápidamente de la capa externa del epitelio, que tiene una baja densidad de células presentadoras de antígenos. Estas se conocen como estrategias de evasión inmune pasiva. Además, los VPH utilizan estrategias agresivas de evasión inmunitaria, determinada por la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR. Estas oncoproteínas muestran una alta afinidad de unión a proteínas celulares que regulan la respuesta inmune, de esta

forma pueden bloquear la expresión de genes del sistema inmune, como interleucinas e IFN en las vías de señalización de queratinocitos infectados. El deterioro de las respuestas inmunitarias en las células infectadas afecta su capacidad para alertar a las células inmunitarias regionales, lo que resulta en un ambiente inmunosupresor que promueve el desarrollo del cáncer (120, 121).

Los mecanismos de evasión de respuesta inmune del hospedero del VPH pueden enumerarse de la siguiente manera: baja expresión de genes virales, principalmente L1 y L2; formación de viriones en las capas externas del epitelio donde las células inmunes tienen acceso limitado; modulación de la expresión de quimiocinas (CXCL14, IFN), moléculas de adhesión (E-cadherina) y receptores tipo Toll (TLR9); regulación negativa de los factores de respuesta a IFN de los queratinocitos; regulación negativa de las vías de señalización intracelular cGAS-STING, TLR y NF- $\kappa$ B; alteración del procesamiento de antígenos mediante el bloque de la maquinaria de procesamiento de antígeno (APM) para impedir el reconocimiento de antígenos por las células T; reducción de la expresión de las subunidades del inmunoproteosoma PSMB8 y PSMB9 y represión de las proteínas de los transportadores asociados con el procesamiento de antígeno TAP 1 y TAP 2 (120, 121).

#### **II.14. Vacunación contra VPH como método de prevención del CaCU**

El desarrollo de las vacunas profilácticas para VPH se centra en la proteína estructural de la envoltura externa del virus, proteína L1, obtenida mediante técnicas de ingeniería genética. Esta proteína se autoensambla cuando se expresa en cultivos de células eucariotas y forma VLPs, que constituyen antígenos potentes cuando se inoculan por vía parenteral o intradérmica; y son capaces de inducir una respuesta inmunitaria duradera, con títulos elevados de anticuerpos neutralizantes, que permite prevenir la infección por VPH. Estas VLPs, al no contener genoma viral, no pueden causar infección ni tienen potencialidad para causar lesiones neoplásicas (122, 123). Actualmente, existen tres vacunas profilácticas frente al VPH registradas por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) y autorizadas a través del procedimiento centralizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA): la vacuna bivalente Cervarix<sup>®</sup>, la vacuna tetravalente Gardasil<sup>®</sup> y la vacuna nonavalente Gardasil9<sup>®</sup> (122).

### II.14.1. Tipos de vacunas, composición y presentación

Las tres vacunas disponibles contra VPH son inactivadas, que contienen proteínas estructurales L1 (VLPs) de al menos dos genotipos, fueron obtenidas por técnicas de recombinación genética y no son infecciosas (122).

Cervarix<sup>®</sup>, comercializada por la compañía GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica, con ficha técnica revisada en abril de 2017, contiene VLPs de los genotipos de alto riesgo VPH 16 y VPH 18. Se produce por recombinación genética mediante la utilización de un sistema de expresión en Baculovirus. Está adyuvada con AS04, sistema adyuvante que contiene hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A. Esta vacuna está indicada en mujeres a partir de los 9 años de edad, para la prevención de lesiones genitales premalignas (cervicales, vulvares y vaginales) y cáncer de cérvix causados por VPH 16 y 18. También se indica en hombres y mujeres, a partir de los nueve años, para prevenir lesiones anales preneoplásicas y cáncer anal relacionados dichos genotipos de VPH (122).

Gardasil<sup>®</sup>, producida por Merck y Co, Inc., Whitehouse Station, New Jersey, EEUU con ficha técnica revisada en junio de 2017, contiene VLPs de los genotipos de alto riesgo oncogénico VPH 16 y VPH 18 y de los de bajo riesgo oncogénico VPH 6 y VPH 11. Se produce por recombinación genética mediante la utilización de un sistema de expresión que utiliza células derivadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Está adyuvada con hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo. La indicación de esta vacuna es similar a la Cervarix<sup>®</sup>, incluyendo la prevención de verrugas anogenitales externas relacionadas con VPH 6 y 11 (122).

Gardasil9<sup>®</sup>, producida por Merck y Co, Inc., Whitehouse Station, New Jersey, EEUU con ficha técnica revisada en enero de 2018, contiene VLPs de los genotipos de alto riesgo oncogénico VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 33, VPH 45, VPH 52, VPH 58 y de los de bajo riesgo oncogénico VPH 6 y VPH 11. Se produce por recombinación genética mediante la utilización de un sistema de expresión que utiliza células derivadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Está adyuvada con hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo y se indica para hombres y mujeres a partir de los 9 años. Previene lesiones precancerosas y cánceres que afectan al cuello uterino, vulva, vagina y ano causados por los tipos del VPH-AR y para la prevención de verrugas genitales o condilomas acuminados causados por los genotipos de VPH-BR incluidos en la vacuna (14, 122, 124).

## II.14.2. Inmunogenicidad, eficacia y efectividad

### Inmunogenicidad

Todos los preparados vacunales han mostrado en los estudios una elevada inmunogenicidad, con tasas de seroconversión próximas al 100 % para las tres vacunas (125).

La vacuna Cervarix® presenta tasas de seroconversión del 100 % tras la vacunación con tres dosis, en mujeres de 15 a 25 años, con tasas de seropositividad superiores al 98 % y títulos 11 veces superiores a los generadas por la infección natural para ambos genotipos de VPH (125).

La vacuna Gardasil® presenta tasas de seroconversión del 99-100 % tras la vacunación con tres dosis, para los tipos incluidos en la vacuna, y las tasas de seropositividad son superiores al 98 % para el VPH 16 y del 65 % para el VPH 18 a los 10 años post vacunación, en mujeres de 16 a 23 años (125, 126).

La vacuna Gardasil9® ha demostrado la capacidad de inmunizar frente a los nueve genotipos de VPH incluidos en el preparado vacunal VPH (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58), que causan aproximadamente el 90% de los cánceres de cérvix, más del 95 % de los adenocarcinomas *in situ*, y entre el 75 y 85 % de las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (127).

### Eficacia clínica

Para las vacunas Cervarix® y Gardasil®, en los ensayos clínicos, con seguimiento clínico de las mujeres mayores de 16 años, durante un mínimo de ocho años, se corrobora una eficacia superior al 95% para la prevención de las lesiones precancerosas de bajo, alto grado y adenocarcinomas *in situ* causados por los VPH oncogénicos 16 y 18. Se observó un grado de protección cruzada sobre otros tipos de VPH no incluidos en ambas vacunas (VPH 31, 33 y 45) (125, 126).

Para la vacuna Gardasil9®, se evaluó la eficacia e inmunogenicidad en ocho ensayos clínicos. En todos los grupos analizados, del 98,2 al 100 % de los individuos que recibieron la vacuna fueron seropositivos para anticuerpos frente a los nueve genotipos de la vacuna hasta siete meses post vacunación. La eficacia de la vacuna Gardasil9® frente a lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado relacionadas con los genotipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 fue de 94,4 al 100 % (127).

Además, las vacunas Gardasil® y Gardasil9® han demostrado eficacia frente a verrugas genitales superior al 98 % en mujeres y al 90 % en hombres. También hay datos de protección superiores



al 95 % frente a otras lesiones precancerosas genitales, como es el caso de las lesiones intraepiteliales vaginales de alto grado (125, 126).

Con ambas vacunas, Gardasil® y Gardasil9®, se demuestran diferentes grados de protección cruzada para otros genotipos de VPH oncogénicos, no incluidos en ambas formulaciones, lo que permite obtener una eficacia protectora global frente a lesiones preneoplásicas por VPH superior a la esperada (125, 127).

### **Efectividad**

Las vacunas frente al VPH son vacunas profilácticas y, en principio, solo protegen frente a los VPH para los que la mujer no está infectada en el momento de la vacunación. Por ello, la mayor efectividad poblacional se obtendrá si todas las mujeres que se vacunan no están infectadas por VPH. La cobertura de la vacunación es esencial para obtener una efectividad elevada en la población, independientemente de la eficacia de la vacuna a nivel individual. Es muy importante extender la vacunación a todas las adolescentes y mujeres adultas, al menos, hasta la edad de 26 años (125, 127, 128).

### **II.14.3. Vacunación contra VPH en el Ecuador**

Como parte de la estrategia nacional de salud para la prevención del CaCU, el MSP en el Ecuador en el año 2015, incorporó la vacuna contra VPH al esquema ampliado de inmunizaciones, con el fin de reducir la incidencia y mortalidad por esta grave enfermedad. En la actualidad las vacunas disponibles a nivel del país son la bivalente Cervarix® y la tetravalente Gardasil®. Sin embargo, para promover su uso, el MPS del Ecuador aplica de manera gratuita la vacuna tetravalente, en dos dosis: la primera a los 9 años y la segunda seis meses después (máximo hasta los 10 años 6 meses 0 días), según los lineamientos oficiales. La vacuna se administra a la población femenina de 9, 10, 11 años, pero se puede extender hasta los 17 años en dos dosis, y así se encuentra incluida en el esquema básico de vacunación. Se aplica en consultorios médicos en hospitales públicos y en las escuelas privadas y públicas donde existen niñas y adolescentes entre estas edades (129).

Sin embargo, la cobertura nacional de vacunación es baja, pues según datos de la OMS, la cobertura de vacunación contra el VPH en Ecuador hasta el año 2020, fue del 75 % para la primera dosis y del 36 % para la segunda dosis. Esto se debe a que una gran parte de la

población ecuatoriana no se vacuna, fundamentalmente por tabúes morales y religiosos, ya que las madres consideran que la vacunación solo es importante para las jóvenes y niñas que ya han tenido relaciones sexuales e incluso que incita a sus hijas a iniciar dichas prácticas. Este comportamiento se evidencia en varios países subdesarrollados donde la población no tiene percepción de riesgo y donde las mujeres tienen falta de instrucción y de educación sobre su salud sexual y reproductiva (129).

## **II.15. Ensayos para la detección del VPH**

### **II.15.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de amplio espectro para detectar ADN de VPH**

A lo largo de los años se han empleado diferentes cebadores generales o consenso para la detección de un amplio espectro de tipos del VPH. Los cebadores más utilizados para este fin son los MY09/11, PGMY, GP5+/6+ y SPF10. Estos cebadores se hibridan al ORF L1 del VPH, en regiones conservadas o variables de este. Luego de haber desarrollado la PCR (conociendo la presencia del VPH) y si se desea saber el tipo específico del VPH presente en la muestra, se pueden utilizar diversos métodos como: análisis con enzimas de restricción (RFLP, del inglés, *restriction fragment length polymorphism*), hibridación reversa (RLB, del inglés, *reverse line blotting*) y secuenciación nucleotídica del ADN amplificado (130-133).

La secuenciación es el estándar de oro para la genotipificación del VPH, ya que proporciona información útil de la secuencia y de posibles mutaciones. Pero la secuenciación por el método de Sanger (134) tiene una gran desventaja ya que pueden existir infecciones múltiples del VPH en una muestra; esto conlleva a la generación de secuencias mezcladas de distintos tipos del VPH y su interpretación es extremadamente difícil (133).

#### **II.15.1.1. Cebadores MY**

El set de cebadores MY es uno de los sistemas de amplificación más frecuentemente utilizado para detectar el VPH en todo el mundo. Los cebadores MY (MY11, sentido positivo y MY09, sentido negativo) tienen como diana la región L1, generando un amplicón de 450 pb y son capaces de detectar más de 25 genotipos del VPH (VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 55, 56, 58, 59 y otros) (135).

#### **II.15.1.2. Hybrid Capture 2 (HC2; Digene-Qiagen)**

Este ensayo presenta alta sensibilidad para el diagnóstico del VPH en mujeres con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado 2 o superior, discriminando entre VPH-AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y VPH-BR (VPH 6, 11, 42, 43 y 44) (16,68), pero sin la capacidad de distinguir cada tipo individualmente. El ensayo es capaz de detectar ADN viral en muestras de pacientes por medio de la hibridación de sondas de ARN (complementaria a la secuencia de cada genotipo), con señal de quimioluminiscencia. El ADN viral se hibrida con la sonda en una solución, formando un híbrido ADN-ARN. Los híbridos son capturados por anticuerpos pegados a las paredes de una microplaca que puede reconocer específicamente híbridos ADN-ARN. Estos híbridos que han sido inmovilizados son detectados por reacciones que generan luminiscencias medibles por un luminómetro (136).

#### **II.15.1.3. Cervista® HPV (Hologic, Inc.)**

Es capaz de detectar 14 tipos del VPH-AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), sin tipificarlos individualmente. Presenta una sensibilidad del 100 % en la detección de NIC 3 y del 98 % para las NIC 2, comparándolo con HC2. Tiene una baja tasa de falsos-positivos y una alta especificidad y sensibilidad para detectar el VPH 16 y 18 (137).

#### **II.15.1.4. Cobas 4800 HPV (Roche Diagnostics)**

Es una técnica cuantitativa de PCR (qPCR), que permite la detección en grupo, de 12 tipos del VPH-AR, y simultáneamente la genotipificación individual de los VPH 16 y VPH 18. Ha sido validada clínicamente y aprobada por la FDA (*Food and Drugs American Agency*, por sus siglas en inglés) para el diagnóstico del VPH-AR (138).

#### **II.15.1.5. Abbott Real Time High Risk HPV (ART; Abbott Molecular)**

Este ensayo cuantitativo de PCR en Tiempo Real (PCR-TR) es capaz de detectar un grupo de 12 genotipos del VPH de AR (VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), y al mismo tiempo tipificar individualmente los VPH 16 y VPH 18. Esta técnica puede ser utilizada para la detección primaria y el seguimiento de casos con citologías anormales (139, 140).

## II.15.2. Ensayos para la genotipificación del VPH

En los últimos 20 años se han desarrollado variados sistemas de detección y tipificación de los diferentes genotipos de VPH (Tabla 5) (141).

Primeramente, fueron sistemas basados en PCR acoplada con hibridación reversa o combinada con el uso de enzimas de restricción. Posteriormente, se introdujeron en el mercado estuches diagnósticos comerciales basados en PCR-TR y otros que emplean hibridación asociada al uso de microarreglos de ADN (Tabla 5) (141).

**Tabla 5.** Estuches comerciales disponibles para la genotipificación de VPH.

<i>SISTEMAS COMERCIALES DE GENOTIPIFICACIÓN DE VPH</i>		
<i>Nombre del estuche comercial</i>	<i>Principio</i>	<i>Genotipos de VPH que identifica</i>
<i>INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics)</i>	PCR Hibridación reversa	VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 6, 11, 40, 43, 44, 54, 69, 70, 71, 74, 118,129,130
<i>PCR Human Papillomavirus Typing Set (Takara Bio Inc.)</i>	PCR RFLP	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 52b, 58, 6, 11
<i>IntelliPlex™ HPV DNA Genotyping</i>	PCR Hibridación	6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 73, 81 (CP8304), 82, 83, 131
<i>CLART® Human Papillomavirus 2 (Genómica, España)</i>	PCR Hibridación microarreglos	VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89
<i>Linear Array genotyping HPV (Roche Molecular Systems)</i>	PCR Hibridación	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP6108, 121,132,135,136
<i>PapilloCheck® (Greiner Bio One)</i>	PCR Hibridación DNA chip	VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82

**Fuente:** Adaptado de: Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. Manual para gerentes de programas de salud (141, 142).

### II.15.2.1. Anyplex™ II HPV28 detection (H28) (Seegene®, Corea del Sur)

Es un ensayo de PCR-TR capaz de detectar y genotipificar individualmente hasta 28 genotipos del VPH en dos reacciones. Este ensayo tiene el potencial de mejorar la genotipificación del VPH utilizando las tecnologías *Dual Priming Oligonucleotide (DPO™)*, *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension (TOCE™)* y el análisis semicuantitativo (Cyclic-CMTA). En el ensayo cada genotipo del VPH consta de una “etiqueta” o molécula distinta, que es capaz de hibridarse y alargar una secuencia marcada en particular. El estuche comercial posee varias etiquetas con sus

respectivas secuencias marcadas y cada una de ellas posee una temperatura de fusión distinta. Esta particularidad permite hacer la distinción y detección de varios genotipos del VPH por medio de análisis de la temperatura de fusión en un solo canal de lectura de fluorescencia. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) puede ser medida durante diferentes puntos o ciclos en la reacción de PCR (en los ciclos 25, 35 y 45), esto se conoce como análisis cíclico de la temperatura de fusión (Cyclic-CMTA). La cuantificación de las muestras de interés se determina por medio de los puntos cyclic-CMTA, basado en la concentración de un estándar conocido (143).

El sistema de tipificación Anyplex™ II HPV28 se ha evaluado extensamente y comparado con diversos estuches comerciales (144, 145). Los resultados demuestran que posee un nivel de especificidad y sensibilidad, igual o mayor que sistemas similares. Recientemente, algunos estudios en el Ecuador han basado sus evaluaciones en esta prueba, proporcionando evidencias particulares de la circulación de VPH en el país, como la presencia de infecciones múltiples de VPH con frecuencias relativamente más altas que lo observado en otras regiones (146).

### **II.15.3. Ensayos para la detección de ARNm E6/E7 de VPH de alto riesgo oncogénico**

El proceso carcinogénico es regulado por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y por lo tanto, la sobreexpresión de estos genes es un marcador pronóstico para el CaCU. Se ha postulado que la detección de la expresión de los oncogenes E6/E7 podría ser más específica, y predecir mejor el riesgo de cáncer que las pruebas de detección de ADN de VPH. Existen al menos dos métodos que usan la detección del ARNm, la prueba **APTIMA HPV ARNm E6/E7 (Gen-Probe)**, que detecta 13 tipos de VPH-AR, más el tipo VPH 66, y la prueba **PreTect HPV-Proofer (NorChip)**, que detecta el ARN de los tipos de VPH-AR 16, 18, 31, 33 y 45. **APTIMA HPV ARNm E6/E7 (Gen-Probe)** es la más utilizada y consiste en una prueba cualitativa, que se basa en la detección directa de la expresión de ARNm de las oncoproteínas E6 y E7, procedente de 14 tipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) mediante una PCR en tiempo real. La prueba no discrimina entre los 14 tipos pero cuenta con un control interno y permite realizar hasta 250 determinaciones en aproximadamente 5 horas. Esta técnica fue aprobada por la FDA en 2011, para el tamizaje en mujeres a partir de los 30 años, en combinación con la citología (147).

---

**CAPÍTULO III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Tipo de estudio y marco de la investigación

El presente estudio es de tipo observacional, descriptivo de corte transversal, con componente analítico, desde agosto de 2012 hasta diciembre de 2015.

En el mismo estuvieron involucrados los hospitales oncológicos de la red de instituciones vinculadas a la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) de la región Litoral del Ecuador. Las provincias incluidas fueron Esmeraldas, Manabí, Guayas, Santa Elena, Los Ríos y El Oro; así como el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), en Guayaquil, Ecuador; donde se realizaron los estudios moleculares. La investigación se desarrolló bajo la conducción del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” de La Habana, Cuba.

Desde el punto de vista organizacional contó con tres partes fundamentales: 1) la toma de muestras cervicouterinas, en los hospitales de SOLCA y realización del examen citológico; 2) genotipificación del VPH en el INSPI y 3) determinación de las variantes y relaciones filogenéticas, estudios realizados a través de secuenciación por la compañía Genewiz Inc. (EEUU) (<https://www.genewiz.com/>). El presente trabajo se encuentra enmarcado en el programa de Doctorado en Ciencias de la Salud del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” de La Habana, Cuba, y está sustentado por las autoridades competentes de este país.

#### III.2. Universo y muestra

El universo de estudio estuvo constituido por todas las mujeres sexualmente activas, con edad mayor o igual a 30 años, que presentaron lesiones cervicouterinas o CaCU y acudieron a la red de hospitales oncológicos SOLCA, de la región Litoral del Ecuador.

#### III.3. Criterios de selección

##### III.3.1. Criterios de inclusión

- Mujeres con edad igual o mayor de 30 años.
- Prueba de Papanicolaou previa al estudio con un resultado de al menos, una citología de células escamosas atípicas con significado indeterminado (ASC-US, *atypical squamous cells of undetermined significance*, por sus siglas en inglés) o de mayor grado.

- Sexualmente activas.
- Residentes en la región Litoral del Ecuador en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, Santa Elena, Guayas o El Oro.
- Haber vivido permanentemente en la zona, al menos, cinco años antes de su participación en el estudio, pues este es el tiempo promedio que se define para la aparición de lesiones de alto grado y CaCU debido a infecciones persistentes por VPH-AR (112, 113). Se asume entonces que las pacientes se infectaron en su provincia de residencia.
- Estado mental apto para participar en la investigación por voluntad propia.
- Expresar su deseo de participar en la investigación, a través de la firma del consentimiento informado.

### **III.3.2. Criterios de exclusión**

- Embarazo en curso.
- Relaciones sexuales dos días antes de la toma de muestra.
- Encontrarse menstruando en el momento de la toma de muestra.
- Tener algún tipo de molestia o infección a nivel de vagina o cuello del útero.
- Haber sido sometida a tacto genital 48 horas antes de la prueba, algún tipo de intervención quirúrgica o tratamiento con radioterapia/quimioterapia.
- Haber recibido tratamiento antimicrobiano o antiviral para alguna infección vaginal durante un mes previo a la toma de la muestra.

### **III.3.3. Criterio de salida**

- A solicitud de la paciente.

### **III.4. Definición y operacionalización de las variables**

La Tabla 6 refiere la operacionalización de las variables para determinar la frecuencia de genotipos del VPH circulantes, sus variantes genéticas y factores clínico-epidemiológicos y sociodemográficos asociados al desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales y CaCU en mujeres de la región Litoral del Ecuador, desde agosto de 2012 hasta diciembre de 2015.



**Tabla 6.** Variables sociodemográficas y clínico-epidemiológicas analizadas en mujeres con edad igual o mayor de 30 años, con lesiones cervicouterinas o CaCU, residentes en la región Litoral del Ecuador en el periodo 2012-2015; con respecto a la infección por VPH, los genotipos circulantes y sus variantes genéticas.

<i>Variable</i>	<i>Tipo</i>	<i>Operacionalización Escala</i>	<i>Definición</i>
<i>Edad en años</i>	Cuantitativa discreta por intervalos	30 - 40 41-50 51-60 >60	Edad en años cumplidos en el momento del estudio.
<i>Procedencia Provincias de la región Litoral del Ecuador</i>	Cualitativa nominal politómica	Esmeraldas Manabí Guayas Los Ríos Santa Elena El Oro	Residir permanentemente en la zona, al menos cinco años antes de su participación en el estudio.
<i>Nivel Escolaridad</i>	Cualitativa ordinal politómica	Educación básica Educación superior	Nivel educacional máximo alcanzado.
<i>Estado civil</i>	Cualitativa ordinal politómica	Casada Soltera Divorciada Viuda Otra	No se estableció según lo reconocido por la legislación ecuatoriana, sino por el tipo de unión estable o no, con una pareja del sexo opuesto.
<i>Situación laboral</i>	Cualitativa ordinal politómica	Ama de casa Estudiante Profesional Obrera Técnica Privado informal	Oficio o profesión de una persona, independiente del sector en que puede estar empleada, o del tipo de estudio que hubiese recibido.
<i>Edad de inicio de las relaciones sexuales</i>	Cuantitativa discreta por intervalos	10 - 18 años > 18 años	Edad en años cumplidos cuando tuvo su primera relación sexual.
<i>Número de parejas sexuales en los últimos dos años</i>	Cuantitativa discreta por intervalos	0 1 >2	Número de personas con las que mantuvo relaciones sexuales en el periodo analizado
<i>Número de embarazos</i>	Cuantitativa discreta por intervalos	0 - 3 > 3	Número de embarazos que llegaron o no a término.
<i>Trastornos menstruales y síntomas ginecológicos</i>	Cualitativa nominal politómica	Sin trastornos y síntomas Metrorragia Leucorrea Menopausia Amenorrea espontanea Amenorrea permanente Metrorragia/Leucorrea Otros*	Cualquier trastorno menstrual o síntoma clínico que involucra el tracto genital inferior.

<i>Citología</i>	Cualitativa ordinal politémica	ASC-US LSIL (NIC 1) HSIL (NIC 2/NIC 3) CaCU	Interpretación de los resultados de la citología cervical, según Clasificación de Bethesda 2014.
<b><i>Infección por Virus del Papiloma Humano</i></b>	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Resultado de la detección de VPH mediante PCR a punto final con los iniciadores universales MY09/11.
<b><i>Genotipificación de VPH</i></b>	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Genotipo de VPH obtenido mediante el sistema comercial <i>Anyplex™ II HPV28</i> ( <i>Seegene</i> ) para 19 tipos de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) y 9 de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70).
<b><i>Infecciones múltiples con VPH</i></b>	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No	Resultado obtenido mediante el sistema comercial <i>Anyplex™ II HPV28 (Seegene)</i> para muestras positivas para más de un genotipo de VPH en combinaciones de 2, 3, 4 y más de 4 genotipos virales.

**Otros\*:** Otros síntomas del tracto genital inferior que incluyen al menos una de estas manifestaciones: prurito, disuria, dispareunia y dolor abdominal bajo.

### **III.5. Técnicas y procedimientos**

#### **III.5.1. Muestras clínicas**

Se tomaron 320 muestras provenientes de mujeres de la región Litoral del Ecuador; además se confeccionó una ficha donde se recolectaron datos acerca de la edad, procedencia, nivel de escolaridad, estado civil, situación laboral, edad de inicio de las relaciones sexuales, número de parejas sexuales en los últimos dos años, número de embarazos, trastornos menstruales y síntomas ginecológicos, así como la clasificación de la citología previa al diagnóstico histológico de la lesión (Anexo 3).

Las muestras correspondieron a cepillados endocervicales y biopsias de lesiones cervicales identificadas previamente. Estas, fueron tomadas por los médicos especialistas en ginecología y obstetricia que desempeñaban trabajos asistenciales en los diferentes centros de salud

involucrados en el estudio. Para la toma de muestras, se utilizó el sistema Cobas<sup>®</sup> PCR Cell Collection Media (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ 08876, EEUU). El personal médico siguió las recomendaciones dadas por el fabricante para la colecta de las muestras (Anexo 4), las cuales se almacenaron a -20°C por un tiempo máximo de tres meses, hasta la extracción del ADN.

### **III.5.2. Citología**

Las lesiones cervicales fueron diagnosticadas previamente a la recogida de la muestra endocervical por el Departamento de Anatomía Patológica del centro de salud correspondiente. El diagnóstico citológico de las lesiones se realizó según los criterios establecidos por el sistema de clasificación de Bethesda 2014 (115).

### **III.5.3. Métodos de extracción y evaluación de ADN**

#### **III.5.3.1. Extracción de ADN**

Para el proceso de extracción del ADN se utilizó el estuche QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Anexo 5). El ADN purificado se diluyó en 100 µL de tampón de elución AE (QIAamp DNA Mini Kit) y se almacenó a -80°C hasta su uso en los ensayos moleculares.

#### **III.5.3.2. Evaluación de la calidad del ADN extraído**

Luego de la extracción del ADN, se evaluó la calidad del mismo mediante diferentes métodos. Inicialmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, de los ADN extraídos, para su visualización y comprobación de su integridad (148). Además, se cuantificó y evaluó la pureza del ADN, mediante el uso del Espectrofotómetro 54 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific<sup>™</sup>, Madison WI, EEUU), cordialmente provisto por el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil (UCSG). Mediante este procedimiento se calculó la concentración del ADN extraído de cada muestra clínica y se determinó su pureza a través del cálculo de las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y a 260/230 nm, definiendo así que estuviera libre de contaminantes proteicos o agentes caotrópicos (149). Se incluyeron en los análisis posteriores todas las muestras de ADN que cumplieron con los criterios de calidad y pureza evaluados.

Además, para descartar la presencia de inhibidores, se empleó como control interno de amplificación de todas las muestras de ADN, una PCR a punto final para la detección del gen de la Beta globina humana, utilizando los siguientes cebadores específicos:

PC03 (sentido positivo) 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3'

PO04 (sentido negativo) 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3'

Estos cebadores generan un producto de 110 pb (150).

### **III.5.4. Método de detección y tipificación universal de VPH**

#### **III.5.4.1. Detección de VPH mediante PCR a punto final con cebadores universales**

Para la identificación del VPH se normalizó una PCR convencional anidada empleando los cebadores universales descritos previamente, MY11/09 (150) y los cebadores internos GP5+/GP6+ (130). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, tanto para los cebadores GP como MY, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 50°C por 1 min para MY y a 42°C para GP, extensión a 72°C por 1 min y finalmente el proceso de extensión final a 72°C por 10 min, para ambos protocolos.

Cada reacción de amplificación se efectuó en un termociclador programable (BIORAD, *Hercules*, California 94547, EEUU), en un volumen final de 25 µL de la mezcla de reacción más 5 µL de ADN (200 ng), empleando los cebadores MY. En el caso de la reacción anidada con los cebadores GP, se utilizaron 5 µL del amplicón de la primera PCR. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis submarina en un gel de agarosa al 2% empleando la tinción con SYBR®Safe (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU) (151). Los fragmentos amplificados correspondieron a la región L1 del VPH y tuvieron una talla de 450 y 150 pb, respectivamente para cada PCR. La interpretación positiva o negativa del resultado de cada PCR se comparó con los controles positivos (productos de PCR de VPH 16 obtenidos a partir del ADN de células SiHa con 1-2 copias del genoma de VPH 16 (*ATCC*, HTB 35, Rockville, Md, EEUU), de la Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés, *American Type Culture Collection*, *ATCC*) y el control negativo (agua destilada en lugar de ADN).

### III.5.4.2. Método de genotipificación de VPH mediante el sistema comercial Anyplex™ II HPV28 (Seegene)

Para la genotipificación del virus, se empleó el sistema Anyplex™ II HPV28 PCR KIT (Seegene, Seúl, Corea del Sur), que permitió la detección en tiempo real de 19 tipos de VPH de alto riesgo oncogénico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) y 9 de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70), a partir de muestras cervicales. Se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante para la realización del protocolo de PCR (Anexo 6).

### III.5.5. Amplificación de las regiones L1, LCR, E6 y E7 del VPH 16

Las muestras positivas a VPH 16 mediante la PCR con los iniciadores universales, se amplificaron además con iniciadores específicos para las regiones L1 (dos fragmentos), LCR (2 fragmentos), E6 (un fragmento) y E7 (un fragmento). Las secuencias y toda la información sobre los iniciadores empleados se muestran a continuación (Tabla 7). Las condiciones de amplificación se describen en el Anexo 7.

**Tabla 7.** Iniciadores empleados en el estudio de filogenia y polimorfismo de VPH 16.

<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Región</i>	<i>Talla</i>	<i>Fuentes</i>
<i>E7-120F</i>	ATAATATAAGGGGTCGGTGG	E7	198 pb	Wu y cols. 2006 (152)
<i>E7-120R</i>	CATTTTCGTTCTCGTCATCTG	E7		
<i>LCR3-F</i>	ACTTGTACGTTTCCTGCTTG	LCR 1	340 pb	Pientong y cols. 2013 (153)
<i>LCR3-R</i>	GTGTAACCCAAAATCGGTTTGC	LCR 1		
<i>LCR4-F</i>	GTCACCCTAGTTCATACATGA	LCR 2	201 pb	
<i>LCR4-R</i>	TGCAGTTCTCTTTTGGTGC	LCR 2		
<i>L1-16-1F</i>	ATGTCTCTTTGGCTGCCTAG	L1a	674 pb	Fрати y cols. 2011 (154)
<i>L1-16-1R</i>	GCATCAGAGGTAACCATAGAAC	L1a		
<i>F6835L</i>	GATGTACAAATATCCAGTGG AAC	L1b	287 pb	Lurchachaiwong y cols. 2009 (155) Zhingre y cols. 2016 (156)
<i>R7764L</i>	CTGTGCAAATAACCTTA ACTGC	L1b		
<i>Forward Variante-F</i>	CGAAACCGGTTAGTATAA	E6	423 pb	Wu y cols. 2006 (152)
<i>Reverse variante-R</i>	GTATCTCCATGCATGATT	E6		

La amplificación de dichos fragmentos con iniciadores específicos se realizó con el objetivo de efectuar análisis filogenéticos e identificación de mutaciones en regiones informativas del genoma de VPH 16.

### III.5.6. Método de purificación de productos de PCR

Las muestras en las que se obtuvo amplicones mediante el sistema de PCR anidada se identificaron como positivas para VPH. Los amplicones obtenidos por este método, ya fueran los

de la primera o segunda reacción, se purificaron empleando el estuche de purificación de QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo 8). A las muestras de ADN purificadas por este método se les analizó la pureza y concentración mediante el Espectrofotómetro 54 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Madison WI, EE.UU), como se describe anteriormente en el acápite III.5.3.2, lo que garantizó la calidad del ADN purificado para su empleo en las reacciones de secuenciación.

### **III.5.7. Método de tipificación por PCR - Secuenciación, por el método de Sanger**

Las muestras purificadas se enviaron a secuenciar, según los resultados del análisis de la calidad del producto purificado. Se tomaron en cuenta las recomendaciones y protocolos de la compañía Genewiz Inc. (EE.UU) (<https://www.genewiz.com/>) en la preparación del producto de PCR disponible para secuenciar. Esta compañía emplea el método de Sanger, basado en la química de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing v 3.1*, para la secuenciación acoplada con un sistema de electroforesis capilar y el uso de nucleótidos fluorescentes. El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial (Applied Biosystems, EEUU).

#### **III.5.7.1. Edición de los cromatogramas**

Los cromatogramas obtenidos en formato *Applied Biosystems* AB1, se editaron con el programa de bioinformática GENEIOUS versión 4.84 (Biomatters, Wellington, Nueva Zelanda). Solo se incluyeron en los análisis posteriores las secuencias nucleotídicas con cromatogramas de buena calidad. Cuando fue posible, de cada muestra se obtuvieron dos secuencias del proceso de amplificación inicial; una por cada cebador. Estas secuencias se fusionaron para formar una secuencia consenso a partir de los productos amplificados de una misma muestra.

#### **III.5.7.2. Análisis de secuencias**

A partir de las secuencias nucleotídicas de calidad, se realizó un primer análisis, con las secuencias consenso obtenidas a partir de los iniciadores universales MY09/MY11 y se compararon con la base de secuencias GenBank de NCBI, mediante el algoritmo PAIRWISE del programa BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, EEUU), para determinar los genotipos presentes en las muestras.

En el caso de las secuencias obtenidas a partir de amplificaciones selectivas con iniciadores específicos de las regiones L1, LCR, E6 y E7, las secuencias consenso se editaron tomando como referencia la secuencia prototipo, ya fuera para VPH 16 o VPH 58. El análisis de polimorfismos y

variantes genéticas para estos genotipos se realizó, tanto con el algoritmo PAIRWISE de BLAST, como con las opciones de alineamientos múltiples de GENEIOUS (MUSCLE y CLUSTALW) (Biomatters, Wellington, Nueva Zelanda).

### **III.5.7.3. Análisis filogenético de VPH 16 y VPH 58**

Se realizaron dos tipos de análisis filogenéticos para definir la presencia de linajes y sublinajes de VPH 16 y VPH 58. El primer análisis generó un grupo de árboles filogenéticos basados en coalescencia e incluyó las secuencias correspondientes a la región del gen L1, obtenidas con los iniciadores universales MY09/MY11, que fueron positivas VPH 16 y VPH 58.

En el caso del árbol para VPH 16, las secuencias obtenidas en el presente estudio, se compararon con secuencias de Ecuador, publicadas previamente por Mejía y cols., en 2016 (108), y con secuencias de diferentes regiones del mundo. Para este genotipo, las secuencias obtenidas se clasificaron sobre la base del análisis filogenético de coalescencia, como linajes A, B, C o D, utilizando las siguientes secuencias de referencia de Burk y cols. 2013 (57): A1 (K02718), A2 (AF536179), A3 (HQ644236), A4 (AF534061), B1 (AF536180), B2 (HQ644298), C (AF472509), D1 (HQ644257), D2 (AY686579), D3 (AF402678).

Para la construcción del árbol de VPH 58, las secuencias obtenidas se clasificaron como linajes A, B, C y D, siguiendo la nomenclatura de Burk y cols., del 2013 (57). El árbol filogenético se obtuvo mediante análisis de coalescencia y se construyó usando las siguientes secuencias de referencia: A1 (D90400), A2 (HQ537752), A3 (HQ537758), B1 (HQ537762), B2 (HQ537764), C (HQ537774), D1 (HQ537768), D2 (HQ537770), descritas previamente por Chan y cols., (157). También se utilizaron en el análisis, secuencias ecuatorianas descritas previamente por Mejía y cols., (108).

Los análisis de coalescencia se realizaron con el programa BEAST versión 1.8.3 (Centre for Computational Evolution, Auckland, Nueva Zelanda) (158) y el procedimiento se describe detalladamente en el acápite siguiente.

Para la construcción del segundo grupo de árboles, solo se realizó el análisis filogenético para las muestras positivas a VPH 16. Para ello se empleó el método de máxima verosimilitud (159), implementado mediante el paquete bioinformático Mega, versión X (160). Los árboles se construyeron a partir de las secuencias obtenidas por la amplificación selectiva de las regiones L1, LCR, E6 y E7 de VPH 16, con iniciadores específicos. Se empleó la nomenclatura de linajes propuesta por Burk y cols., en 2013 (57) y se usaron las siguientes secuencias de referencia: A1

(K02718), A2 (AF536179), A3 (HQ644236), A4 (AF534061), B1 (AF536180), B2 (HQ644298), C (AF472509), D1 (HQ644257), D2 (AY686579), D3 (AF402678).

#### **III.5.7.4. Análisis de coalescencia para la región L1 de VPH 16 y VPH 58 a partir de secuencias obtenidas con los iniciadores universales MY09/MY11**

La valoración del tiempo al antepasado común más reciente (tMRCA, del inglés, *most recent common ancestor*) para VPH 16 y VPH 58, a partir de las secuencias del gen L1 obtenidas mediante los cebadores universales, se llevó a cabo por análisis bayesiano basado en la Cadena de Monte Carlo Markov (MCMC), implementado en el programa BEAST versión 1.8.3 (Centre for Computational Evolution, Auckland, Nueva Zelanda) (158). Para seleccionar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se adaptó al conjunto de datos, se utilizó ModelTest versión 2.1.3 y los criterios de información de AKAIKE (AIC, *Akaike information criterion*, por sus siglas en inglés) (161).

El trazado Bayesiano del horizonte (BSP) fue seleccionado como un modelo para estimar la evolución y parámetros coalescentes. Los análisis de BSP se ejecutaron bajo dos modelos de relojes moleculares, estrictos y relajados no correlacionados. Se fijó una tasa de sustitución de  $1,84 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio por año, descrita previamente por Chen y cols., (162). Este valor teórico proviene de los puntos de calibración fósiles para los Virus del Papiloma Felino (163). El mejor modelo de reloj se eligió sobre la base de un análisis de factores bayesianos. Las pruebas de MCMC se ejecutaron durante  $5 \times 10^7$  generaciones. Cada 5000 generaciones se muestreó, para lograr un tamaño de muestra efectivo (ESS, *effective sample size*, por sus siglas en inglés)  $> 200$ . Todos los registros de la corrida por el programa BEAST se analizaron con el programa TRACER versión 1.5 (<http://Beast.bio.ed.AC.uk/treeannotator>). El máximo clado de credibilidad del árbol (MCCT, *maximum credibility clade tree*, por sus siglas en inglés) se construyó con la herramienta de árboles, Anotador (<http://Beast.bio.ed.AC.uk/treeannotator>) después de descartar el 2 % del muestreo. El MCCT que resume la información posterior de las topologías y la mediana de las longitudes de las ramas de los árboles muestreados, se visualizó con el programa FigTree versión 1.4.0, (<http://Tree.bio.ed.AC.uk/>).



### **III.5.7.5. Análisis de polimorfismos en las regiones L1, LCR, E6 y E7 para VPH 16, y región L1 para VPH 58**

Los productos de amplificación generados, tanto con los cebadores universales MY09/MY11 de las muestras positivas a VPH 16 y a VPH 58 como con los cebadores específicos para VPH 16 (regiones L1, LCR, E6 y E7), se analizaron mediante el programa BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*). Dicho programa permitió determinar la presencia de mutaciones o polimorfismos a través de la comparación de las secuencias obtenidas en el presente estudio, con las secuencias de referencia internacional definidas por Burk y cols., 2013, (57) disponibles en la base de genes GenBank ([www//ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Estos análisis permitieron determinar los polimorfismos que pudieran asociarse a la presencia de lesiones cervicouterinas y CaCU.

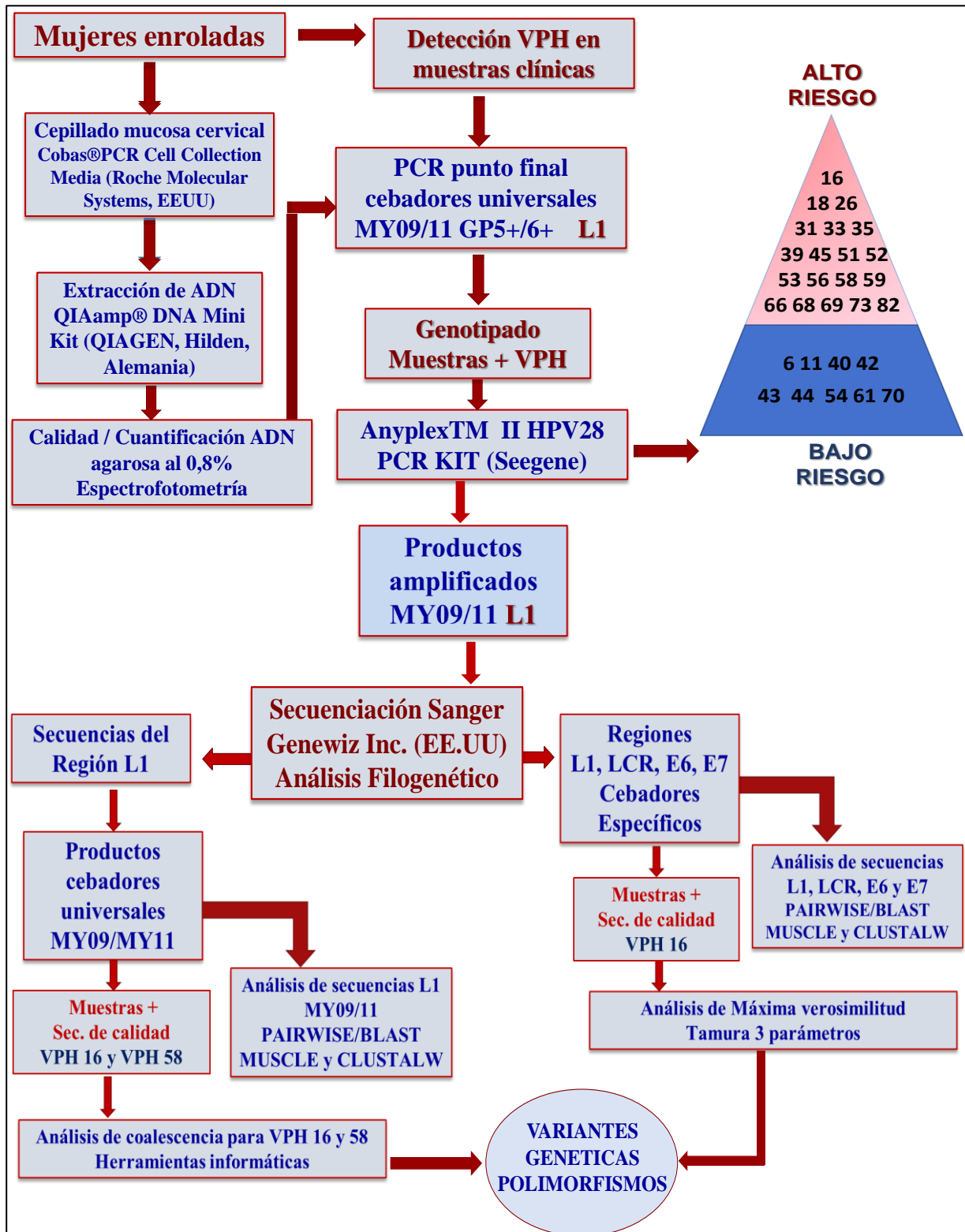
### **III.5.8. Resumen del flujograma de trabajo**

Para facilitar la comprensión de los procedimientos de trabajo desarrollados en la presente investigación, se muestra un diagrama de flujo (Figura 9). A las mujeres enroladas en el estudio se les realizó un cepillado cervical para obtener células de las que se extrajo ADN, el cual se amplificó con cebadores universales para el gen L1. Los productos de las muestras positivas a VPH se genotipificaron. Se realizó análisis filogenético de coalescencia para la región L1 de VPH 16 y 58, amplificada con cebadores universales, y análisis de máxima verosimilitud para fragmentos de las regiones L1, E6, E7 y LCR de VPH 16, amplificados con cebadores específicos. Se realizaron alineamientos para identificar polimorfismos y variantes genéticas de VPH 16 y VPH 58.

### **III.6. Análisis estadístico**

El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el paquete estadístico Epi Info StatCalc versión 7.2.5.0 (CDC, Atlanta, EE.UU), con un margen de error del 5 % y un nivel de confiabilidad del 97 %.

El análisis estadístico de los resultados se realizó a dos niveles: descriptivo y analítico bivariado. Para ello se empleó el paquete estadístico SPSS versión 21 (IBM, Endicott, Nueva York, EEUU). El análisis estadístico descriptivo se basó en el cálculo de frecuencias absolutas y relativas. Para el componente estadístico bivariado se utilizaron las tablas de contingencia donde se evaluó el nivel de asociación mediante la prueba de (Chi Cuadrado)  $X^2$  de Pearson.



**Figura 9.** Diagrama de flujo de trabajo desarrollado para definir la frecuencia de genotipos y variantes genéticas del VPH circulantes en mujeres mayores de 30 años, con lesiones cervicales, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

También se calculó el nivel de riesgo mediante la prueba de razón de prevalencias corregido con el estadístico de Mantel-Haenszel. Para todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Se tuvieron en cuenta como variables dependientes a las lesiones citológicas cervicales, desde ASC-US hasta CaCU. Como variables independientes se definieron las variables sociodemográficas, clínico-epidemiológicas, específicamente las ginecológicas, y variables virológicas. Se consideraron significativos valores de  $p < 0,05$  y a los valores de Razón de Prevalencia ( $RP$ )  $RP > 1$  se les definió como factores de riesgo probable, mientras que los valores de  $RP < 1$  se les consideró como factores de protección, con un intervalo de confianza del 95 %.

### **III.7. Consideraciones éticas**

El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (164) sobre lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual; la investigación clínica en humanos y las Normas de la OMS establecidas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, OMS-CIOMS (165). Contó con la aprobación de la Comisión de Ética y Científica del Hospital “Francisco Icaza Bustamante”. Las pacientes reclutadas, después de haber recibido toda la información necesaria a través de charlas y material escrito, pudieron decidir si deseaban participar o no en el estudio. Se les explicó a las participantes cómo se realizaría el estudio por parte de un personal calificado, empleando un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión, así como la importancia del estudio y su beneficio. Se le solicitó a cada paciente su Consentimiento Informado (Anexo 9), se les entregó una copia firmada y se les informó que podrían retirarse del estudio sin perjuicio alguno. Toda la información individual relacionada con los sujetos quedó debidamente almacenada una base de datos en el programa Excel y custodiada por los responsables del estudio, de forma tal que se garantizara la absoluta confidencialidad de los datos personales.

---

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. Características generales de la población estudiada

La población analizada estuvo constituida por 320 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión; y que procedían de todas las provincias de la región Litoral del Ecuador, antes mencionadas. Las características generales de la población de estudio puede observarse en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Características sociodemográficas y clínico-epidemiológicas de la población de estudio que incluyó mujeres con edad mayor o igual a 30 años, con lesiones citológicas y CaCU, residentes en la región Litoral del Ecuador. Periodo 2012-2015.

<i>Variable</i>	<i>Categorías o grupos</i>	<i>Número de pacientes (n=320)</i>	<i>Frecuencia relativa (%)</i>
<i>Edad en años</i>	30-40	171	53,44
	41-50	69	21,56
	51-60	38	11,87
	>60	42	13,13
<i>Procedencia Provincias de la región Litoral del Ecuador</i>	Esmeraldas	33	10,31
	Manabí	66	20,63
	Guayas	109	34,06
	Los Ríos	31	9,69
	Santa Elena	24	7,50
	El Oro	57	17,81
<i>Nivel Escolaridad</i>	Educación básica	268	83,75
	Educación superior	49	15,31
	Valores perdidos	3	0,94
<i>Estado civil</i>	Casada	133	41,56
	Soltera	78	24,38
	Divorciada	11	3,44
	Viuda	13	4,06
	Otra	84	26,25
	Valores perdidos	1	0,31
<i>Situación laboral</i>	Ama de casa	238	74,38
	Estudiante	9	2,81
	Profesional	31	9,69
	Obrera	17	5,31
	Técnica	3	0,94
	Privado informal	20	6,25
	Valores perdidos	2	0,63
<i>Edad de inicio de las relaciones sexuales</i>	10-18 años	169	52,81
	>18 años	84	26,25
	Datos perdidos	67	20,94

<i>Número de parejas sexuales en los dos últimos años</i>	0	9	2,81
	1	193	60,31
	>2	48	15,00
	Valores perdidos	70	21,88
<i>Número de embarazos</i>	0-3	138	43,13
	>3	151	47,19
	Valores perdidos	31	9,69
<i>Trastornos menstruales y síntomas ginecológicos</i>	Sin trastornos y síntomas	104	32,50
	Metrorragia	50	15,63
	Leucorrea	50	15,63
	Menopausia	17	5,31
	Amenorrea espontánea	5	1,56
	Amenorrea permanente	1	0,31
	Metrorragia/ Leucorrea	2	0,63
	Otros*	4	1,25
	Valores perdidos	87	27,19
<i>Citología</i>	ASC-US	80	25,00
	LSIL (NIC 1)	91	28,44
	HSIL (NIC 2/NIC 3)	126	39,38
	CaCU	23	7,19

**Fuente:** Resultados de la investigación. **Otros\*:** Otros síntomas del tracto genital inferior que incluyen al menos una de estas manifestaciones: prurito, disuria, dispareunia y dolor abdominal bajo.

La mediana de la edad de las mujeres incluidas en el presente estudio fue de 43,83 años, con un rango que varió entre 30 y 83 años. El grupo de mujeres entre 30 y 40 años constituyó el grupo predominante de la población estudiada (53,44 %). La mayor parte de las pacientes residían en las provincias de Guayas y Manabí, y constituyeron el 54,69 % del total. En cuanto al resto de las variables sociodemográficas, las mujeres con nivel educacional primario y secundario (educación básica) fueron el segmento de población mayoritario (83,75 %); las mujeres casadas (41,56 %) fueron la mayoría. Así mismo, las amas de casa fueron más numerosas, con respecto a la situación laboral (74,38 %).

En cuanto al resto de variables clínicas y ginecológicas, se evidenció que la edad de inicio de relaciones sexuales tuvo una mediana de 18 años, con valores, mínimo de 12 y máximo de 37 años. La media de embarazos fue de 4,19; con un rango entre 0 y 17 gestaciones. Además, las mujeres incluidas en el estudio refirieron un promedio de 1,25 parejas sexuales en los dos últimos años, con un rango entre 0 y 6 parejas.

Un número importante de mujeres no presentaron trastornos menstruales o síntomas ginecológicos (32,50 %). El resto de las mujeres presentaron varios tipos de trastornos

menstruales o síntomas ginecológicos, y se identificó la metrorragia y la leucorrea como las más frecuentes (15,63 % ambas).

Se ha reportado previamente, en un estudio realizado en adolescentes de diferentes provincias y de diversos orígenes socioculturales, que la edad de inicio de las relaciones sexuales en Ecuador tuvo una media de 15 años, tanto para hombres como para mujeres (166). Estudios similares realizados en América Latina reportan que más de un 50 % de las mujeres, con una edad promedio de 30 años o más, refieren una pareja sexual durante casi toda su vida sexual activa (167).

Con respecto a los síntomas ginecológicos más frecuentes identificados en la población estudiada, la leucorrea o flujo vaginal y la metrorragia se detectaron en el mayor porcentaje de los casos. Aunque la mayoría de las mujeres investigadas solo refirió una pareja sexual durante toda su vida sexualmente activa, este comportamiento no excluye la posibilidad de padecer infecciones vaginales que causen estos síntomas. Esto pudiera deberse a la diferencia en el comportamiento de los hombres respecto al de las mujeres. Los hombres comúnmente tienen conductas sexuales promiscuas de manera frecuente, no usan condón. Este comportamiento constituye la causa más común del contagio de sus esposas con infecciones de transmisión sexual, según otros autores de estudios similares en la región (168, 169).

En otros estudios realizados en poblaciones femeninas del Ecuador se ha podido evidenciar que el síntoma ginecológico referido también con más frecuencia es el flujo vaginal (170-172). Además, se ha encontrado relación entre las conductas de riesgo, fundamentalmente en los hombres, como el no uso de condón y la promiscuidad, relacionados con la presencia de leucorrea en sus esposas. El hecho de tener varias parejas sexuales constituye uno de los principales factores de riesgo para la infección con agentes como el VPH, relacionado con una alta incidencia de CaCU (170-173).

Es de destacar que el 39,38 % de las mujeres analizadas presentaban lesiones de alto grado, aunque el número de casos con lesiones cervicales, por provincia fue heterogéneo. En provincias como El Oro y Santa Elena, no se obtuvieron muestras de pacientes con CaCU. Otras provincias, como Manabí y Esmeraldas, aportaron solo muestras con lesiones tipo ASC-US y LSIL. Las provincias de Guayas y Los Ríos fueron las únicas con una alta proporción de casos con lesiones de alto grado y CaCU. Tanto en Ecuador como en otros países de Latinoamérica existen reportes

en población aparentemente sana, donde el porcentaje de ASC-US varía entre 0,6 y 10,4 %; para LSIL se reporta entre 1,8 y 14,5 %; mientras que las lesiones de alto grado se identifican en cerca del 2 % de los casos (168, 173). En el presente trabajo, los porcentajes fueron superiores ya que son mujeres mayores de 30 años con citologías positivas previamente, pero llama la atención de que existen variaciones entre provincias con respecto a la presencia de lesiones de alto grado y CaCU. Estos sesgos fueron considerados en los análisis estadísticos bivariados que se muestran en el presente trabajo.

## **IV.2. Frecuencia de infección por Virus del Papiloma Humano, genotipos circulantes en mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervicouterino, residentes en la región Litoral del Ecuador**

### **IV.2.1. Frecuencia de infección por VPH en la población estudiada, distribución de acuerdo con las variables sociodemográficas y clínico-epidemiológicas**

Los resultados obtenidos exhiben una frecuencia alta de infección por VPH (93,75 %, 300/320) en la población de estudio, como es de esperar ya que se incluyeron solo mujeres con lesiones citológicas, confirmadas por histología. Las diferencias, entre los grupos etarios en que fue categorizada la población, fueron mínimas en cuanto a la positividad al VPH.

Así mismo, no se observaron grandes diferencias en cuanto a las frecuencias de infección por provincia, no obstante, las cifras más altas las presentaron las provincias de Esmeraldas (100 %) y Manabí (98,49 %).

Con relación a las variables nivel de escolaridad, estado civil y situación laboral, no se encontraron diferencias significativas para las frecuencias de infección entre cada una de las variables. Las mujeres que iniciaron las relaciones sexuales antes de los 18 años y las que tuvieron tres o más embarazos, mostraron la mayor frecuencia de infección por VPH. En las pacientes con trastornos menstruales y síntomas ginecológicos se detectaron los porcentajes más elevados de infección por VPH.

Se han estudiado a profundidad muchas variables sociodemográficas y clínico-epidemiológicas por su asociación con la infección por VPH y las lesiones precursoras del CaCU, tal es el caso del inicio temprano de las relaciones sexuales, el número elevado de parejas sexuales, el nivel bajo de escolaridad, la carencia de pareja sexual estable, las malas condiciones socioeconómicas, el hábito de fumar, el uso de anticonceptivos orales, entre otras (174).



En la literatura se evidencia a la multiparidad como un factor de riesgo para la infección por VPH y el desarrollo de CaCU. Se plantea que un mayor número de embarazos a término en edades tempranas tiene un rol potenciador para la transición de la infección por VPH y el desarrollo de lesiones neoplásicas. El incremento del riesgo de CaCU en mujeres jóvenes con embarazo a término, se puede atribuir a traumas cervicales durante el parto, que pueden resultar en una ectopia, incrementando así la exposición del tejido escamo-columnar a la infección por VPH. Este fenómeno se estudió en varias regiones geográficas, particularmente en Estados Unidos (175) e Inglaterra (176) y también resultó un factor de riesgo para la aparición y el desarrollo de las lesiones precursoras del CaCU en poblaciones similares. La infección por VPH es un requisito previo para el desarrollo de este tipo de cáncer, pero varios cofactores, entre ellos la acción de las hormonas esteroideas sexuales, pudieran ser desencadenantes en este proceso (177).

El tipo de lesión citológica confirmada por histología mostró diferencias en cuanto a la frecuencia de infección por VPH. Se observó que de las 300 muestras positivas para el virus, el 40,67 % (122/300) correspondían a lesiones de tipo HSIL; 29,33 % (88/300) a LSIL, 22,33 % (67/300) a lesiones tipo ASC-US y el 7,67 % (23/300) a CaCU. Sin embargo, al estudiar la frecuencia dentro de cada grupo de mujeres con lesiones, se observó que el porcentaje de infección por VPH fue elevado, incluso se incrementó a medida que aumentaba el grado de la lesión. Así, en muestras con citologías ASC-US fue del 83,75 % (67/80), incrementándose en muestras con una citología LSIL (96,70 %; 88/91) y HSIL (96,83 %; 122/126), para finalmente alcanzar el 100% en muestras con CaCU (Tabla 9).

Existe un consenso general, basado en evidencias epidemiológicas, clínicas y virológicas que han permitido concluir que la infección por VPH es la causa del CaCU, particularmente los VPH-AR, cuyo genoma se ha encontrado en más del 90 % de todos los carcinomas de células escamosas del tracto anogenital (1-3). De manera, que a medida que se incrementa el grado de atipia de la lesión, se incrementa la frecuencia en que se detecta el genoma del VPH. Se describe en la literatura que se puede detectar VPH mediante técnicas moleculares en cerca del 60 % de las LSIL, en aproximadamente el 80 % de las HSIL y más del 90 % de los casos de CaCU (178).

Es conocido que la frecuencia de infección varía entre países, regiones y provincias, en mujeres con citología negativa y con lesiones de bajo grado, sobre todo cuando se estudian mujeres con amplia distribución de grupos etarios.

**Tabla 9.** Frecuencia de infección por VPH de acuerdo con las variables sociodemográficas y clínico-epidemiológicas, en la población de estudio que incluyó mujeres con edad mayor o igual a 30 años, con lesiones citológicas y CaCU, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

<i>Variable</i>	<i>Categorías o grupos</i>	<i>Número de pacientes (n=320)</i>	<i>Número de casos positivos a VPH (n=300)</i>	<i>Frecuencia de casos positivos a VPH (%)</i>
<i>Edad en años</i>	30-40	171	161	94,15
	41-50	69	63	91,30
	51-60	38	36	94,73
	>60	42	40	95,24
<i>Procedencia Provincias de la región Litoral del Ecuador</i>	Esmeraldas	33	33	100,00
	Manabí	66	65	98,49
	Guayas	109	102	93,58
	Los Ríos	31	29	93,55
	Santa Elena	24	21	87,50
	El Oro	57	50	87,72
<i>Nivel de Escolaridad</i>	Educación básica	268	252	94,03
	Educación superior	49	45	91,84
	Valores perdidos	3		
<i>Estado civil</i>	Casada	133	125	93,99
	Soltera	78	72	92,31
	Divorciada	11	11	100,00
	Viuda	13	13	100,00
	Otra	84	78	92,86
	Valores perdidos	1		
<i>Situación laboral</i>	Ama de casa	238	224	94,12
	Estudiante	9	9	100,00
	Profesional	31	27	87,10
	Obrera	17	15	88,24
	Técnica	3	3	100,00
	Privado informal	20	20	100,00
	Valores perdidos	2		
<i>Edad de inicio de las relaciones sexuales</i>	10-18 años	169	163	96,45
	>18 años	84	74	88,10
	Valores perdidos	67		
<i>Número de parejas sexuales en los últimos dos años</i>	0	9	9	100,00
	1	193	193	100,00
	>2	48	48	100,00
	Valores perdidos	70	50	
<i>Número de embarazos</i>	0-3	138	138	100,00
	>3	151	151	100,00
	Valores perdidos	31		

<b>Trastornos menstruales y síntomas ginecológicos</b>	Sin trastornos y síntomas	104	99	95,20
	Metrorragia	50	47	94,00
	Leucorrea	50	46	92,00
	Menopausia	17	17	100,00
	Amenorrea espontánea	5	2	40,00
	Amenorrea permanente	1	1	100,00
	Metrorragia/Leucorrea	2	2	100,00
	Otros*	4	4	100,00
	Valores perdidos	87		
<b>Citología</b>	ASC-US	80	67	83,75
	LSIL (NIC 1)	91	88	96,70
	HSIL (NIC 2/NIC 3)	126	122	96,83
	CaCU	23	23	100,00

**Fuente:** Resultados de la investigación. **Otros\*:** Otros síntomas del tracto genital inferior que incluyen al menos una de estas manifestaciones: prurito, disuria, dispareunia y dolor abdominal bajo.

Como se evidencia en los resultados, la frecuencia de infección por VPH fue notablemente alta en todos los grupos de mujeres, y el comportamiento en cuanto a los valores de positividad no difirió prácticamente entre las provincias. Estos resultados contrastan con lo que se reporta en la población abierta, que es muy heterogénea, pues incluye mujeres en diferentes estadios de la infección, aun cuando no tienen lesiones cervicales. Como era de esperar, en el presente estudio, la infección por VPH en las mujeres analizadas, mujeres mayores de 30 años, con lesiones precursoras y CaCU, es superior al 90 %, aspecto ampliamente descrito en la literatura (179-181).

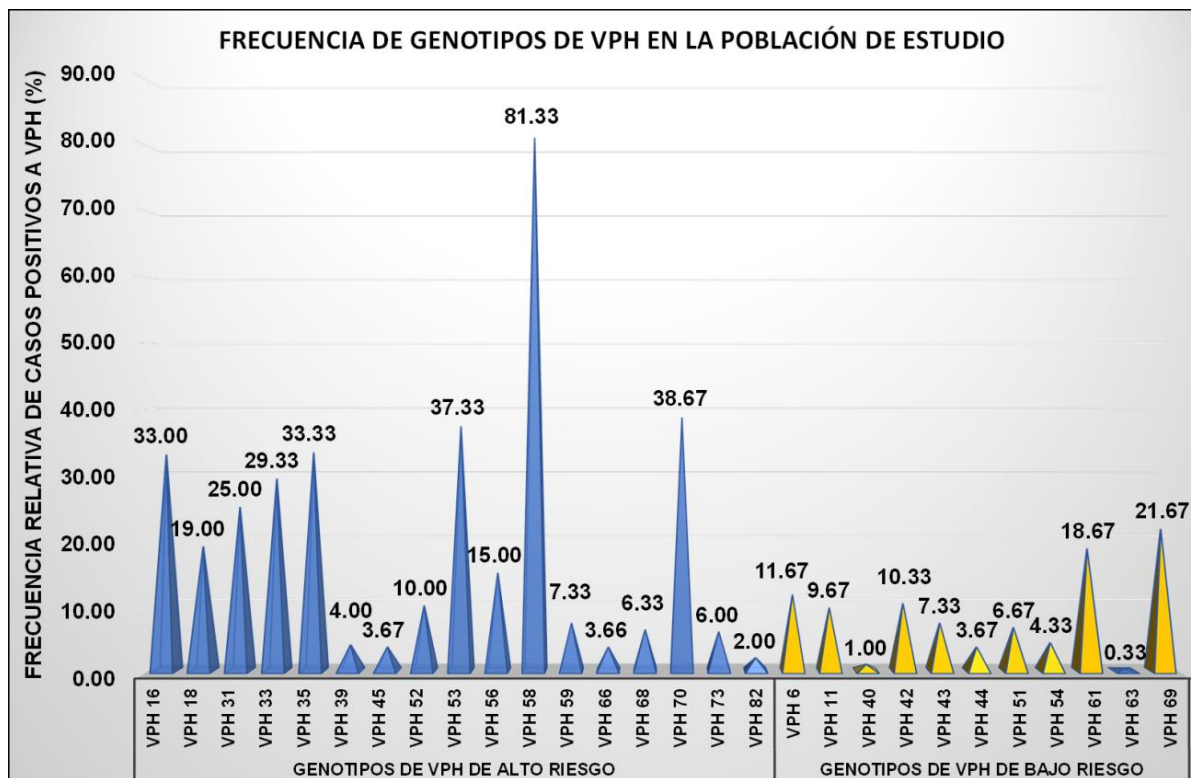
De acuerdo a un meta-análisis realizado en el 2010, que incluyó un millón de mujeres con citología normal, procedentes de 59 países y 5 continentes, la prevalencia de la infección cervical se mantiene en el rango de 1,6 a un 25 %, con una prevalencia global estimada de 11,7 %, aunque fue diferente según las regiones geográficas. De hecho, la prevalencia del VPH se estimó en un 24 % en África Sub-Sahariana, en el Este de Europa un 21,4 % y en Latinoamérica un 16,1 %. Los menores valores de prevalencia se encontraron en América del Norte (4,7 %) y el Oeste Asiático (1,7 %) (182).

Otro meta-análisis realizado por autores mexicanos incluyó el estudio de 1425 muestras de mujeres con citología normal provenientes de diferentes países, como México, Estados Unidos, Canadá, Brasil, Suecia, Tanzania, Sudáfrica, Tailandia, Arabia Saudita y Australia (183). Dichos autores detectaron una prevalencia de infección por VPH de 12,4 % (183). Estudios realizados en mujeres indígenas de Argentina se observan cifras elevadas de infección por VPH, cercanas al 40

%, pues la prevalencia varía drásticamente dentro de las regiones de un mismo país y se han descrito diferencias significativas entre provincias o asentamientos (184).

#### IV.2.2. Genotipos de VPH en la población estudiada

En la Figura 10 se muestran las frecuencias relativas de los genotipos de VPH en la población de estudio.



**Figura 10.** Frecuencia relativa de genotipos de VPH en población femenina mayor de 30 años, con lesiones cervicouterinas, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-1015. Se destacan las altas frecuencias individuales de los genotipos de alto riesgo oncogénico (VPH-AR en azul), en comparación con los de bajo riesgo (VPH-BR en amarillo).

Se identificaron los 28 genotipos que detecta la técnica de genotipado empleada. Entre los 300 casos positivos, predominaron los VPH-AR, que en orden de frecuencia fueron VPH 58 (81,33 %; 244/300), VPH 70 (38,67 %; 116/300), VPH 53 (37,33 %; 112/300), VPH 35 (33,33 %; 100/300), VPH 16 (33,00 %; 99/300), VPH 33 (29,33 %; 88/300), VPH 31 (25,00 %; 75/300), VPH 18 (19,00 %; 57/300), VPH 56 (15,00 %, 45/300), VPH 52 (10,00 %; 30/300), VPH 57 (7,33 %; 22/300), VPH 68 (6,33 %; 19/300), VPH 73 (6,00 %; 18/300), VPH 39 (4,00 %; 12/300), VPH 45 (3,67 %; 11/300), VPH 66 (3,66 %; 11/300) y VPH 82 (2,00 %; 6/300). Entre

los VPH-BR se encontraron los tipos VPH 69 (21,67 %, 65/300), VPH 61 (18,67 %, 56/300), VPH 6 (11,67 %, 35/300), VPH 11 (9,67 %, 29/300), VPH 42 (10,33 %, 31/300), VPH 43 (7,33 %; 22/300), VPH 51 (6,67 %; 20/300), VPH 54 (4,33 %; 13/300), VPH 44 (3,67 %; 11/300), VPH 40 (1,00 %; 3/300) y VPH 63 (0,33 %; 1/300).

El genotipo 58 fue el más frecuente en todas las provincias estudiadas, y no el 16 como se reporta en la mayoría de los estudios realizados en diferentes países latinoamericanos y a escala global, donde se ha demostrado que el VPH 16 es el genotipo más frecuente, en todos los grupos etarios, tanto en mujeres con citología negativa (95) como en las que presentan lesiones cervicales de diferente grado o CaCU (185).

En la presente investigación el VPH 58 fue entre dos y cuatro veces más frecuente que otros VPH-AR. Un fenómeno similar fue reportado recientemente por Carrión y cols., en un estudio realizado en mujeres indígenas de la provincia del Cañar. No obstante, en dicho estudio se identificó el VPH 31 en más de la mitad de las mujeres y el VPH 16 solo se detectó en el 12,95 %, sin embargo el VPH 58 se pudo identificar en el 32,98 % de las mismas (40).

Los patrones de circulación de los genotipos virales pueden variar, por ejemplo, en estudios realizados en Brasil, los genotipos 56 y 39, siguen en frecuencia al 16 (185). En Asia, particularmente en China, los genotipos 52, 33 y 81 se presentan más comúnmente después del 16 (186, 187). En México, según los estudios más recientes, los genotipos más frecuentes son VPH 58, 31, 18, 70 y 35 (188). En Cuba, según un artículo publicado por Guilarte y cols., en el 2020, los genotipos pueden variar su circulación entre provincias de las regiones occidental, central y oriental del país, aunque el más frecuente fue el VPH 16 en toda la isla (189). Recientemente, en investigaciones efectuadas en el noreste de Brasil y sur de México, se reportan prevalencias altas para otros tipos de VPH diferentes al 16 y 18, en particular los tipos 33 y 58 (21-23). Estos resultados y otros en todo el mundo, demuestran la particularidad en la circulación del VPH, por países o regiones geográficas y provincias (185-188).

#### **IV.2.3. Distribución de genotipos de VPH en la población estudiada con respecto a las provincias de residencia y al grado de las lesiones citológicas**

Aunque el VPH 58 fue el más frecuente en las mujeres de todas las provincias estudiadas, el patrón de circulación de los VPH-AR fue ligeramente variable entre ellas. En la provincia de El Oro, donde se identificaron 50 casos positivos a VPH, los tipos más frecuentes fueron VPH 58

(70,00 %, 35/50), 53 (48,00 %, 24/50), 33 (46,00 %, 23/50) y 70 (38,00 %, 19/50). En la provincia de Esmeraldas, el patrón de genotipos más frecuentes fue muy similar en los 33 casos positivos a VPH: el genotipo 58 (87,87 %, 29/33), 53 (48,48 %, 16/33), 35 (45,45 %, 15/33), 70 (39,39 %, 13/33) y el VPH 16 (24,24 %, 8/33). Sin embargo, la provincia del Guayas presentó un perfil de genotipos un tanto diferente en sus 102 pacientes positivas al virus, aunque el VPH 58 (87,25 %, 89/102) siguió siendo el genotipo más frecuente, aparecieron también, entre los más identificados: VPH 70 (47,05 %, 48/102), 16 (45,09 %, 46/102), 53 (31,37 %, 32/102) y 35 (27,45 %, 28/102). En esta provincia se evidenció como se incrementaron los porcentajes de los tipos 16 y 70. La provincia de Los Ríos presentó prácticamente el mismo patrón de circulación de genotipos que la provincia del Guayas. En Los Ríos, de las 29 mujeres infectadas con VPH, el tipo 58 se detectó en 25 (86,20 %), el 70 en 18 mujeres (62,06 %), el VPH 16 en 13 casos (44,82 %), el tipo 53 en 10 (34,48 %) y el genotipo 35 en 7 (24,13 %). La provincia de Manabí, con 65 pacientes positivas, mostró una distribución de genotipos similar a las provincias de El Oro y Esmeraldas, aunque el VPH 53 no fue el segundo en frecuencia, sino el tipo 33, siguiendo esta secuencia: VPH 58 (70,76 %, 46/65), VPH 33 (60,00 %, 39/65), VPH 56 (41,53 %, 27/65), VPH 53 (36,92 %, 24/65) y VPH 35 (35,38 %, 23/65). Finalmente, la provincia de Santa Elena, dentro de 21 sus casos positivos, siguió un patrón similar al de Manabí, VPH 58 (95,23 %, 20/21), VPH 33 (52,38 %, 11/21), VPH 35 (47,61 %, 10/21), VPH 16 (33,33 %, 7/21).

En la presente investigación el patrón de circulación de genotipos fue similar en todas las provincias, pues el VPH 58 fue el más frecuente. Sin embargo, estos resultados no coinciden con un estudio realizado en el 2009, en la provincia de Santa Elena, donde se demostró una alta circulación del VPH en mujeres (24,2 %), detectándose un mayor porcentaje de los genotipos de VPH-AR (16, 52, 58, 59) y los VPH-BR (62, 71, 72 y 83) (106). Es posible que estas discrepancias se deban a que en dicho estudio se incluyó un menor número de casos y pudo no ser representativo de la población. Aunque, por otra parte, en 2017, Dalgo Aguilar y cols., realizaron un análisis similar en un grupo de 431 mujeres del sur de Ecuador, quienes fueron seleccionadas por los resultados positivos de la citología. Dichas mujeres pertenecían a las provincias de Loja, Zamora y El Oro. En ellas se identificaron mayoritariamente genotipos oncogénicos de VPH. Predominaron los tipos 16 en las diagnosticadas con HSIL y 18 en las ASC-US, en las cuales se identificó el VPH 16 en el 62,5 % y VPH 18 en el 32,9 % de los casos, respectivamente (25). Como se evidencia, solo la provincia de El Oro pertenecía a la región Litoral, por lo que el presente trabajo es el primero que incluye seis de las siete provincias de la

región de la costa, y pudiera reflejar de manera más homogénea las características de la población femenina con lesiones citológicas, así como los patrones de circulación del VPH.

En el trabajo realizado por Carrión y cols., en mujeres del Cañar, se evidenció un panorama similar, pues en los asentamientos urbano y rural del Cantón circulaba de manera más frecuente el VPH 31, aun cuando las mujeres tenían estilos de vida y culturales diferentes, evidenciándose un patrón de circulación viral muy particular para las mujeres de dicha región (40).

En relación a la citología (Tabla 10), en las muestras con lesiones tipo ASC-US predominó el genotipo 58. Las lesiones con citología LSIL exhibieron una alta de frecuencia de los tipos: 58, 33, 53, 35 y 61. La citología HSIL presentó una importante presencia de los genotipos, 58, 70, 16, 53 y VPH 35. En las muestras con CaCU, se observó el predominio de los genotipos, 58, 16, 70, 31 y 53. Como se evidencia en la Tabla 10, el VPH 58 fue el más frecuente en todos los tipos de lesiones citológicas. Sin embargo, cuando se comparó la frecuencia de aparición del VPH 16, se observó que se incrementaba en las HSIL y en los casos con CaCU.

Es significativa la frecuencia elevada del VPH 58 en esta población, mientras el VPH 16 es el segundo más común en los casos con CaCU. El VPH 70, que mostró ser el segundo más frecuente en las provincias de Guayas y Los Ríos, estuvo presente fundamentalmente en los casos con HSIL y CaCU. Está más que demostrada la asociación de los VPH 16 y 18 con el CaCU (25), sin embargo, los genotipos detectados en mayor proporción en las lesiones precursoras y el CaCU sugieren su posible implicación en la evolución y desarrollo de esta neoplasia en la población objeto de estudio.

#### **IV.2.4. Frecuencia de infecciones múltiples por VPH**

En la presente investigación se detectó la presencia de infecciones múltiples, es decir con más de dos genotipos de VPH, en 276 (92,00 %) de las 300 muestras infectadas. Se encontraron hasta 13 genotipos diferentes de VPH en una paciente, resultando la combinación de tres genotipos (22,46 %, 62/276) la más frecuente, entre las combinaciones observadas.

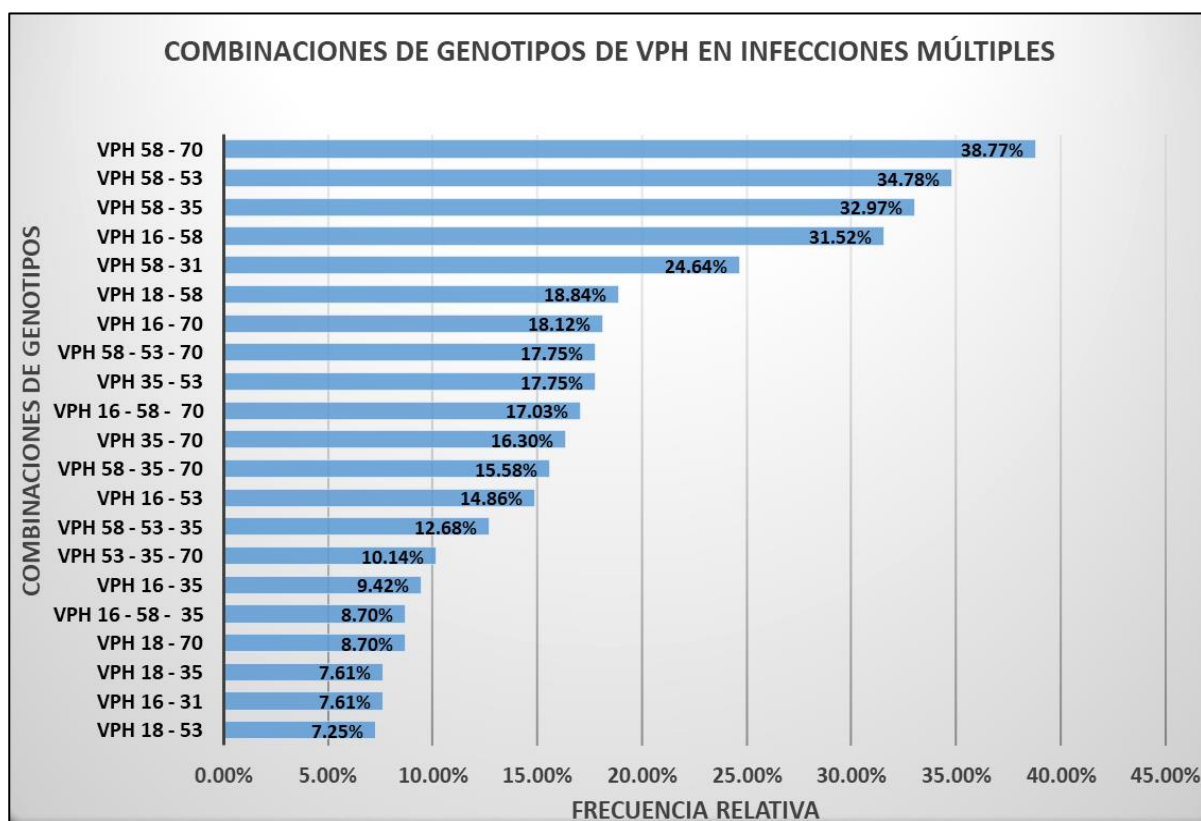
En la Figura 11 se representan las frecuencias de infecciones múltiples, específicamente las combinaciones particulares de coinfecciones con dos genotipos de VPH en las mujeres estudiadas.

**Tabla 10.** Distribución de frecuencias de genotipos de VPH de acuerdo con la lesión cervicouterina en la población de estudio que incluyó mujeres con edad mayor o igual a 30 años, con lesiones citológicas y CaCU, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

GENOTIPOS	ASC-US N=67		LSIL N=88		HSIL N=122		CaCU N=23	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>VPH 6</b>	4	5,97	9	10,23	15	12,3	7	30,43
<b>VPH 11</b>	6	8,96	13	14,77	10	8,2	0	0,00
<b>VPH 16</b>	15	22,39	14	15,91	<b>54</b>	<b>44,3</b>	<b>16</b>	<b>69,57</b>
<b>VPH 18</b>	14	20,90	17	19,32	21	17,2	5	21,74
<b>VPH 31</b>	17	25,37	23	26,14	25	20,5	10	43,48
<b>VPH 33</b>	21	31,34	42	47,73	23	18,9	2	8,70
<b>VPH 35</b>	27	40,30	33	37,50	37	30,3	3	13,04
<b>VPH 39</b>	2	2,99	5	5,68	4	3,3	1	4,35
<b>VPH 40</b>	1	1,49	0	0,00	1	0,8	1	4,35
<b>VPH 42</b>	3	4,48	12	13,64	13	10,7	3	13,04
<b>VPH 43</b>	6	8,96	8	9,09	7	5,7	1	4,35
<b>VPH 44</b>	1	1,49	5	5,68	5	4,1	0	0,00
<b>VPH 45</b>	1	1,49	2	2,27	1	0,8	0	0,00
<b>VPH 51</b>	5	7,46	9	10,23	4	3,3	2	8,70
<b>VPH 52</b>	3	4,48	10	11,36	15	12,3	2	8,70
<b>VPH 53</b>	25	37,31	38	43,18	39	32,0	10	43,48
<b>VPH 54</b>	5	7,46	3	3,41	4	3,3	1	4,35
<b>VPH 56</b>	7	10,45	22	25,00	13	10,7	3	13,04
<b>VPH 58</b>	<b>55</b>	<b>82,09</b>	<b>67</b>	<b>76,14</b>	<b>101</b>	<b>82,8</b>	<b>21</b>	<b>91,30</b>
<b>VPH 59</b>	5	7,46	12	13,64	3	2,5	2	8,70
<b>VPH 61</b>	11	16,42	29	32,95	15	12,3	1	4,35
<b>VPH 63</b>	0	0,00	1	1,14	0	0,0	0	0,00
<b>VPH 66</b>	4	5,97	1	1,14	4	3,3	1	4,35
<b>VPH 68</b>	3	4,48	6	6,82	8	6,6	2	8,70
<b>VPH 69</b>	17	25,37	28	31,82	17	13,9	3	13,04
<b>VPH 70</b>	22	32,84	25	28,41	<b>58</b>	<b>47,5</b>	<b>11</b>	<b>47,83</b>
<b>VPH 73</b>	6	8,96	8	9,09	2	1,6	2	8,70
<b>VPH 82</b>	0	0,00	1	1,14	4	3,3	1	4,35

**Fuente:** Resultados de la investigación. En negrita se destacan los genotipos de VPH con mayores frecuencias de infección, de acuerdo a los resultados obtenidos para cada una de las lesiones citológicas. VPH 16 y VPH 70 fueron los más frecuentes en HSIL y CaCU, mientras que VPH 58 fue el más frecuente en todas las lesiones.





**Figura 11.** Frecuencia relativa de combinaciones de genotipos de VPH en las infecciones múltiples detectadas en población femenina mayor de 30 años, con lesiones cervicouterinas, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

Las frecuencias altas del VPH 58 y VPH 16 se reflejaron en las combinaciones de genotipos más comunes en las infecciones múltiples, las cuales fueron, 58/70 (38,77 %; 107/276), 58/53 (34,78 %; 96/276), 58/35 (32,97 %; 91/276), 16/58 (31,52 %; 87/276), 58/31 (24,64 %; 68/276), 18/58 (18,84 %; 52/276), 16/70 (18,12 %; 50/276), 58/53/70 (17,75 %; 49/276), 35/53 (17,75 %; 49/276), 16/58/70 (17,03 %; 47/276), 35/70 (16,3 %; 45/276), 58/35/70 (15,58 %; 43/276), 16/53 (14,86 %; 41/276), 58/53/35 (12,68 %; 35/276), 53/35/70 (10,14 %; 28/276), 16/35 (9,42 %; 26/276), 16/58/35 (8,70 %; 24/276), 18/70 (8,70 %; 24/276), 18/35 (7,61 %; 21/276), 16/31 (7,61 %; 21/276), 18/53 (7,25 %; 20/276), (Figura 11). Las combinaciones donde estuvo presente el VPH 58 o el VPH 16 se identificaron en más del 80 % de los casos con HSIL y en más del 90 % de los con CaCU.

Como ya se ha planteado en numerosos estudios, las infecciones múltiples suelen ser muy comunes, especialmente en las mujeres más jóvenes, en el pico de su actividad sexual (190-192). Aspecto que se ha evidenciado en investigaciones con métodos de genotipado amplio, lo cual

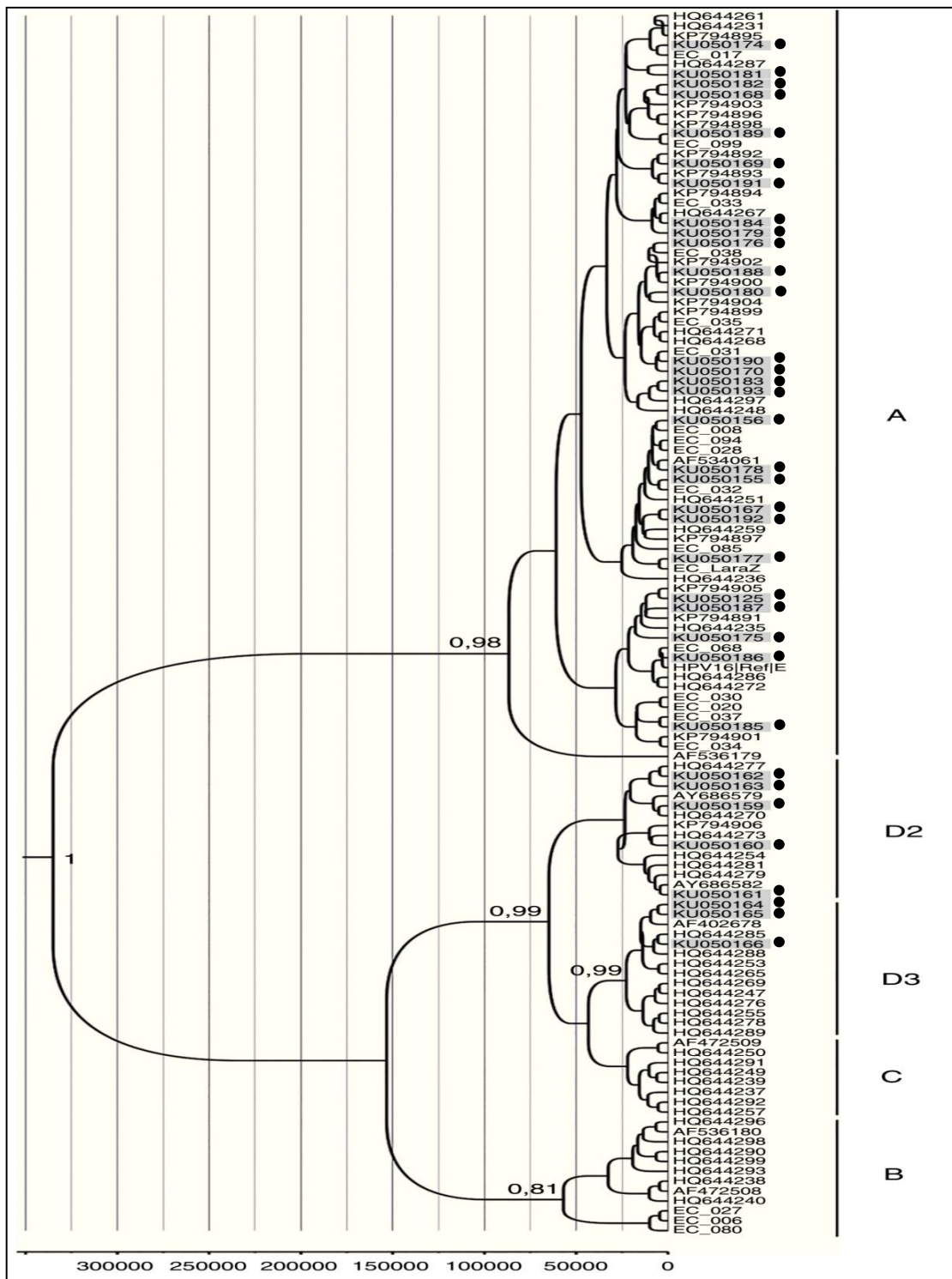
dificulta conocer la contribución de los genotipos individuales a los diferentes estadios de las lesiones precursoras del cáncer cervical. Esta dificultad se ha abordado por algunos investigadores, atribuyendo la contribución de cada genotipo o combinaciones de genotipos específicos, al desarrollo de las lesiones de forma jerárquica, basándose en la prevalencia definida para cada genotipo en el CaCU. Wentzensen y cols., detectaron una amplia gama de genotipos presentes en cada tipo de lesión citológica y su potencial contribución a cada una de las etapas del CaCU. De esta manera 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 (193). 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 (193). Sin embargo, a la luz de las investigaciones más recientes, las consecuencias e implicaciones biológicas de las infecciones múltiples todavía son debatidas y no concluyentes. Cada una de las teorías propuestas para esclarecer el efecto biológico de las coinfecciones por VPH en las células cervicales, se sustenta en evidencias de estudios poblacionales. Sin embargo, no existen investigaciones básicas que demuestren, desde el punto de vista molecular y celular, las hipótesis propuestas por un sinnúmero de investigadores (193-196).

### **IV.3. Relaciones filogenéticas y polimorfismos de los genotipos del Virus de Papiloma Humano tipos 16 y 58 detectados en la población estudiada**

#### **IV.3.1. Análisis filogenético de coalescencia para la región L1 amplificada con iniciadores universales MY09/MY11 de VPH 16 y VPH 58**

##### **IV.3.1.1. Análisis filogenético de coalescencia de la región L1 de VPH 16**

En la primera parte del estudio, se realizó el análisis filogenético a partir de la región del gen L1 de VPH 16 amplificada por los iniciadores universales MY09/MY11. Con este propósito se editaron un total de 35 secuencias de calidad obtenidas en el presente estudio para dicho genotipo (>400 pb) (Figura 12).



**Figura 12.** Árbol filogenético e historia evolutiva de VPH 16 a partir de la región MY09/MY11 del gen L1. Se utilizó el análisis bayesiano basado en la cadena de Monte Carlo Markov (MCMC) implementado en el programa BEAST versión 1.8.3. El modelo evolutivo seleccionado fue TPM1uf: Kimura 81 con frecuencias de base desiguales. Se muestra el árbol de máxima credibilidad del clado, donde el eje X indica años atrás. Los valores de probabilidad posterior se muestran junto a las ramas ( $p=0,89$ ). Las secuencias con círculos negros corresponden al presente estudio, el resto son secuencias ecuatorianas publicadas por Mejía y cols., en 2016 (108) y secuencias de referencia publicadas por Burk y cols. 2013 (57).

El análisis filogenético de los aislados de VPH 16 en la región L1, mostró que el 77,14 % (27/35) de las secuencias, se agruparon con el linaje A y el 22,86 % (8/35) con el linaje D. Entre los aislados del linaje D (8), las variantes de VPH 16 pertenecieron a los sub-linajes D2 y D3, con 62,50 % (5/8) y 37,50 % (3/8), respectivamente. No fue posible la diferenciación de los diferentes sublinajes que conforman el linaje A, ya que el árbol obtenido no fue lo suficientemente resolutivo debido al tamaño y la composición de las secuencias incluidas en el estudio.

Las estimaciones medias para tMCRA, con un valor posterior  $> 0,8$  fueron las siguientes: VPH 16 raíz = 339 353 (HPD 95 % = 111 788 - 670 346); VPH 16 D3 = 27 046 (HPD 95 % = 5 323 - 52 590); VPH 16 D2 = 27 817 (HPD 95 % = 6 198 - 55 704); VPH 16 A = 91 052 (HPD 95 % = 19 529 - 230 565), donde HPD (del inglés, *high posterior density*) es el intervalo de tiempo para la ocurrencia del evento con una probabilidad del 95 % (Figura 12).

La proporción de variantes del linaje D del VPH 16 obtenida en la presente investigación (22,86 %), fue más elevada si se compara con la reportada en otros países sudamericanos como Paraguay (15 %) y Argentina (10 %), pero más cercana a la reportada para el país fronterizo de Colombia (33 %) (197-199). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la composición étnica de las poblaciones estudiadas, aunque también con los patrones migratorios entre países, destacando así la gran afluencia de colombianos y peruanos a Ecuador durante las últimas décadas (200, 201).

Para evaluar el origen de la patogenia del VPH 16, Chen y cols., en 2018 estimaron la filogenia, el momento y la dispersión de las variantes del VPH 16. Para aumentar la precisión, identificaron y caracterizaron secuencias de virus del papiloma de primates no humanos ancestrales y modernos para establecer modelos de reloj molecular. Los autores demostraron la adaptación específica de los virus del papiloma de primates al nicho del hospedero con la subsiguiente coevolución con sus hospederos primates durante al menos 40 millones de años. Los análisis de 212 genomas completos de VPH 16 y 3582 secuencias parciales estimaron la divergencia ancestral de las variantes de VPH 16 (entre los linajes A y BCD) de sus ancestros comunes más recientes hace aproximadamente medio millón de años. Este marco de tiempo coincide aproximadamente con el momento de la división entre los neandertales antiguos y el *Homo sapiens* moderno, y es casi tres veces mayor que los tiempos de divergencia del *Homo sapiens* moderno. Los resultados evidenciaron que las variantes del linaje A del VPH 16 están

significativamente sub-representadas en las poblaciones africanas actuales, mientras que los sublinajes A son muy prevalentes en las poblaciones europeas (A1-3) y asiáticas (A4). Esto indica una transmisión sexual del virus de los neandertales a los humanos modernos no africanos, a través de múltiples eventos de entrecruzamiento durante los últimos 80 mil años. Es de gran relevancia desde el punto de vista clínico, que los alelos del antígeno leucocitario humano B 07:02 y C 07:02, asociados con un mayor riesgo de CaCU representan regiones de introgresión de los neandertales en los euroasiáticos actuales. La adaptación al nicho y la co-divergencia virus-hospedero parecen influir en la patogenia de los VPH (68).

El reloj molecular de los linajes de VPH 16 en el presente trabajo, puede permitirnos formular hipótesis sobre la circulación de esos linajes en Ecuador. En este estudio, todas las variantes divergieron de sus ancestros comunes en el último millón de años (media para VPH 16 = 339 353 años/pb), pero el tiempo de aparición de algunos sublinajes (como las variantes más oncogénicas de VPH 16, D2 y D3) es un evento más reciente, estimado en hace casi 28 000 años. Durante ese tiempo, la mayoría de las poblaciones humanas estaban completamente establecidas geográficamente en la tierra, y por lo tanto, esas fechas de surgimiento pueden explicar los patrones etnogeográficos asociados con las poblaciones amerindias (202).

En este escenario, los patrones actuales de infección por VPH 16 pudieran ser el resultado de una combinación de eventos de dispersión (migración y efectos fundadores) y coevolución viral con humanos. En Ecuador, la mezcla genética medida con *loci* autosómicos es aproximadamente 73 % nativo americano, 19 % europeo y 8 % africano, mientras que la medida a nivel del cromosoma Y es 70 % europeo, 28 % amerindio y 2 % africano (203). Por lo tanto, es posible que las proporciones descritas de infecciones con variantes de VPH 16 reflejen el lado paterno del proceso de mestizaje durante la conquista, que frecuentemente involucró a hombres europeos y mujeres amerindias.

Por otra parte, las evidencias científicas sugieren que las variantes del VPH 16 pueden influenciar biológica y etiológicamente en el desarrollo del CaCU. Desde un punto de vista clínico, se sabe que las variantes del linaje D están asociadas con un mayor riesgo de infección persistente y con la aparición de lesiones cervicales en mujeres latinoamericanas y en otras regiones del mundo (57, 197, 204).

En un estudio realizado por da Silva y cols., analizaron muestras de tejido cervical de 120 mujeres del noreste de Brasil, con CaCU. Se identificaron 47 casos positivos a VPH 16, de ellos

la variante A estuvo presente en 23 muestras (49 %), seguida de la variante D en 20 casos (43 %) y las variantes B y C en dos casos, cada una (4 %). El tipo histológico más prevalente de tumores positivos a VPH 16 fue el carcinoma de células escamosas, donde predominaron las variantes europeas A, seguido del adenocarcinoma, donde fueron más frecuentes las variantes no europeas D. Además, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre las variantes del linaje D del VPH 16 con los adenocarcinomas, tipo histológico más agresivo ( $p < 0,001$ ) (36).

Por su parte Mane y cols., en 2020 investigaron muestras cervicales de mujeres de la India y encontraron un predominio del linaje A (A1-A4, 84,96 %) entre los aislados, mientras que el sublinaje D3 mostró asociación significativa con lesiones cervicales de alto grado. Las sustituciones nucleotídicas identificadas se mapearon en una estructura tridimensional y revelaron que 11 sustituciones eran parte de epítomos de células B y T validados experimentalmente, y podían afectar la eficacia de las vacunas comerciales de primera generación contra el VPH. Las variantes identificadas a través de dicho estudio tienen el potencial de servir como guías de traducción para diseñar sondas moleculares para el diagnóstico y vacunas eficaces en el contexto de la población de estudio (205).

En el Ecuador, la información sobre la circulación de las variantes genéticas del VPH es heterogénea, parcial y representa únicamente realidades locales, sin considerar el contexto nacional.

Mejía y cols., en 2016 estudiaron la prevalencia de tipos de VPH en 164 mujeres ecuatorianas con lesiones premalignas y CaCU e identificaron como los genotipos más comunes al VPH 16 (41,8%) y al VPH 58 (30,5%), pero el VPH 18 se detectó solo en el 2,8 % de las muestras positivas. De las muestras positivas al VPH 16, la mayoría pertenecía al linaje europeo, considerado uno de los linajes con menor potencial carcinogénico, y solo una muestra pertenecía al linaje no europeo (asiático-americano). El análisis similar pero en las muestras positivas de VPH 58 mostró que el 83,3 % de las secuencias pertenecían al sublinaje A2, linaje de VPH 58 más antiguo, solo una muestra pertenecía al linaje A3 y otra al linaje C (108). Hasta el momento en que se realizó la presente investigación, el estudio de Mejía era el más amplio e informativo sobre el patrón de circulación de variantes genéticas de VPH 16 y 58 en el Ecuador.

#### IV.3.1.2. Análisis filogenético de coalescencia de la región L1 de VPH 58

En la segunda parte del estudio se realizó el análisis filogenético a partir de la región del gen L1 de VPH 58 amplificada por los iniciadores universales MY09/MY11. Con este propósito se editaron un total de 15 secuencias nucleotídicas de las muestras positivas a este genotipo en la presente investigación, ya que tuvieron la calidad y talla adecuadas para el análisis de filogenia (>400 pb), (Figura 13).

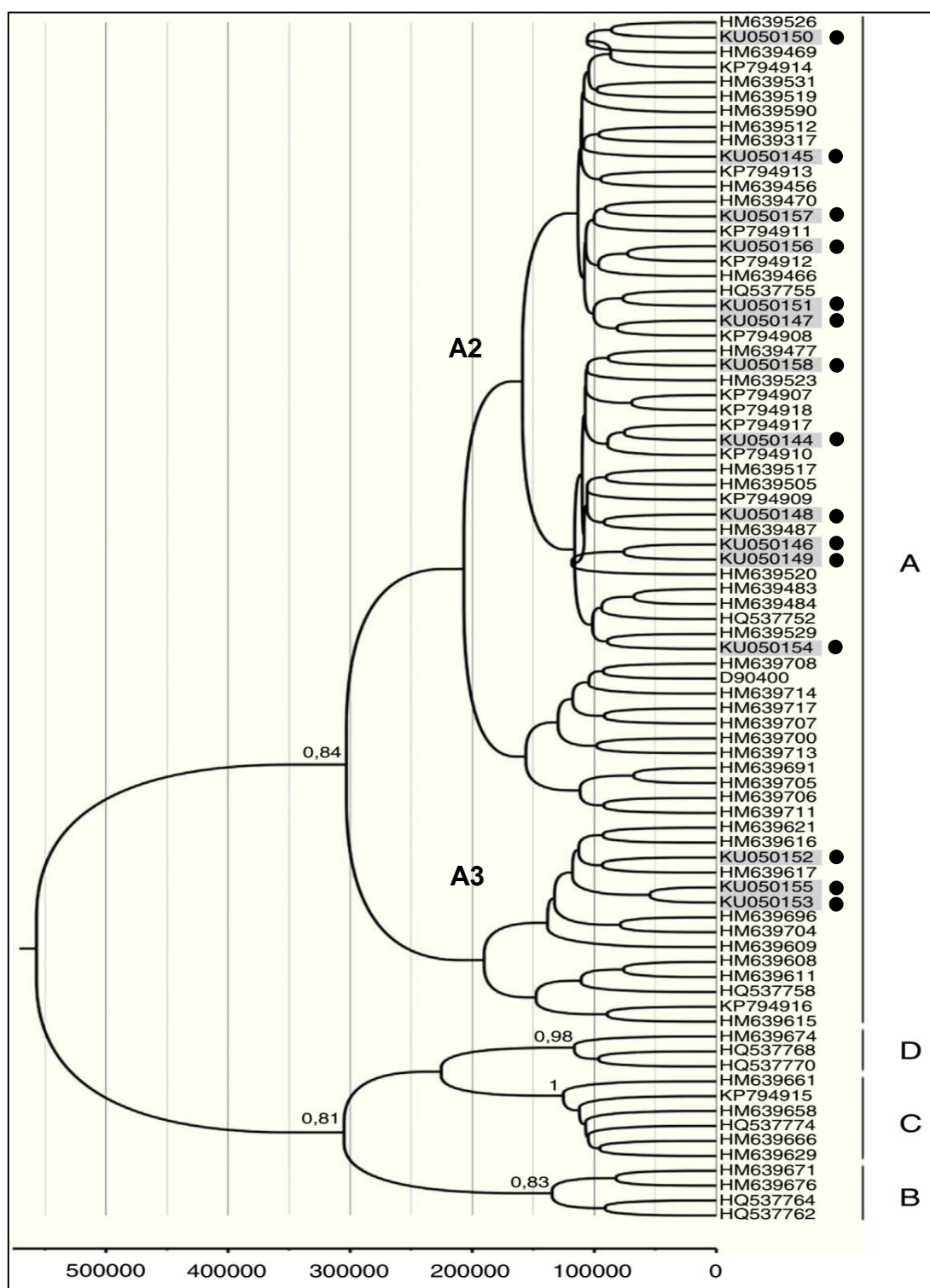
Las estimaciones medias para el tMCRA, con un valor posterior > 0,8 fueron las siguientes: VPH 58 raíz = 576 059 (HPD 95 % = 245 533 - 1 016 441); VPH 58 A = 322 257 (HPD 95 % = 139 260 - 562 715); VPH 58 B = 153 664 (HPD 95 % = 61 227 - 265 684); VPH 58 C = 144 449 (HPD 95 % = 65 850 - 216 097); VPH 58 D = 135 470 (HPD 95 % = 57 266 - 207 732), donde HPD (del inglés, *high posterior density*) es el intervalo de tiempo para la ocurrencia del evento con una probabilidad del 95 % (Figura 13).

Como muestra el árbol filogenético, todas las secuencias de VPH 58 pertenecieron al linaje A, sub-linajes A2 con 80,00 % (12/15) y A3 con 20,00 % (3/15). El linaje A3 se reporta con mayor potencial oncogénico que otros linajes, y es frecuente en Asia (34 %) y en América (11 %), pero representa menos del 5 % en Europa y África (206).

En el presente trabajo, para VPH 58 todas las variantes divergieron de sus ancestros comunes en el último millón de años (media para VPH 58 = 576 059 años/pb).

Contrariamente a lo que se encontró para VPH 16, en el caso de VPH 58, la divergencia de cada sublinaje se pudo estimar en un marco de tiempo anterior a la fecha en que los ancestros de los humanos modernos se expandieron fuera de África (>100 000 años/pb).

Las estimaciones realizadas en esta investigación coinciden con las publicadas por Marin y cols., para VPH 58 en Argentina. Los autores describieron las variantes genómicas de HPV 58 y caracterizaron el origen de este genotipo y su diversificación como eventos muy antiguos en el contexto filodinámico de la especie alfa-9 de los VPH. Un análisis más profundo del tipo VPH 58 indicó que su diversificación podría haber comenzado hace aproximadamente 0,54 o 0,11 millones de años, mientras que el tMRCA para el linaje A se estimó hace aproximadamente 300 000 años. Además, la diversificación de los grupos principales dentro del linaje A (sublinajes A1-A3) podría haber comenzado hace 200 000 años (207).



**Figura 13.** Árbol filogenético e historia evolutiva de VPH 58 a partir de la región MY09/MY11 del gen L1. Se utilizó el análisis bayesiano basado en la cadena de Monte Carlo Markov (MCMC) implementado en el programa BEAST versión 1.8.3. El modelo evolutivo seleccionado fue TPM1uf: Kimura 81 con frecuencias de base desiguales. Se muestra el árbol de máxima credibilidad del clado, donde el eje X indica años atrás. Los valores de probabilidad posterior se muestran junto a las ramas ( $p=0,89$ ). Las secuencias sombreadas y con círculos negros corresponden al presente estudio, el resto son secuencias de referencia publicadas por Burk y cols., 2013 (57).



La compleja historia evolutiva de las variantes de VPH 58 explica la heterogeneidad del potencial oncogénico y la distribución geográfica de los linajes y sublinajes de este genotipo. Según un trabajo publicado por Chen y cols., en 2017, se estimó que la división inicial de las variantes de VPH 58 ocurrió hace 478 600 años. Este tiempo de divergencia está dentro de la era de la especiación entre el *Homo sapiens* y los neandertales/denisovanos, y es alrededor de tres veces mayor que el tiempo de divergencia del *Homo sapiens* moderno. La expansión de las variantes actuales en Eurasia podría ser la consecuencia de la transmisión viral de los neandertales/denisovanos a las poblaciones humanas modernas no africanas, a través del flujo de genes. El análisis filogenético del genoma completo de VPH 58 identificó tres cambios de aminoácidos, 16 cambios de nucleótidos sinónimos y una inserción de 12 pb fuertemente asociada con la variante E7 T20I/G63S, que representa el sublinaje A3 y tiene un mayor potencial carcinogénico. En comparación con los genes que codifican para las proteínas de la cápside L1 y L2, los oncogenes E7 y E6 mostraron tasas de sustitución aumentadas, lo que indicaba una mayor presión de selección (70).

Según estas evidencias, los patrones actuales de infección viral pudieran ser el resultado de los principales eventos de dispersión, más que de la coevolución viral con esas poblaciones. El hecho de que el árbol de VPH 58 no refleje la evolución humana en la medida que sí lo muestra el de VPH 16, también se ha observado previamente por otros autores (208-210), pero hasta donde conoce el autor del presente trabajo, esta es la primera vez que se establece un marco de tiempo donde se proporciona esa observación en el Ecuador, de ahí la novedad de este trabajo y la particularidad del patrón de circulación de VPH 58.

Un estudio realizado en 2021 analizó la circulación de variantes del VPH 58 que presentaban un mayor riesgo de CaCU en mujeres del este de China. El linaje A3 de VPH 58, se asoció estadísticamente a los casos con CaCU. Se identificaron además, genes marcadores y posiciones de nucleótidos distintivos que podrían facilitar los diagnósticos moleculares de manera costo efectiva para las variantes de este genotipo, en entornos clínicos donde se evalúa el riesgo de progresión carcinogénica de las lesiones cervicales. El estudio concluyó que el VPH 58, en particular la variante A3, requiere una vigilancia continua en esta región (211).

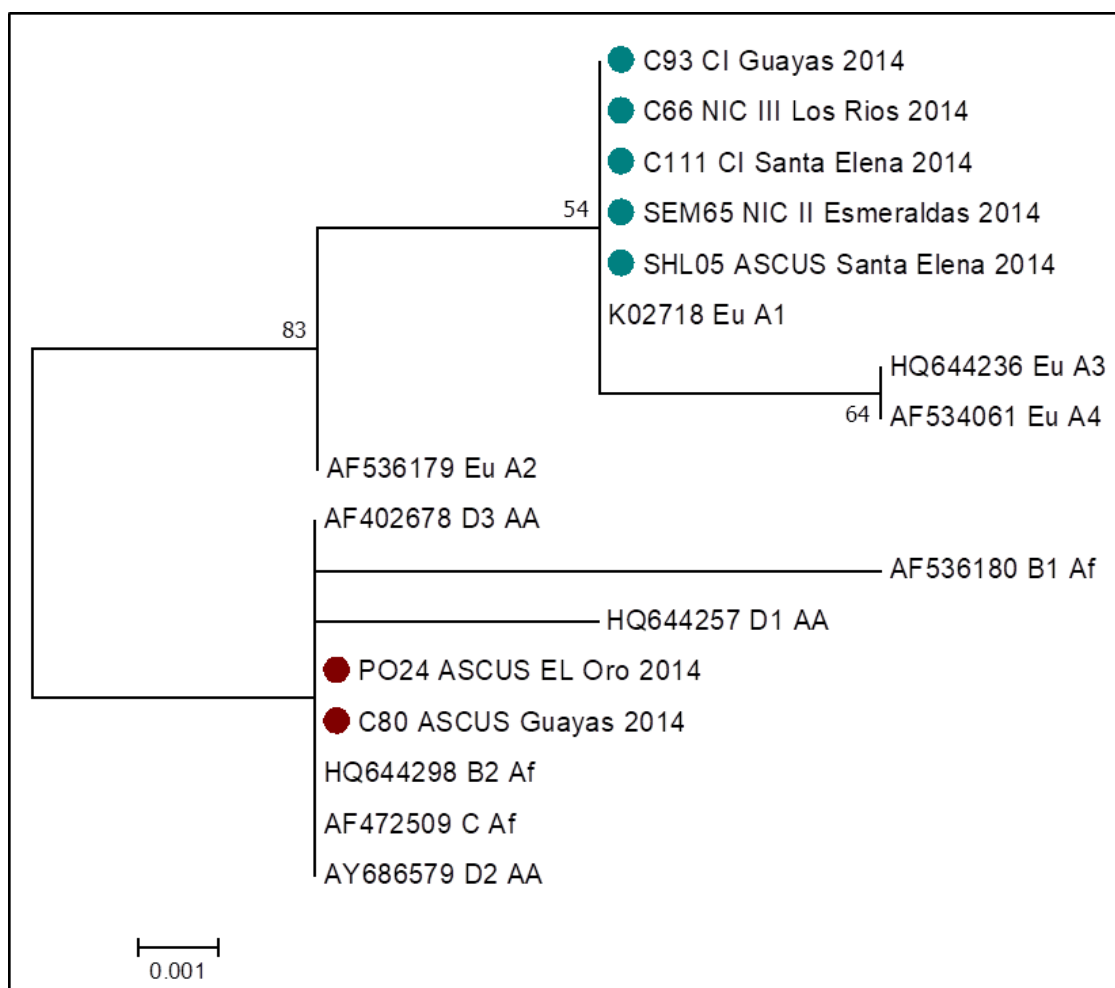
#### **IV.3.2. Análisis filogenético de máxima verosimilitud para las regiones L1, E6, E7 y LCR de VPH 16 amplificadas con iniciadores específicos**

En la segunda parte del estudio filogenético para VPH 16, se emplearon iniciadores específicos para amplificar las regiones L1 (dos fragmentos), E6 y E7 (un fragmento de cada gen) y LCR (dos fragmentos). Este análisis de regiones específicas del genoma de VPH 16 permitió confirmar la presencia de variantes genéticas y polimorfismos en las muestras analizadas.

La región L1 se analizó mediante dos juegos diferentes de iniciadores (L1-16-1F/ L1-16-1R y F6835L/R7764L) y se amplificaron 7 muestras que proporcionaron secuencias nucleotídicas de calidad para el análisis filogenético. El primer par de iniciadores generó un amplicón de 674 pb (L1a). De las 7 muestras analizadas, 5 (71,43 %) pertenecieron al linaje europeo (A), y correspondieron predominantemente a lesiones cervicales de alto grado y CaCU, mientras que las otras 2 (28,57 %), pertenecieron al linaje no europeo (D), y se correspondieron con lesiones cervicales de tipo ASC-US, (Figura 14).

Con el segundo par de iniciadores para la región L1, se generó un producto de 287 pb (L1b). Se analizaron secuencias de calidad de 13 muestras, y de ellas, 9 pertenecieron al linaje europeo (A), para un 69,23 %. El resto de las secuencias (4/13), correspondieron al linaje no europeo (D) (30,77 %). Las secuencias se correspondieron en su mayoría con muestras provenientes de lesiones de alto grado y CaCU (Figura 15). Se identificó un patrón de distribución de variantes similar al de los análisis filogenéticos anteriores (Figura 12 y 14).

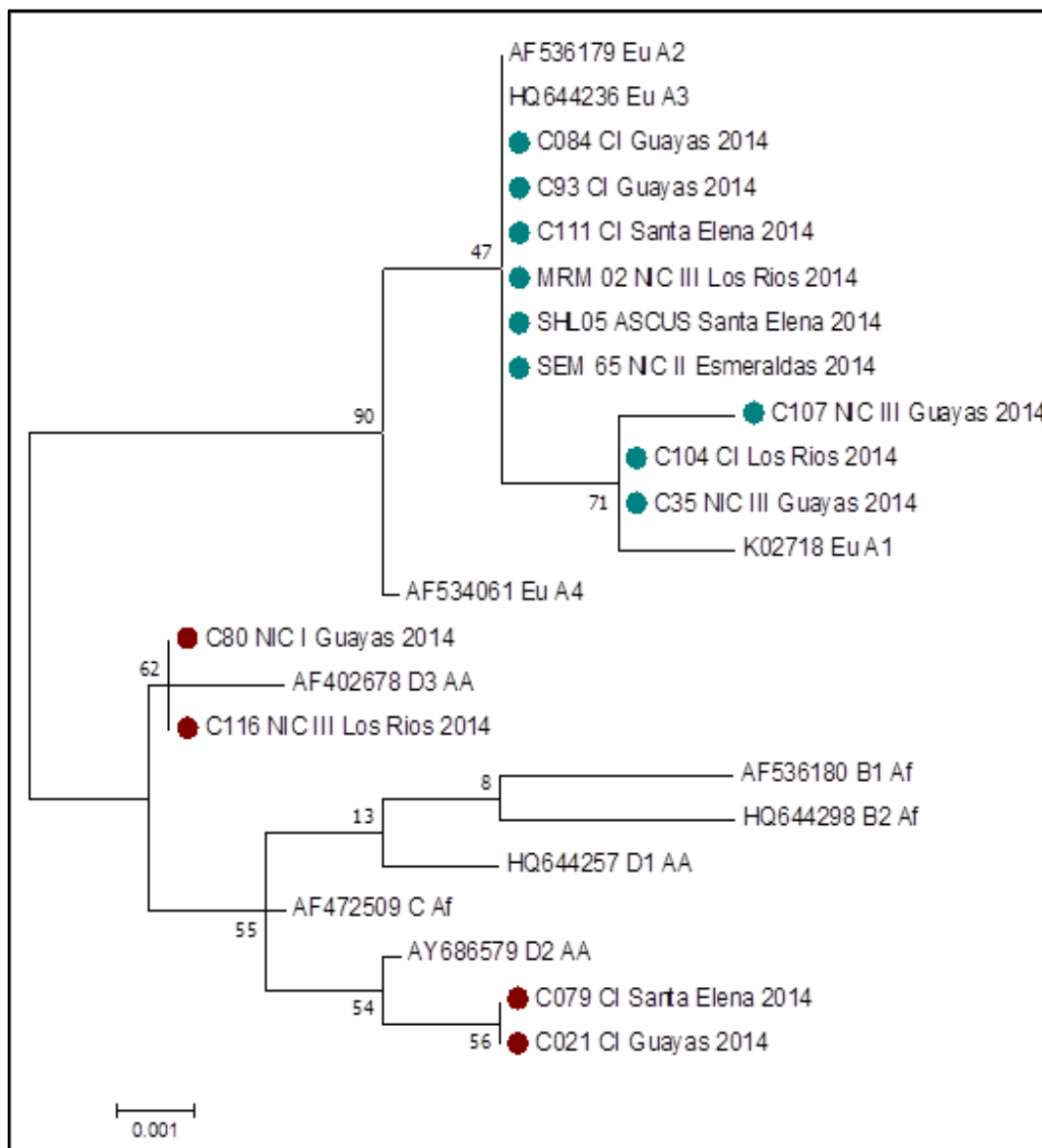
Los estudios realizados para evaluar la variabilidad intratípica de la región L1 y de la región E6 demuestran que existe una diferencia en la distribución de estas variantes entre las áreas geográficas del mundo y entre los diferentes grupos étnicos (212). Según un artículo de revisión realizado por Ramirez Pineda y cols., en 2019, esto se confirma con la tipificación de variantes genéticas en 953 muestras positivas para el VPH 16, recolectadas por la IARC en 17 países de África, Asia, Europa y Suramérica (62). En dicho análisis se encontró que las variantes europeas se distribuyen uniformemente en todas las regiones del mundo, y las variantes no europeas se han registrado fundamentalmente en Asia oriental, las Américas y las regiones africanas, respectivamente. La infección con variantes no europeas se ha asociado con un riesgo de dos a nueve veces mayor para desarrollar CaCU que las variantes europeas, especialmente en estudios llevados a cabo en Estados Unidos y Latinoamérica (62).



**Figura 14.** Análisis Filogenético de máxima verosimilitud para la región del gen L1a (674 pb) de VPH 16 implementado en el paquete bioinformático Mega, versión X. El modelo de evolución aplicado al análisis de secuencias fue Tamura 3 parámetros + distribución Gamma 0.05. Los valores de los porcentajes de la proporción de cada réplica se muestran en los nodos. Las muestras pertenecientes al Linaje A se identifican con círculos azules y las muestras pertenecientes al Linaje D se indican en rojo.

Las características genéticas de la población pueden definir la distribución de las variantes del VPH, por lo que la composición étnica es un elemento que pudiera definir la proporción en la que se presentan dichas variantes y su asociación con lesiones de alto grado y CaCU (94, 213). El Ecuador tiene una composición étnica marcadamente mestiza (71,90, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador (INEC) y otras fuentes (84, 214). De acuerdo al trabajo publicado por Zambrano y cols., del 2019, la población mestiza del Ecuador tiene un marcado componente genético amerindio de los nativos americanos, que llega a ser hasta de un 51 %, seguido de los europeos con un 33 % y africanos con un 13 % (214). El presente estudio se realizó en la población femenina del Litoral del Ecuador, abarcando todas las provincias, cuya

población es principalmente mestiza. Esto indica que la base genética de la población del Litoral pudiera favorecer la circulación de variantes no europeas. De hecho, las investigaciones de Mirabello y cols., en 2016 y de Clifford y cols., en 2019 apuntan a que la cocirculación de las variantes europeas y no europeas en poblaciones latinoamericanas dependen de la base genética y étnica de dichas poblaciones, de modo que las variantes asiáticas podrían circular preferentemente en población con marcado componente amerindio (94, 213).



**Figura 15.** Análisis Filogenético de máxima verosimilitud para la región del gen L1b (287 pb) de VPH 16 implementado en el paquete bioinformático Mega, versión X. El modelo de evolución aplicado al análisis de secuencias fue Tamura 3 parámetros. Los valores de los porcentajes de la proporción de cada réplica se muestran en los nodos. Las muestras pertenecientes al Linaje A se identifican con círculos azules y las muestras pertenecientes al Linaje D se indican en rojo.

Esta hipótesis se respalda con una investigación realizada por Picconi y cols., en 2013 donde analizaron 106 secuencias nucleotídicas de las regiones L1 y E6 del VPH 16, en población aborigen Quechua del noroeste de Argentina. Los autores encontraron que el 10 % de las muestras estudiadas tenían variantes no europeas asiáticas. Así mismo, se refuerza esta hipótesis con los estudios realizados por Badano y cols., en 2015 en población mezclada, de amerindios y europeos de la provincia de Misiones, al norte de Argentina. Los autores encontraron la presencia de variantes no europeas, asiáticas (linaje D) en un 7 %, las cuales se asociaron estadísticamente a lesiones de alto grado y CaCU (197).

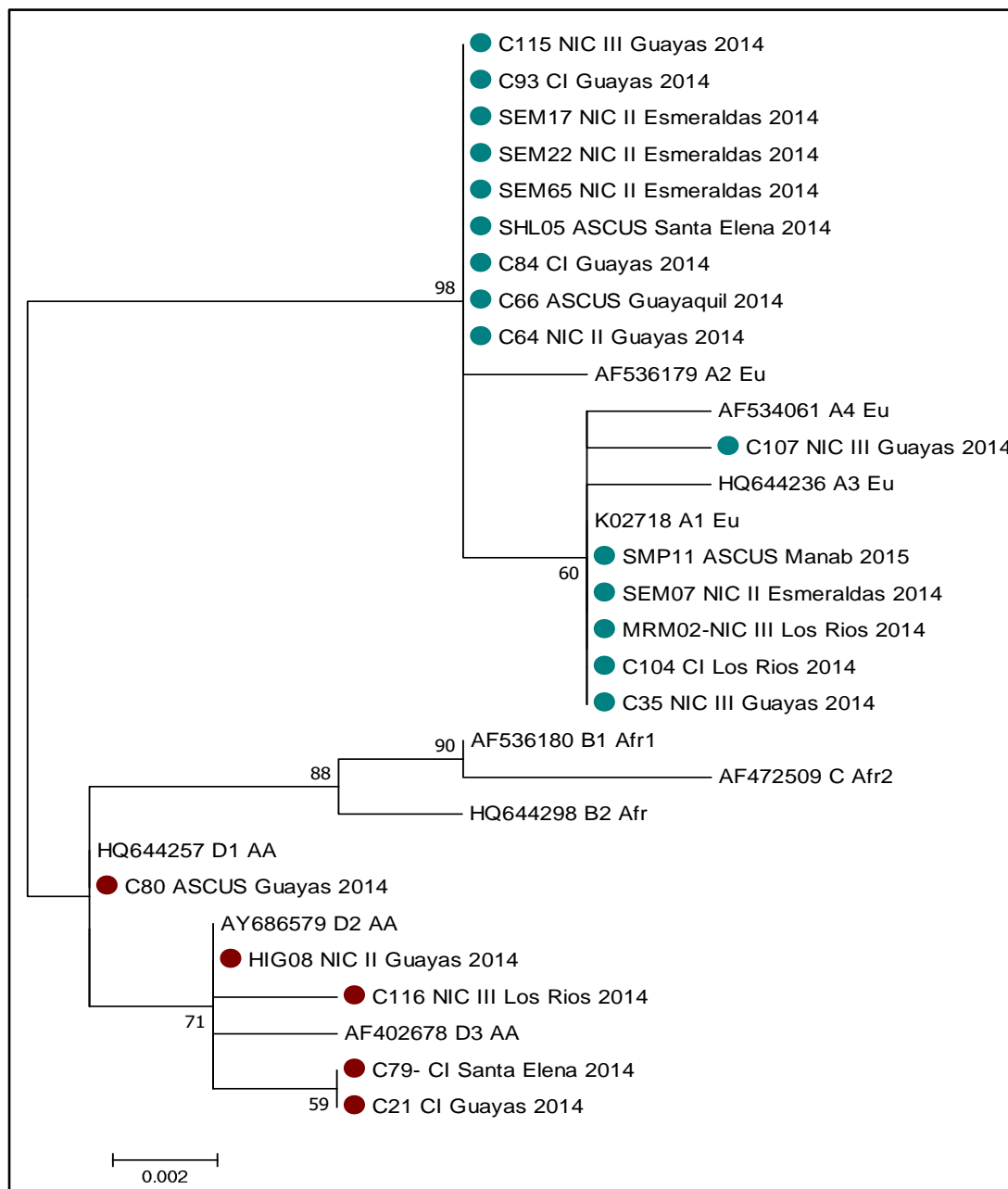
En la presente investigación, para el caso de la región E6, se generó un producto de 423 pb, se analizaron 20 secuencias de calidad. De estas, 15 (75,00 %) correspondieron al linaje europeo (A); mientras que, las 5 restantes (25,00 %) pertenecieron al linaje no europeo (D). Los dos linajes se presentaron en lesiones cervicales de alto grado, CaCU y lesiones tipo ASC-US (Figura 16).

Las poblaciones europeas presentan infección predominantemente con variantes europeas; específicamente la variación en la posición 350T en comparación con la 350G del gen E6 del VPH 16 tiene dos veces más de riesgo de persistencia. Sin embargo, los sublinajes A4, C, D2 y D3 presentan un riesgo de lesiones precancerosas y de cáncer significativamente mayor en comparación con los sublinajes A1/A2 en Estados Unidos (94).

En una investigación realizada en mujeres mexicanas del sureste del país, donde la población es mestiza y tiene un componente indígena fuerte, se analizaron 330 muestras cervicales de mujeres con lesiones y sin lesiones citológicas. Se llevó a cabo el análisis filogenético de una región parcial del gen E6 de VPH 16 y se obtuvieron 27 secuencias, donde el 17 % perteneció al linaje asiático. Estos aislados mostraron asociación estadística con un alto riesgo para el desarrollo de CaCU con OR=69,01 [IC95 757-628,96]  $p < 0,0000$  (215).

Las evidencias refuerzan el hecho de que la etnia de las pacientes tiene un papel fundamental y que aquellas mujeres cuya raza o etnia coincidía con la variante del VPH 16 tendrán un mayor riesgo de ser positivas para lesiones de mayor grado (HSIL/NIC 3) y CaCU. Por lo que se ha encontrado que las mujeres con CaCU con una mayor proporción de ascendencia europea, presentan las variantes europeas en mayor frecuencia, mientras que las mujeres con ascendencia amerindia presentan las variantes asiáticas-americanas en mayor frecuencia y con una mayor asociación al CaCU. Esta relación entre la ascendencia y la distribución de los linajes

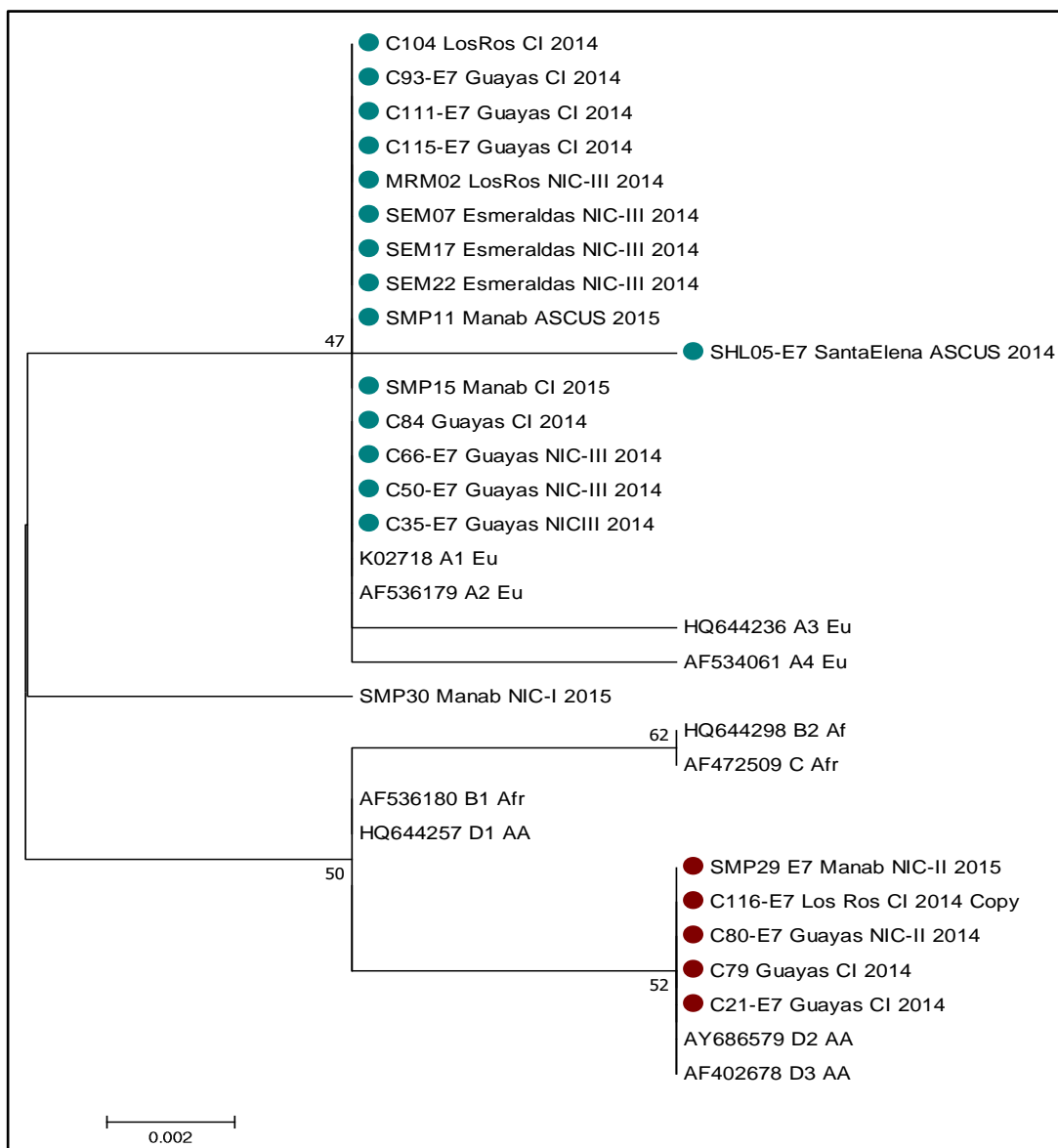
filogenéticos sugiere que la evolución concertada de la población humana y algunos de los sublinajes específicos del VPH 16, se han traducido en la potenciación de propiedades carcinogénicas virales o en la disminución de la capacidad del hospedero para controlar la infección (62, 94, 213).



**Figura 16.** Análisis Filogenético de máxima verosimilitud para la región del gen E6 (423 pb) de VPH 16 implementado en el paquete bioinformático Mega, versión X. El modelo de evolución aplicado al análisis de secuencias fue Tamura 3 parámetros. Los valores de los porcentajes de la proporción de cada réplica se muestran en los nodos. Las muestras pertenecientes al Linaje A se identifican con círculos azules y las muestras pertenecientes al Linaje D se indican en rojo.

La diferencia en la distribución geográfica de las variantes del VPH 16 probablemente esté relacionada con la historia de la población de la región particular que refleja la afluencia de europeos, poblaciones indias/nativas y personas de ascendencia africana, sugiriendo que las variantes de VPH 16 reflejan los patrones de migración humana relativamente recientes (216).

En el presente estudio, el análisis filogenético para el gen E7 generó un fragmento de 198 pb, (Figura 17). Este análisis demostró que de un total de 20 secuencias, 15 pertenecieron al linaje europeo (75,00 %) y 5 al linaje no europeo (25,00 %).



**Figura 17.** Análisis Filogenético de máxima verosimilitud para la región del gen E7 (198 pb) de VPH 16 implementado en el paquete bioinformático Mega, versión X. El modelo de evolución aplicado al análisis de secuencias fue Tamura 2 parámetros. Los valores de los porcentajes de la proporción de cada réplica se muestran en los nodos. Las muestras pertenecientes al Linaje A se identifican con círculos azules y las muestras pertenecientes al Linaje D se indican en rojo.

No se observaron lesiones de bajo grado, sino lesiones tipo ASC-US, y la mayoría fueron del linaje europeo (3/4), 75,00 %. Por otro lado, en las lesiones de alto grado se obtuvo que, de 16 muestras, 12 pertenecieron al linaje europeo (75,00 %) y 4 al no europeo (25,00 %).

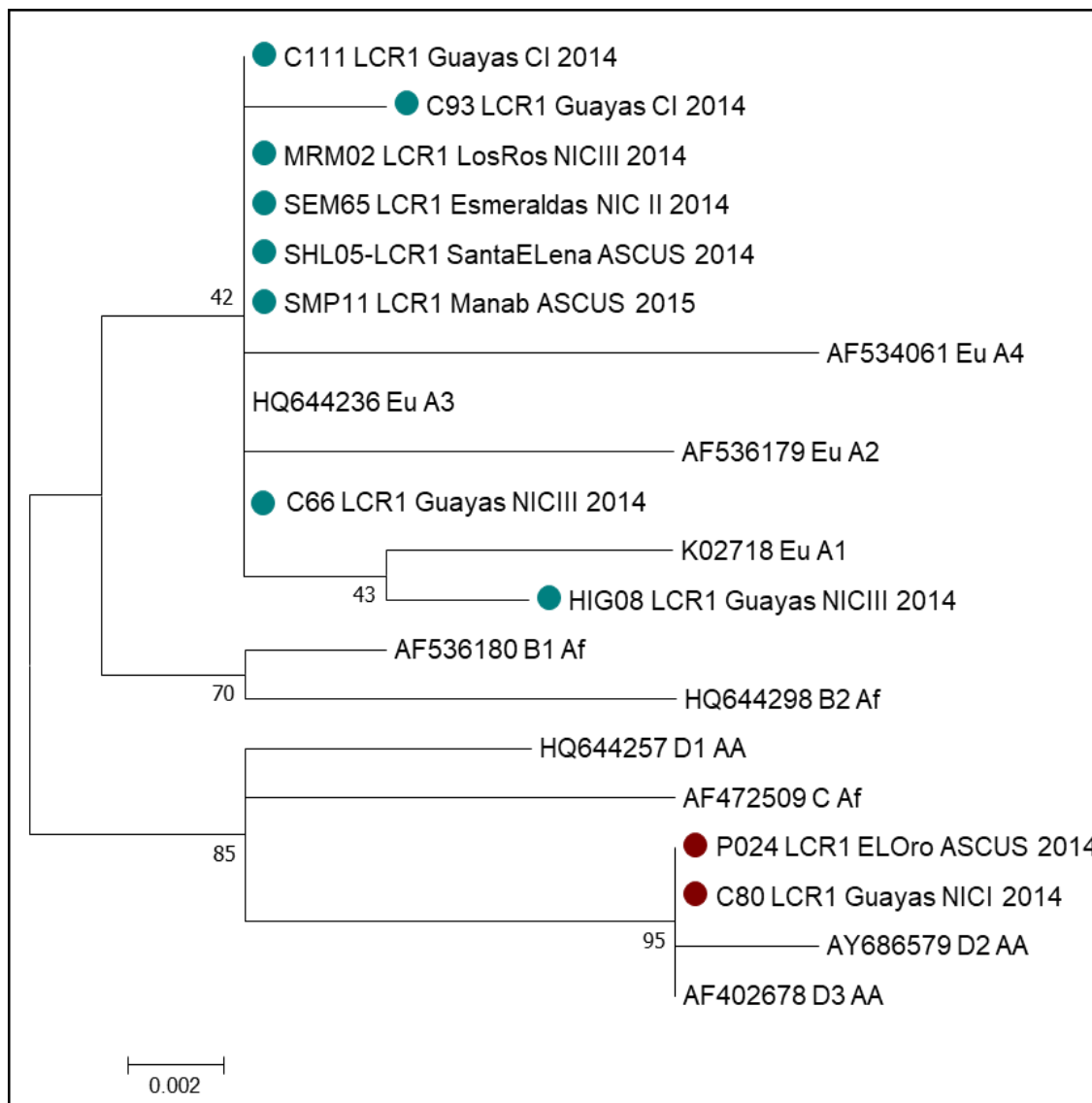
Un estudio realizado en 2021 para determinar las variantes en la región E6/E7 del VPH 16 asociadas con CaCU en mujeres del sur de México, reveló que es esencial el análisis de las variantes filogenéticas en estos dos genes, pues las mutaciones en las oncoproteínas E6 y E7 están asociadas con el desarrollo de estas lesiones malignas. Los autores encontraron que las mutaciones detectadas en una región que abarcaba ambos genes estaban asociadas al CaCU con un riesgo elevado, OR=3,79 IC95% (1,46-9,85). Incrementándose el riesgo, específicamente para las variantes asiáticas-americanas OR=110 IC95% (6,04-201,3). Sus resultados destacan la importancia de analizar las combinaciones de variantes E6/E7 en la infección por VPH 16 y sugieren que pudieran ser marcadores útiles para predecir el desarrollo del CaCU en mujeres mexicanas infectadas con variantes asiáticas-americanas de este genotipo (217).

Estos análisis se han llevado a cabo en diferentes regiones del planeta, y específicamente en la región de Chhattisgarh, en la India, se realizó el análisis filogenético de 121 secuencias de VPH 16, región E6/E7, obtenida de muestras cervicales de mujeres con CaCU. El análisis reveló que el 45 % de las secuencias, pertenecían al linaje asiático, mientras que 55 % pertenecían al linaje europeo para demostrar que los casos de CaCU en la región de Chhattisgarh reflejan una mezcla de linaje asiático y europeo. Las secuencias asiáticas que mostraron una mayor frecuencia de mutaciones y la presencia exclusiva de mutaciones que generaban codón de parada pudieran estar relacionadas con una mayor oncogenicidad. Estos hallazgos filogenéticos de E6/E7 pueden resultar útiles para el desarrollo de mejores diagnósticos y vacunas para las mujeres de la región de Chhattisgarh, en la India (218).

No obstante, las variantes europeas del VPH 16 pueden mostrar una serie mutaciones exclusivamente en el gen E7, que también se han visto asociadas a un mayor potencial oncogénico. En un estudio realizado en Beijing, China, para analizar la diversidad genética de los genes E6, E7 y LCR del VPH 16, el linaje A se encontró en el 100 % de las mujeres, incluidos todos los sublinajes A1, A2, A3 y A4. Según las secuencias de referencia de VPH 16, se encontraron mutaciones puntuales del sublinaje A4 que se asociaron significativamente con lesiones cervicales de alto grado, lo que sugiere que las mutaciones en la región E7 tienen efectos potenciales sobre la replicación viral y la progresión del cáncer de cuello uterino (219).

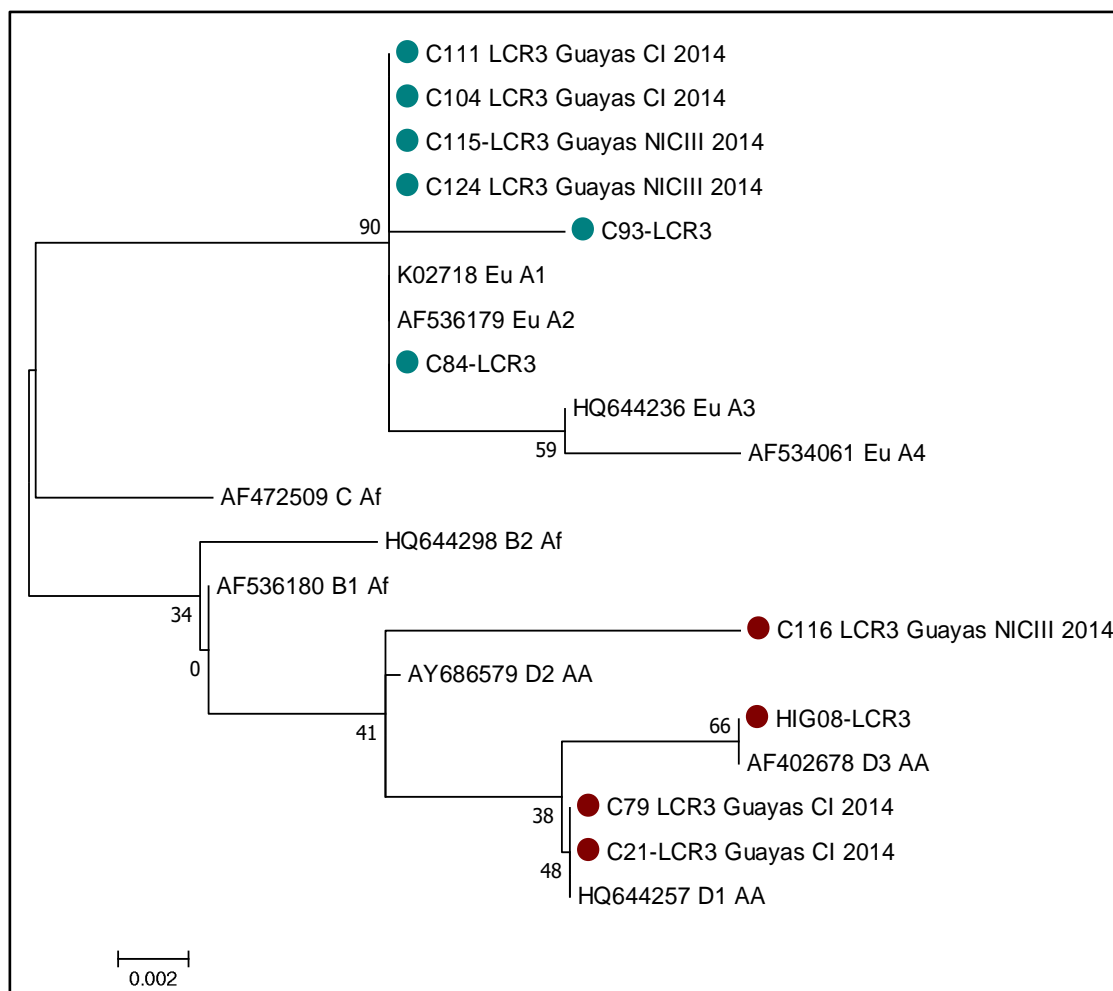


En las dos regiones analizadas del gen LCR también se encontraron dos linajes, el europeo (A) y el no europeo (D). Se amplificaron dos fragmentos que generaron amplicones de 340 pb (LCR 1) y 201 pb (LCR 1), respectivamente (Figuras 18 y 19).



**Figura 18.** Análisis Filogenético de máxima verosimilitud para la región del gen LCR 1 (340 pb) de VPH 16 implementado en el paquete bioinformático Mega, versión X. El modelo de Evolución de Secuencias fue Hasegawa-Kishino-Yano. Los valores de los porcentajes de la proporción de cada réplica se muestran en los nodos. Las muestras pertenecientes al Linaje A se identifican con círculos azules y las muestras pertenecientes al Linaje D se indican en rojo.

De las 20 muestras analizadas para ambos fragmentos, 14 pertenecieron al linaje A europeo (70,00 %) y 6 al linaje D no europeo asiático. (30,00 %). En las lesiones de alto grado se obtuvieron 12/14 secuencias pertenecientes al linaje europeo (85,71 %) y 2/14 al no europeo (14,29 %).



**Figura 19.** Análisis Filogenético de máxima verosimilitud para la región del gen LCR 2 (201 pb) de VPH 16 implementado en el paquete bioinformático Mega, versión X. El modelo de Evolución de Secuencias fue Tamura 3-parámetros. Los valores de los porcentajes de la proporción de cada réplica se muestran en los nodos. Las muestras pertenecientes al Linaje A se identifican con círculos azules y las muestras pertenecientes al Linaje D se indican en rojo.

Como se evidencia, el linaje no europeo, en la región LCR, estuvo presente en una proporción de muestras similar a lo que se encontró para las otras regiones analizadas en el presente estudio. El patrón de distribución de las variantes de VPH 16 es el mismo en todas las regiones del genoma estudiadas, evidenciando un predominio de las variantes del linaje A, con una mayor similitud a los sublinajes A1 y A2.

En un estudio realizado en mujeres del este de China en el año 2020, los autores analizaron 3718 secuencias de la región LCR de VPH 16, y demostraron la presencia de 117 variaciones en esta región del genoma y una mayor frecuencia del sublinaje A4. Igualmente, se encontraron evidencias de la circulación de variantes con un mayor riesgo de cáncer en las mujeres de esta

región e identificaron posiciones de nucleótidos distintivos que pueden facilitar la detección de variantes de alto riesgo. En este estudio se demostró la estrecha relación entre los linajes y sublinajes del VPH 16 y el perfil genético y étnico de las mujeres analizadas (211).

Con respecto a las variantes no europeas, sobre todo asiáticas-americanas, identificadas en la región LCR, se plantea que están asociadas con una mayor frecuencia a la carcinogénesis (220). En estudios realizados, también en mujeres de China, se han identificado mutaciones tipo SNP en la región LCR que se asociaron a una alta variabilidad en sitios potenciales de unión a factores de transcripción nuclear para tumores melanocíticos, como es el caso del factor SOX 10 (221).

La región LCR del VPH, contiene los sitios de unión para factores virales y celulares. Se ha demostrado que esta región tiene funciones reguladoras en la replicación del VPH, la actividad transcripcional de E6/E7 y otras interacciones a lo largo del ciclo de vida del virus. Las mutaciones en la región LCR de los diferentes linajes pueden influir en dichos sitios de unión y su función durante la infección y la multiplicación viral. Las mutaciones de algunos sublinajes que están más relacionados con mayor patogenicidad y carcinogénesis pues pueden tener un efecto potenciador en los sitios de unión de factores transcripcionales relacionados con la diferenciación, proliferación celular, factores de adhesión, migración celular, neo-angiogénesis, entre otros marcadores tumorales (222).

Del análisis anterior se deriva la importancia de los polimorfismos tipo SNP en las regiones del genoma de VPH, específicamente L1, E6, E7 y LCR, por ser clave en los procesos de transformación maligna y la carcinogénesis cervical.

#### **IV.3.3. Polimorfismos y variantes intratípicas en regiones de los genes L1, E6, E7 y LCR de VPH 16 y VPH 58**

Para el estudio de los polimorfismos de las muestras positivas a VPH 16 se realizaron análisis de determinadas regiones de los genes L1 (L1a y L1b), E6, E7 y LCR. Dichas regiones se amplificaron mediante el empleo de iniciadores específicos (Tabla 11).

Las dos secuencias de nucleótidos de la región L1 se compararon con la secuencia de ADN de referencia del VPH 16 (AF536179). En las 16 secuencias analizadas en esta región, se identificaron un total de 14 mutaciones puntuales, seis sinónimas y ocho no sinónimas. La totalidad de mutaciones se encontraron en muestras con lesiones cervicales de alto grado y CaCU, ya que las muestras con lesiones cervicales de bajo grado carecieron de mutaciones.

**Tabla 11.** Mutaciones identificadas en regiones del genoma de VPH 16 y VPH 58 en muestras cervicales de mujeres mayores de 30 años, con lesiones y cáncer cervicouterino, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-1015.

Región del genoma y genotipo de VPH	Número de muestras analizadas	Número de mutaciones detectadas	Número de mutaciones sinónimas silentes	Número de mutaciones no sinónimas	Mutaciones Identificadas en las muestras estudiadas	Mutaciones que se describen asociadas con lesiones clínicas	Linaje, sublinaje o variante de sublinaje
<i>Gen L1 VPH 16 regiones L1a y L1b</i>	16	14	6	8	T5909C, T6245C, A6314G, C6968T, A6892G, C6163A, A6178C, G7058T, A6023T, C5862T, G6432A, C6860T, 6377T, 6379T		A y D
<i>Gen E6 VPH 16</i>	20	9	4	5	A187G, A289G, A532G, T286A, G176A, C335T, G145T, T183G, T350G	G176A C335T T350G	C335T-A4 G176A-A1 T350G-A1
<i>Gen E7 VPH 16</i>	20	5	5	0	T678C, T732C, T789C, T828C, T795G	T732C T789C T795G	D2
<i>Región LCR VPH 16</i>	20	21	10	11	7422T, G7193T, A7233C, A7339T, A7485C, C7689A, A7729C, T7743G, C7866G, C7886T, A7894C, C7394T, C7395T, T7450C, G7489A, G7521A, C7669T, C7764T, A7772G, C7786T, G7868A	G7193T A7729C T7743G C7886T C7394T C7395T G7521A	A y D
<i>Gen L1 VPH 16 amplificada con cebadores consenso MY09/MY11</i>	41	7	1	6	C6862T, A6994G, A6721G, T6695C, C6865T, C6970T, A6803T	A6994G A6721G T6695C C6865T C6970T A6803T	A y D
<i>Gen L1 VPH 58 amplificada con cebadores consenso MY09/MY11</i>	15	4	3	1	G6641A, C6827A, A6926G, A7000C		A

**Fuente:** Análisis de polimorfismos mediante el programa BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*). Dicho programa permitió determinar la presencia de mutaciones o polimorfismos a través de la comparación de las secuencias obtenidas en el presente estudio, con las secuencias de referencia internacional definidas por Burk y cols., 2013, (57) disponibles en la base de genes GenBank ([www//ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Aparecen subrayadas las mutaciones que más se repiten en las secuencias analizadas para las muestras estudiadas.

De las mutaciones sinónimas, cinco fueron de transición (T5909C, T6245C, A6314G, C6968T, A6892G) y una de transversión (A6023T). Las mutaciones no sinónimas fueron, tres de transición (C5862T, G6432A, C6860T) y tres de transversión (C6163A, A6178C, G7058T). En dos muestras se halló la presencia de codones de parada prematuros, por presentar dos

inserciones de nucleótidos en las posiciones 6377T y 6379T. La mutación más común fue C6163A (cinco veces) y la menos común C6860T (una vez), (Tabla 11, Anexo 10).

Estas mutaciones se reportaron por Pillai y cols., en 2009, y según estos autores pudieran interrumpir la formación de pentámeros, la regulación transcripcional del virus, la interacción de la interfaz de la proteína L1 con los epítomos de células B y T, la degradación de p53, y por lo tanto, su distribución es importante en la población para el establecer métodos diagnósticos oportunos, vacunas y compuestos terapéuticos para estas variantes del VPH 16 (223).

Para el estudio de la región E6 de VPH 16 se analizaron secuencias de 20 muestras y se compararon con la secuencia de ADN de referencia del VPH 16 (K02718). En dicha región se identificaron nueve mutaciones, de las cuales, cuatro fueron sinónimas, de ellas, tres de transición (A187G, A289G, A532G) y una transversión (T286A). En el caso de las cinco mutaciones no sinónimas, se identificaron dos de transición (G176A, C335T) y tres de transversión (G145T, T183G, T350G). No hubo evidencia de codones de parada prematuros, ni inserción o delección de nucleótidos. Las mutaciones se identificaron solamente en las muestras con lesiones cervicales de alto grado. La mutación más común fue T350G (14 veces) y la menos común G176A (una vez) (Tabla 11, Anexo 11). Todas las mutaciones detectadas en la región E6 ya se encuentran reportadas por otros autores, tanto en Latinoamérica como en Europa y Asia (98, 217, 224-226). Según los estudios publicados, la mutación C335T está asociada a lesiones HSIL y CaCU, mientras que las mutaciones G176A y T350G se asocian al CaCU (35, 220). Específicamente, estas mutaciones se presentan en las variantes C335T-A4, G176A-A1 y T350G-A1 de sublinajes europeos de VPH 16 con un elevado potencial carcinogénico (98, 215).

Las secuencias de nucleótidos del MAL E7 de VPH 16 se compararon con la secuencia de ADN de referencia del VPH 16 (K02718). En las 20 secuencias correspondientes al gen E7 se identificaron cinco mutaciones puntuales, todas de tipo sinónimas, cuatro de transición (T678C, T732C, T789C, T828C) y una de transversión (T795G). No hubo evidencia de codones de parada prematuros, ni inserción o delección de nucleótidos. En el nucleótido 678 del gen E7 se encontró la única mutación no reportada en la literatura hasta el momento (T678C). Las mutaciones se encontraron en dos muestras con lesiones cervicales de bajo grado y en tres muestras con HSIL y CaCU. Es de destacar que las muestras con cáncer invasivo prácticamente carecieron de mutaciones en esta región del genoma. La mutación más común fue T789C (siete veces) y la menos común T828C (una vez), (Tabla 11, Anexo 12). Sin embargo, en un trabajo publicado por

Antaño-Arias y cols., en 2021 se identificaron estas mutaciones con fuerte asociación al CaCU, pues aunque las mutaciones sinónimas no modifican la secuencia de aminoácidos de la oncoproteína, pueden afectar la estructura, el empalme o la estabilidad del ARN, lo que contribuye a la oncogenicidad. De hecho, las variantes de E7 encontradas (C732/C789/G795) se asociaron con un riesgo incrementado de CaCU; OR= 3,79; IC95% (1,46-9,85) (217).

Las secuencias de nucleótidos de la región LCR se compararon con la secuencia de ADN de referencia del VPH 16 (AY686584.1). De las 20 secuencias correspondientes al gen LCR, se identificaron 21 mutaciones puntuales, 10 de transición (C7394T, C7395T, T7450C, G7489A, G7521A, C7669T, C7764T, A7772G, C7786T, G7868A), 10 de transversión (G7193T, A7233C, A7339T, A7485C, C7689A, A7729C, T7743G, C7866G, C7886T y A7894C) y una de inserción (7422T). La mayor cantidad de mutaciones para este gen se identificaron en muestras pertenecientes al linaje no europeo (D), y se correspondieron con muestras con lesiones cervicales de alto grado y CaCU. La mutación más común fue G7193T (10 veces) seguida de G7521A (nueve veces), (Tabla 11, Anexo 13). De acuerdo a varios estudios, todas estas mutaciones están asociadas con los sitios de unión de las proteínas virales a los factores de transcripción celulares y son considerados como marcadores de carcinogénesis. Específicamente, las variantes G7193T y G7521A, se localizan en el sitio de unión de FOXA1 y SOX9, respectivamente (220, 227).

La detección de los polimorfismos y variantes intratípicas de la región L1 de VPH 16 generada por la amplificación con los iniciadores consenso MY09/MY11 aportó información adicional. Se analizaron 41 muestras y se identificaron 7 mutaciones. La mayor parte de las mutaciones fueron transiciones y solo se halló una transversión (A6803T), y la más frecuente fue C6862T. Todas las mutaciones identificadas provocaron cambio de aminoácido a excepción de una (A6803T). No hubo diferencias en la distribución de las mutaciones en muestras con citologías de diferente grado. Las mutaciones, C6862T, A6721G, C6865T y C6970T estuvieron presentes en las muestras de linaje asiático (D). Por otro lado, las mutaciones, A6994G, A6803T fueron identificadas en muestras de linaje europeo (A). La mutación T6695C estuvo presente en ambos linajes (A y D), (Tabla 11, Anexo 14). Todas las mutaciones identificadas en este estudio han sido reportadas previamente y se relacionan con una posible evasión de la respuesta inmune generada por las vacunas actuales contra VPH (223, 228-230).

En cuanto a los polimorfismos y variantes intratípicas de la región L1 de VPH 58 generada por la amplificación con los iniciadores MY09/MY11, se analizaron 15 muestras y se identificaron cuatro cambios en la región analizada, dos transversiones y dos transiciones. La mutación más frecuente fue G6641A. Todas las mutaciones identificadas pertenecieron al linaje A, no hubo diferencias en cuanto a su distribución entre las muestras que presentaban lesiones cervicales de diferente grado. Se encontró la mutación novel A6926G, (Tabla 11, Anexo 15). La mayor parte de estas mutaciones fueron reportadas por Cento y cols., en 2011 y confirmadas por Liu y cols., en 2012, no se ha encontrado su relación con hallazgos clínicos particulares (231, 232).

En la presente investigación, un aspecto novedoso a destacar es la prevalencia elevada del VPH 58, por encima del VPH 16, que se describe como el más frecuente en todo el mundo. La heterogeneidad del VPH 58 complica un tanto la compilación de los pocos estudios en los que se investigan estas variantes (70, 103, 233). Una investigación en Taiwán, en un estudio anidado de casos y controles, informó que en infecciones simples por VPH 58, el linaje A1 se asoció con NIC 3, en comparación con A3; OR=2,4 IC95% (0,5-12,1) (234). Por el contrario, otro estudio indicó que el sublinaje A3 era un factor de riesgo para NIC 3; OR=4,4 IC 95% (1,5–13) (235). La comparación entre sublinajes del linaje A, como el primer nivel de prueba de hipótesis sobre la historia natural o estadios de las lesiones cervicales, es esencial para predecir riesgo de malignidad para las infecciones con VPH 58. Esta recomendación se basa en el hecho de que la mayoría de los cambios de nucleótidos dentro de los linajes están altamente correlacionados con el fenotipo clínico. Sin embargo, también hay cambios del tipo SNP que deben analizarse de forma independiente para cada población (211).

El VPH 58 se detecta entre el 10 y el 18 de los CaCU en Asia oriental, pero es poco común en otras regiones. La distribución y el potencial oncogénico de las variantes de VPH 58 parecen ser heterogéneos, ya que la variante E7 T20I / G63S es más prevalente en el este de Asia y confiere un riesgo de siete a nueve veces mayor de HSIL y CaCU. Sin embargo, los mecanismos genómicos subyacentes que explican la diversidad geográfica y carcinogénica de las variantes del VPH 58 aún no se conocen bien (70). De ahí la necesidad de profundizar en el impacto de la variabilidad genética del VPH 58 en la población del Litoral de Ecuador, donde este genotipo es altamente prevalente.

#### IV.4. Asociación entre los resultados de los estudios virológicos y las variables clínico-epidemiológicas y sociodemográficas, en las pacientes estudiadas

##### IV.4.1. Análisis estadístico bivariado

En la Tabla 12 se detallan los resultados del análisis estadístico bivariado. También se realizó este análisis por tipo de lesión citológica, (Tabla 13).

**Tabla 12.** Análisis  $X^2$  de Pearson, presencia de VPH *versus* todas las variables independientes (valor de  $p$  corregido por Mantel- Haenszel) para mujeres mayores de 30 años, con lesiones y cáncer cervicouterino, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

Variable	Categorías o grupos	Infección por VPH	
		Razón de prevalencia	Valor de $p$
<b>Edad</b>	30-40 años	1,158	0,750
	>40 años	0,863	0,462
<b>Procedencia provincias de la región Litoral del Ecuador</b>	Esmeraldas	0,000	0,117
	Manabí	5,255	0,109
	Guayas	0,957	0,927
	Los Ríos	0,963	0,961
	Santa Elena	0,427	0,201
	<b>El Oro</b>	<b>0,371</b>	<b>0,045</b>
	<b>Nivel Escolaridad</b>	Educación básica (desde elemental hasta secundaria)	1,400
	Educación superior (tecnológica y universitaria)	0,714	0,563
<b>Estado civil</b>	Casada	1,078	0,874
	Soltera	0,740	0,552
	Divorciada	0,000	0,383
	Viuda	0,000	0,341
	Otra	0,824	0,701
<b>Situación laboral</b>	Ama de casa	1,297	0,607
	Estudiante	0,000	0,430
	Profesional	0,399	0,122
	Obrera	0,477	0,349
	Técnica	0,000	0,652
	Privado informal	0,000	0,231
<b>Edad de inicio de las relaciones sexuales</b>	<b>10-18 años</b>	<b>3,671</b>	<b>0,015</b>
	<b>&gt;18 años</b>	<b>0,272</b>	<b>0,015</b>
<b>Número de parejas sexuales en los últimos dos años</b>	0	0,493	0,519
	1	1,249	0,713
	>2	0,947	0,935
<b>Número de embarazos</b>	0-3	0,732	0,503
	>3	1,367	0,503
<b>Trastornos menstruales y síntomas ginecológicos</b>	Normal	1,878	0,258
	Metrorragia	1,212	0,771
	Leucorrea	0,817	0,736
	Menopausia	0,000	0,243
	Trastorno espontaneo	0,041	0,001
	Amenorrea	0,000	0,785
	Metrorragia / Leucorrea	0,000	0,700
	Otros	0,212	0,191

**Fuente:** Resultados de la investigación.



**Tabla 13.** Análisis  $X^2$  de Pearson, ASC-US y LSIL *versus* todas las variables independientes (Valor de  $p$  corregido por Mantel-Haenzel) para mujeres mayores de 30 años, con lesiones y cáncer cervicouterino, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

Variable	Categorías o grupos	ASC-US		LSIL	
		Razón de prevalencia	Valor de $p$	Razón de prevalencia	Valor de $p$
<i>Edad</i>	30-40 años	0,681	0,138	<b>1,804</b>	<b>0,021</b>
	>40 años	1,469	0,138	<b>0,554</b>	<b>0,021</b>
<i>Procedencia provincias de la región Litoral del Ecuador</i>	Esmeraldas	0,956	0,915	1,294	0,511
	Manabí	0,950	0,873	<b>3,672</b>	<b>0,000</b>
	Guayas	<b>0,153</b>	<b>0,000</b>	<b>0,231</b>	<b>0,000</b>
	Los Ríos	1,490	0,329	<b>0,155</b>	<b>0,012</b>
	Santa Elena	<b>3,353</b>	<b>0,005</b>	<b>2,285</b>	<b>0,055</b>
	El Oro	3,246	0,000	1,462	0,221
<i>Nivel Escolaridad</i>	Educación básica (desde elemental hasta secundaria)	0,621	0,157	<b>0,462</b>	<b>0,016</b>
	Educación superior (tecnológica y universitaria)	1,611	0,157	<b>2,163</b>	<b>0,016</b>
<i>Estado civil</i>	Casada	1,581	0,078	<b>1,776</b>	<b>0,022</b>
	Soltera	<b>0,412</b>	<b>0,012</b>	0,760	0,359
	Divorciada	1,130	0,859	3,162	0,063
	Viuda	0,896	0,870	0,445	0,299
	Otra	1,089	0,769	<b>0,555</b>	<b>0,054</b>
<i>Situación laboral</i>	Ama de casa	0,808	0,460	0,875	0,633
	Estudiante	0,853	0,845	0,713	0,676
	Profesional	1,048	0,913	<b>3,044</b>	<b>0,004</b>
	Obrera	0,919	0,886	0,321	0,136
	Técnica	1,506	0,739	1,261	0,851
	Privado informal	1,309	0,595	0,612	0,392
<i>Edad de inicio de las relaciones sexuales</i>	10-18 años	0,676	0,184	0,639	0,116
	>18 años	1,479	0,184	1,564	0,116
<i>Número de parejas sexuales en los últimos dos años</i>	0	1,444	0,611	1,841	0,373
	1	1,873	1,101	0,775	0,426
	>2	<b>0,424</b>	<b>0,050</b>	1,156	0,672
<i>Número de embarazos</i>	0-3	1,258	0,392	1,173	0,543
	>3	0,795	0,392	0,853	0,543
<i>Trastornos menstruales y síntomas ginecológicos</i>	Normal	1,508	0,837	1,241	0,408
	Metrorragia	0,634	0,247	<b>0,305</b>	<b>0,009</b>
	Leucorrea	0,938	0,859	1,869	0,051
	Menopausia	1,267	0,667	0,764	0,646
	Trastorno espontáneo	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,000	0,155
	Amenorrea	0,000	0,083	0,000	0,528

	Metrorragia / Leucorrea	3,025	0,436	0,000	0,371
	Otros	<b>12,579</b>	<b>0,025</b>	0,625	0,676
<i>Genotipos de VPH</i>	VPH 6	0,355	0,059	0,857	0,705
	VPH 11	0,765	0,575	2,219	0,044
	VPH 16	<b>0,429</b>	<b>0,007</b>	1,181	0,566
	VPH 18	0,972	0,933	1,085	0,798
	VPH 31	0,866	0,646	1,181	0,566
	VPH 33	0,900	0,719	<b>3,319</b>	<b>0,000</b>
	VPH 35	1,165	0,578	1,376	0,223
	VPH 39	0,590	0,501	1,844	0,307
	VPH 40	1,506	0,739	0,000	0,273
	VPH 42	<b>0,295</b>	<b>0,050</b>	1,679	0,186
	VPH 43	1,135	0,799	1,480	0,396
	VPH 44	0,291	0,243	2,161	0,213
	VPH 45	1,000	1,000	2,551	0,353
	VPH 51	1,000	1,000	2,175	0,097
	VPH 52	0,307	0,058	1,290	0,533
	VPH 53	0,799	0,417	1,502	0,111
	VPH 54	1,933	0,260	0,747	0,663
	VPH 56	0,51	0,120	<b>2,856</b>	<b>0,001</b>
	VPH 58	0,594	0,070	0,820	0,487
	VPH 59	0,875	0,799	<b>3,327</b>	<b>0,007</b>
	VPH 61	0,691	0,310	<b>3,499</b>	<b>0,000</b>
	VPH 63	0,000	0,563	0,000	0,112
	VPH 66	2,053	0,275	0,272	0,219
	VPH 68	0,545	0,545	1,173	0,755
VPH 69	1,108	0,747	<b>2,383</b>	<b>0,003</b>	
VPH 70	<b>0,579</b>	<b>0,053</b>	<b>0,564</b>	<b>0,034</b>	
VPH 73	1,541	0,404	2,111	0,129	
VPH 82	0,000	0,153	0,498	0,527	
<i>Combinaciones de VPH</i>	VPH 58/70	<b>0,538</b>	<b>0,036</b>	0,679	0,155
	VPH 16/70	<b>0,289</b>	<b>0,011</b>	<b>0,297</b>	<b>0,008</b>
	VPH 16/58	<b>0,396</b>	<b>0,007</b>	<b>0,249</b>	<b>0,000</b>
	VPH 16/31	0,316	0,128	0,425	0,181
	VPH 16/58/70	<b>0,314</b>	<b>0,019</b>	<b>0,324</b>	<b>0,013</b>
	Infección simple	<b>2,306</b>	<b>0,045</b>	1,309	0,934
	Infección múltiple	<b>0,238</b>	<b>0,000</b>	1,412	0,368
	Infección doble	0,722	0,437	1,420	0,327
	Infección triple	0,591	0,145	0,612	0,149
	Infección por 4 o más genotipos	0,692	0,155	1,326	0,262

**Fuente:** Resultados de la investigación.

La infección por VPH se asoció a determinadas variables con valores de  $p < 0,05$  y valores de razón de prevalencia menor que uno, es decir, que representaban factores de protección para la infección. Entre las que tienen un significado biológico se identificó residir en la provincia de El Oro e iniciar las relaciones sexuales después de los 18 años. Sin embargo, el inicio de las relaciones sexuales antes de los 18 años, representó una probabilidad casi cuatro veces mayor para contraer la infección por VPH.

En el caso de las citologías ASC-US, se identificaron variables con asociación estadística ( $p < 0,05$ ) y  $RP < 1$ , pero no se consideraron variables protectoras para las infecciones por VPH, por carecer de significado biológico o clínico. Así mismo sucedió con la presencia de los genotipos de VPH 16, VPH 42, VPH 70, o las combinaciones VPH 58/70, VPH16/58, VPH16/58/70 e infecciones múltiples. Aquellas variables, cuya asociación representó una probabilidad incrementada para el desarrollo de ASC-US fueron las siguientes: procedencia de la provincia de Santa Elena, otros trastornos menstruales y síntomas ginecológicos y la presencia de infección simple por VPH (Tabla 13).

En cuanto a las lesiones citológicas cervicales LSIL, las variables asociadas negativamente al desarrollo de estas lesiones fueron, tener más 40 años, residir en las provincias del Guayas y Los Ríos, nivel de educación básica, no tener pareja estable, síntomas de metrorragia, la infección con VPH 70 y las combinaciones VPH 16/70, VPH 16/58, VPH16/58/70. Las LSIL fueron más probables en el grupo etario de 30 a 40 años, en mujeres residentes en las provincias de Manabí y Santa Elena, con nivel de educación superior, con estado civil casada, con situación laboral de profesional y con presencia de infección por VPH 33, VPH 56, VPH 59, VPH 61 o VPH 69.

Las variables que presentaron asociación negativa con el desarrollo de las HSIL (Tabla 14), fueron; residir en las provincias de Santa Elena y El Oro, educación superior, las mujeres casadas, profesionales, con edad de inicio de las relaciones sexuales por encima de los 18 años, e infección por VPH 33, VPH 61, VPH 69 o VPH 73. Las variables que tuvieron asociación positiva, o sea que representaron una probabilidad mayor para el desarrollo de este tipo de lesiones de alto grado, fueron; residir en la provincia del Guayas, educación básica, ser soltera, obrera, con edad de inicio de relaciones sexuales menor de 18 años. Así mismo, existió mayor probabilidad de padecer HSIL en mujeres donde se detectó VPH 16, VPH 70, las combinaciones VPH 58/VPH 70, VPH 16/VPH 70, VPH 16/VPH 58, VPH 16/VPH 58/VPH 70, infecciones múltiples y la infección simultánea por tres genotipos (Tabla 14).

En el estudio de asociación de variables con los casos de CaCU, no hubo variables que presentaron valores de  $p$  significativos y  $RP < 1$ , es decir ninguna de las variables estudiadas disminuyó la probabilidad para el desarrollo de este tipo de lesiones. Contrariamente, sí se pudieron observar variables fuertemente asociadas al desarrollo de las lesiones malignas, como fueron; la procedencia de las provincias de Guayas y Los Ríos, la metrorragia, la infección con VPH 16 y las combinaciones con VPH 16/VPH 70, VPH 16/VPH 58, VPH 16/VPH 31, VPH 16/VPH 58/VPH 70. Como se aprecia en todos los casos se observó asociación con coinfecciones donde estuvo presente el VPH 16 (Tabla 14).

**Tabla 14.** Análisis  $X^2$  de Pearson, HSIL y CaCU versus todas las variables independientes (Valor de  $P$  corregido por Mantel- Haenszel) para mujeres mayores de 30 años, con lesiones y cáncer cervicouterino, residentes en la región Litoral del Ecuador, periodo 2012-2015.

Variable	Categorías o grupos	HSIL		CaCU	
		Razón de prevalencia	Valor de P	Razón de prevalencia	Valor de P
<b>Edad</b>	30-40 años	1,092	0,702	0,355	0,027
	>40 años	0,916	0,702	2,818	0,027
<b>Procedencia provincias de la región Litoral del Ecuador</b>	Esmeraldas	1,151	0,705	0,000	0,091
	Manabí	<b>0,306</b>	<b>0,000</b>	0,557	0,357
	Guayas	<b>6,045</b>	<b>0,000</b>	<b>4,049</b>	<b>0,002</b>
	Los Ríos	1,301	0,489	<b>2,895</b>	<b>0,051</b>
	Santa Elena	<b>0,059</b>	<b>0,006</b>	0,000	0,156
	El Oro	<b>0,308</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,020</b>
<b>Nivel Escolaridad</b>	Educación básica (desde elemental hasta secundaria)	<b>2,597</b>	<b>0,009</b>	1,529	0,475
	Educación superior (tecnológica y universitaria)	<b>0,385</b>	<b>0,009</b>	0,654	0,475
<b>Estado civil</b>	Casada	<b>0,477</b>	<b>0,002</b>	0,594	0,265
	Soltera	<b>2,194</b>	<b>0,003</b>	1,103	0,843
	Divorciada	0,332	0,162	0,000	0,348
	Viuda	1,336	0,611	2,476	0,801
	Otra	1,300	0,308	1,551	0,338
<b>Situación laboral</b>	Ama de casa	1,020	0,940	3,871	0,072
	Estudiante	1,239	0,753	1,642	0,647
	Profesional	<b>0,338</b>	<b>0,021</b>	0,405	0,384
	Obrera	<b>2,997</b>	<b>0,035</b>	0,000	0,238
	Técnica	0,768	0,830	0,000	0,628
	Privado informal	1,586	0,319	0,000	0,199
<b>Edad de inicio de las relaciones sexuales</b>	10-18 años	<b>1,993</b>	<b>0,019</b>	1,529	0,475
	> 18 años	<b>0,502</b>	<b>0,019</b>	0,654	0,475
<b>Número de parejas sexuales en los últimos dos años</b>	0	0,195	0,127	2,385	0,430
	1	0,728	0,301	1,662	0,517
	>2	1,845	0,059	0,337	0,302

<i>Número de embarazos</i>	0 – 3	0,92	0,729	0,368	0,062
	> 3	1,087	0,729	2,718	0,062
<i>Trastornos menstruales y síntomas ginecológicos</i>	Normal	0,819	0,415	0,888	0,801
	Metrorragia	1,753	0,072	<b>4,130</b>	<b>0,002</b>
	Leucorrea	0,844	0,595	<b>0,000</b>	<b>0,032</b>
	Menopausia	1,394	0,507	0,000	0,238
	Trastorno espontáneo	0,000	0,069	0,000	0,531
	Amenorrea	0,000	0,420	0,000	0,78
	Metrorragia / Leucorrea	1,544	0,759	0,000	0,693
	Otros	0,000	0,069	0,000	0,531
<i>Genotipos de VPH</i>	VPH 6	1,176	0,655	<b>4,203</b>	<b>0,004</b>
	VPH 11	0,794	0,572	0,000	0,116
	VPH 16	<b>2,483</b>	<b>0,000</b>	<b>5,893</b>	<b>0,000</b>
	VPH 18	0,878	0,666	1,309	0,610
	VPH 31	0,732	0,263	2,295	0,065
	VPH 33	<b>0,433</b>	<b>0,002</b>	0,368	0,114
	VPH 35	0,864	0,558	0,309	0,063
	VPH 39	0,762	0,663	1,182	0,876
	VPH 40	0,768	0,830	6,705	0,126
	VPH 42	1,125	0,759	1,441	0,574
	VPH 43	0,702	0,454	0,597	0,623
	VPH 44	1,295	0,675	0,000	0,348
	VPH 45	0,509	0,561	0,000	0,575
	VPH 51	0,365	0,077	1,476	0,617
	VPH 52	1,613	0,214	0,915	0,908
	VPH 53	0,743	0,222	1,471	0,379
	VPH 54	0,674	0,519	1,08	0,943
	VPH 56	0,582	0,124	0,911	0,884
	VPH 58	1,441	0,187	3,484	0,097
	VPH 59	0,225	0,018	1,319	0,721
	VPH 61	<b>0,504</b>	<b>0,036</b>	0,200	0,119
	VPH 63	0,000	0,420	0,000	0,780
	VPH 66	1,027	0,967	1,455	0,728
	VPH 68	1,128	0,802	1,569	0,564
VPH 69	<b>0,488</b>	<b>0,021</b>	0,361	0,176	
VPH 70	<b>1,952</b>	<b>0,005</b>	1,995	0,112	
VPH 73	<b>0,179</b>	<b>0,024</b>	1,673	0,360	
VPH 82	3,148	0,189	2,655	0,382	
<i>Combinaciones de VPH</i>	VPH 58/70	<b>1,776</b>	<b>0,017</b>	1,919	0,134
	VPH 16/70	<b>2,719</b>	<b>0,002</b>	<b>4,014</b>	<b>0,002</b>
	VPH 16/58	<b>2,887</b>	<b>0,000</b>	<b>4,861</b>	<b>0,000</b>
	VPH 16/31	1,586	0,319	<b>5,222</b>	<b>0,004</b>
	VPH 16/58/70	<b>2,632</b>	<b>0,003</b>	<b>3,528</b>	<b>0,007</b>
	Infección simple	0,612	0,291	0,000	0,156
	Infección múltiple	<b>2,143</b>	<b>0,039</b>	<b>0,000</b>	<b>0,047</b>
	Infección doble	1,16	0,666	0,301	0,246
	Infección triple	<b>2,019</b>	<b>0,014</b>	1,170	0,766
Infección por 4 o más genotipos	0,831	0,420	2,527	0,058	

**Fuente:** Resultados de la investigación.

Es importante destacar que la edad de inicio temprano de las relaciones sexuales representó una probabilidad mayor para la presencia de lesiones de alto grado y CaCU. La relación entre la edad y la frecuencia del VPH es similar en todo el mundo, con los mayores porcentajes en mujeres menores de 25 años, y declina en edades mayores (5). En Europa y Norte América, las mujeres jóvenes, menores 25 años, tienen tasas muy altas de infección (20-30 %) que decrece a valores muy bajos sobre los 45 años de edad (<5 %). En África y Asia, la prevalencia de VPH es  $\geq 10$  % entre grupos de mayor edad (>45 años) y en América Latina y el Caribe, existe un descenso inicial y luego un aumento en mujeres de mediana edad (236, 237). El pico de transmisión del VPH es típicamente entre mujeres jóvenes, posterior al debut sexual, debido a que la prevalencia es alta en estos grupos de edades, en los cuales el virus es también transmitido fácilmente. Por tanto, la adquisición de la infección por VPH comienza con el debut de la actividad sexual, que puede ser tan alta como 45 % en mujeres en edades de 15 y 19 años. El inicio temprano de las relaciones sexuales o intervalos cortos entre la menarquia y el debut sexual, según varios estudios, constituye un factor de riesgo para la infección por VPH y para la aparición precoz del CaCU. Así mismo, el número de compañeros en la vida sexualmente activa, además de estar asociado a la adquisición de la infección, es un factor más predictivo para el riesgo de infección (238, 239).

La provincia de residencia fue también una variable que se vio asociada a las lesiones de alto riesgo y al CaCU, incluso a algunas variantes de VPH 16 y 58 del linaje no europeo en el presente estudio. El diseño del estudio es de corte transversal, por lo que las comparaciones entre variables virales, sociodemográficas y clínico-epidemiológicas de las mujeres de las provincias del Litoral, no son una medida exacta del riesgo que representan dichas variables para cada uno de los grupos de mujeres estudiadas por provincia. Sin embargo, el estudio da la posibilidad de caracterizar grupos de mujeres que pueden diferir en varios aspectos, definir así variables asociadas a la infección y la presencia de lesiones cervicales, que pueden ser distintivas entre ellas. No obstante, el presente estudio revela elementos que pudieran indicar un comportamiento diferente entre mujeres de diferentes provincias ante la infección por VPH y en la aparición de lesiones precursoras de CaCU.

En todos los casos con CaCU se detectó la infección con VPH 16 y las combinaciones con VPH 16/VPH 70, VPH 16/VPH 58, VPH 16/VPH 31, VPH 16/VPH 58/VPH 70, por lo tanto se

evidenció la asociación del CaCU con coinfecciones donde estuvo presente el VPH 16, aun cuando dicho genotipo no fue el más frecuente en el estudio.

Como ya se comentó anteriormente Wentzensen y cols., 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 (193). Así los autores 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 con respecto al riesgo para desarrollar CaCU (193).

Por su parte, de Brot y cols. en el 2017 plantearon, según un meta-análisis 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 las infecciones múltiples y las alteraciones citológicas, hasta la presencia de lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado. Dichas 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 genotipo de alto riesgo, sin embargo, no existen evidencias de interacciones sinérgicas entre los mismos. También analizaron los factores de riesgo que predisponen para la adquisición de infecciones múltiples. No obstante, se requiere profundizar en estas investigaciones pues los estudios realizados en mujeres de diferentes regiones del mundo, sugieren que los factores de riesgo para las infecciones múltiples pueden ser diferentes de los que se observan para infecciones con genotipos individuales particulares, pero las diferencias no han sido significativas. Por ejemplo, el elevado número de parejas sexuales y el no uso del condón se observan con mayor frecuencia en mujeres con infecciones múltiples con genotipos de alto riesgo, con respecto a infecciones simples con genotipos de bajo riesgo (196).

El mecanismo, desde el punto de vista biológico, que desempeñan las infecciones múltiples en el desarrollo del CaCU, aún no se ha dilucidado. Según Salazar y cols., algunas investigaciones concluyen que las infecciones múltiples actúan sinérgicamente en la evolución de la carcinogénesis cervical. Controversialmente, otras investigaciones han mostrado que las coinfecciones no tienen ningún efecto sinérgico o aditivo en el desarrollo del cáncer cervical o en el incremento del riesgo de padecer lesiones cervicales de alto grado, cuando se comparan con

infecciones simples (240). Los hallazgos descritos por Sobota y cols., publicados en 2018, son hasta el momento, los más concluyentes al demostrar, mediante diferentes estudios de cohorte, que pueden existir interacciones competitivas o cooperativas entre diferentes genotipos de VPH en las coinfecciones. Particularmente se plantea que las coinfecciones con genotipos de VPH 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 estos autores, el curso de estos eventos está dado por una respuesta inmune, diferente en cada caso (241).

Hasta el momento, las consecuencias e implicaciones biológicas de las infecciones múltiples todavía son debatidas y no concluyentes. Cada una de las teorías propuestas para esclarecer el efecto biológico de las coinfecciones por VPH en las células cervicales, se sustenta en evidencias de estudios poblacionales. Sin embargo, no existen investigaciones básicas que demuestren, desde el punto vista molecular y celular, las hipótesis propuestas por un sinnúmero de investigadores (193-196). Obviamente, esto se debe a las limitaciones para realizar estudios *in vitro*, por la incapacidad del VPH para replicarse en cultivos celulares, aunque se están desarrollando investigaciones para lograr este objetivo (242).

#### **IV.5. Consideraciones generales**

El presente trabajo constituye el primer acercamiento al estudio de la epidemiología molecular del VPH en mujeres mayores de 30 años, con lesiones cervicouterinas y CaCU, en todas las provincias de la región Litoral del Ecuador. El mismo, permitió conocer la frecuencia de infección por VPH en mujeres con lesiones cervicouterinas de diferente grado, residentes en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos, Santa Elena y El Oro. Permitted además determinar los genotipos circulantes, donde se observó un predominio de tipos oncogénicos e infecciones múltiples.

El estudio demuestra una frecuencia notablemente alta de infecciones múltiples por VPH en mujeres de la región Litoral del Ecuador. Se muestra que ciertas combinaciones de genotipos de VPH son factores de riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales premalignas y CaCU en mujeres infectadas y se determina por primera vez que en mujeres de dicha región cocirculan dos linajes diferentes de VPH 16. Como aspecto novedoso se determina, por primera vez, que el VPH 58 es el genotipo más prevalente en las mujeres procedentes de la región Litoral del Ecuador.



El estudio tiene limitaciones que se deben puntualizar, en primer lugar es importante analizar el número de mujeres incluidas en la investigación. En términos generales, el número de mujeres es representativo de toda la población del Litoral, pues la región cuenta con 3 507 717 mujeres con edades mayores o igual a 30 años, de ellas 701 543 presentaban lesiones cervicouterinas o CaCU en el momento del estudio, lo que constituye alrededor del 20 % de este grupo poblacional. En la literatura se plantea que la prevalencia de infección por VPH en mujeres mayores de 30 años, con lesiones cervicouterinas, es aproximadamente del 80 % (243). Bajo estas condiciones se calculó el tamaño muestral y la muestra estuvo constituida por 320 pacientes con lesiones cervicouterinas (80 con ASC-US, 91 con LSIL, 126 con HSIL y 23 con CaCU), con un margen de error del 5 %, por lo que se obtuvo un nivel de confiabilidad del 97 %. Sin embargo, aunque se investigaron mujeres de todas las provincias de la región, no todas tuvieron la misma representatividad, pues mientras que Manabí y Guayas aportaron entre el 20 y 30 % de las pacientes, Santa Elena y Los Ríos no llegaron a representar el 10 % de los casos estudiados.

No obstante, este es el primer estudio donde se incluye el mayor número de mujeres con lesiones citológicas confirmadas por estudio histológico en una región con características étnicas y socioculturales muy particulares. En ella habita la mayor parte de los ecuatorianos de raza negra, sobre todo en el sector norte, mientras que la población amerindia autóctona es está totalmente mezclada con la población negra, blanca y mestiza, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) del Ecuador (84).

Se debe resaltar que la mayor parte de las mujeres infectadas por VPH eran amas de casa, lo cual plantea nuevas interrogantes sobre el impacto de la falta de conocimiento y del machismo en las infecciones de transmisión sexual, específicamente el VPH, agente etiológico del CaCU, segunda causa de muerte en la mujer ecuatoriana, y la primera causa de muerte por cáncer (12). La cultura e idiosincrasia de las poblaciones puede influir en diferentes aspectos de la salud sexual y reproductiva, pues sus costumbres y hábitos dentro de las comunidades pueden modificar los niveles de transmisión de diversas infecciones y así el comportamiento de ciertas enfermedades de transmisión sexual que se presentan en otras poblaciones, con características diferentes.

Por otro lado, a partir de este estudio se cuenta con evidencias para que la Autoridad Sanitaria Nacional (ASN) del Ecuador considere estos factores en sus estrategias para el control y la prevención del VPH y del CaCU.

La prevalencia elevada de los tipos de VPH de alto riesgo 58, 31, 33 y 35 plantea una actualización del esquema vacunal contra el VPH en el Ecuador, dado que estos genotipos no forman parte de las vacunas comerciales bivalentes que son empleadas actualmente en el plan de inmunización ejercido por la Autoridad Sanitaria Nacional. Estos hallazgos coinciden parcialmente con los resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas en mujeres del Cañar donde el genotipo con mayor prevalencia no es el 16, sino el VPH 31, y también el VPH 58 se observó en una frecuencia elevada (40), coincidiendo con los tipos de VPH encontrados con porcentajes significativos en el presente estudio.

El uso de los métodos moleculares de detección y tipificación acompañados del uso de la citología cervical, la colposcopia y la histología, así como la información clínica; constituyen herramientas muy importantes en el manejo, control y monitoreo de las pacientes infectadas. Estas herramientas podrían ser utilizadas por los hospitales del MSP y la red de centros oncológicos nacionales para dar prioridad a aquellas pacientes que requieren intervención médica a corto plazo.

El hallazgo de la circulación del linaje asiático del VPH 16 en mujeres de la región costera del Ecuador, es un elemento que debería ser considerado en el manejo y pronóstico de las pacientes infectadas con este genotipo viral, pues de acuerdo a la literatura científica, son las que poseen un riesgo incrementado para desarrollar CaCU a corto plazo (213).

El Ecuador es un país multicultural y multiétnico, integrado por diversos grupos culturales, para los que la sexualidad es un tema que constituye un verdadero tabú. Esos elementos, acompañados del analfabetismo, la pobreza, la falta de hábitos higiénicos, así como las pocas facilidades de acceso a los servicios de salud y a los programas de atención primaria, como es el caso del examen citológico periódico, son factores que están relacionados con una mayor incidencia y mortalidad por CaCU. Este aspecto constituye un indicador de subdesarrollo económico y social (168, 170-173). La elevada prevalencia de infección por VPH, particularmente de alto riesgo oncogénico indica la necesidad de incorporar la población del Litoral del Ecuador en los programas de detección precoz del cáncer cervicouterino y promover campañas para prevenir las ITS y para la educación sexual y reproductiva.

---

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES**

---



## V. CONCLUSIONES

- La elevada circulación de genotipos oncogénicos del VPH indica que la población femenina mayor de 30 años, con lesiones cervicales, residente en la región Litoral del Ecuador tiene un alto riesgo de desarrollar lesiones precursoras y cáncer cervicouterino, lo que demuestra la necesidad de acciones de salud para la detección precoz de este tipo de cáncer.
- La evidencia de que el VPH 58 es el genotipo más prevalente en las mujeres con lesiones citológicas en la región Litoral del Ecuador, demuestra un patrón de circulación viral diferente al establecido para varias regiones de Latinoamérica y del mundo, alertando sobre la necesidad de reevaluar la aplicación de la vacuna bivalente o tetravalente contra el VPH en esta comunidad.
- Los resultados demuestran que ciertas combinaciones de genotipos de VPH son factores de riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales premalignas y cáncer cervicouterino, en las mujeres del Litoral de Ecuador.
- La circulación del linaje asiático de VPH 16 en mujeres de la región Litoral es un elemento que debería ser considerado en el manejo y pronóstico de las pacientes infectadas con este genotipo viral, pues existe evidencia científica sobre el riesgo incrementado que tienen las variantes asiáticas para desarrollar cáncer cervicouterino a corto plazo.
- Las diferencias en los genotipos circulantes y las variantes intratípicas de VPH 16 y 58 identificadas en las mujeres de la costa ecuatoriana, revelan la influencia de factores sociodemográficos, clínico-epidemiológicos y probablemente genéticos de este grupo poblacional, que pudieran favorecer infecciones persistentes y cáncer cervicouterino por estos genotipos, en mujeres mayores de 30 años.

---

**CAPÍTULO VI**  
**RECOMENDACIONES**

---



## **VI. RECOMENDACIONES**

- Realizar investigaciones de tipo social y biomédico que analicen el impacto los factores de riesgo y la infección por VPH en mujeres del Litoral del Ecuador, con y sin lesiones citológicas.
- Profundizar en el papel del VPH 58 y sus variantes genéticas en el resto de la población femenina del Litoral del Ecuador para evaluar su impacto en la aparición y evolución del cáncer cervicouterino a corto y largo plazo en esta región geográfica.
- Alertar a la Autoridad Sanitaria Nacional del Ecuador sobre la necesidad de establecer estrategias para el control y la prevención del VPH dentro del programa de detección precoz del cáncer cervicouterino, así como evaluar el impacto de la vacunación contra el VPH en esta población.

---

**CAPÍTULO VII**  
**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288(2):F55-78.
2. zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;186:131-56.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res*. 1989;49(17):4677-81.
4. 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.
5. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2019;30 Suppl 5:F12-23.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
7. Negrin LGC. Epidemiology of cervical cancer in Latin America. *Ecancer*. 2015;9:1-14.
8. Villa LL. Cervical cancer in Latin America and the Caribbean: the problem and the way to solutions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(9):1409-13.
9. Pereira-Scalabrino A, Almonte M, Dos-Santos-Silva I. Country-level correlates of cervical cancer mortality in Latin America and the Caribbean. *Salud Publica Mex*. 2013;55(1):5-15.
10. Zhang X, Zeng Q, Cai W, Ruan W. Trends of cervical cancer at global, regional, and national level: data from the Global Burden of Disease study 2019. *BMC Public Health*. 2021;21(1):894.
11. Bychkovsky BL, Ferreyra ME, Strasser-Weippl K, Herold CI, de Lima Lopes G, Jr., Dizon DS, et al. Cervical cancer control in Latin America: A call to action. *Cancer*. 2016;122(4):502-14.
12. 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), 2021.
13. Henríquez-Trujillo R. Estimación de la carga de enfermedad por cáncer de cuello uterino en Ecuador. *Revista Médica Vozandes*. 2016;27(1):53-5.
14. 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;23(10):1997-2008.
15. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.



16. Rosillon D, Baril L, Del Rosario-Raymundo MR, Wheeler CM, Skinner SR, Garland SM, et al. Risk of newly detected infections and cervical abnormalities in adult women seropositive or seronegative for naturally acquired HPV-16/18 antibodies. *Cancer Med.* 2019;8(10):4938-53.
17. Castellsague X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol.* 2012;84(6):947-56.
18. Tenjimbayashi Y, Onuki M, Hirose Y, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, et al. Whole-genome analysis of human papillomavirus genotypes 52 and 58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer.* 2017;12:44.
19. Zhou HL, Zhang W, Zhang CJ, Wang SM, Duan YC, Wang JX, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in Chinese women between 1991 and 2016: A systematic review. *J Infect.* 2018;76(6):522-8.
20. Picconi MA, Villa LL. Human Papillomavirus Research in Latin America. In: Ludert JE, Pujol FH, Arbiza J, editors. *Human Virology in Latin America.* Argentina: Springer International Publishing; 2017.
21. 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;20(1):889.
22. Colpani V, Soares Falcetta F, Bacao 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.
23. 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;55:51-5.
24. Garcia Muentes GD, Garcia Rodriguez LK, Burgos Galarraga RI, Almeida Carpio F, Ruiz Cabezas JC. Genotypes distribution of human papillomavirus in cervical samples of Ecuadorian women. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology.* 2016;19(1):160-6.
25. Dalgo Aguilar P, Lojan Gonzalez C, Cordova Rodriguez A, Acurio Paez K, Arevalo AP, Bobokova J. Prevalence of High-Risk Genotypes of Human Papillomavirus: Women Diagnosed with Premalignant and Malignant Pap Smear Tests in Southern Ecuador. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2017;2017:8572065.
26. Muentes GDG, García MAM, Galárraga RIB, Ollague K, Wachter CV, Cabezas JCR. Frequency and distribution of HPV genotypes in 800 genital samples of Ecuadorian men and women from the city of Guayaquil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019;61:e41.
27. González Andrade F, Torres Serrano C, Pinos J, Grijalva MdC, Aguinaga Romero G. Diagnostic screening of HPV genotypes in 555 Ecuadorian mestizo women of seven provinces, and comparison with other Latino American populations. *Arch med.* 2020;20(1):86-96.

28. Falcón-Córdova D, Carrero Y. Situación actual de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) asociado a lesiones cervicales en mujeres del Ecuador. Revisión Sistemática. KASMER. 2021;49 ((1) ):e49133050.
29. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. 2021;13(2).
30. Diaz D, Santander MA, Chavez JA. HPV-16 E6 and E7 oncogene expression is downregulated as a result of Mdm2 knockdown. *Int J Oncol*. 2012;41(1):141-6.
31. Totaro ME. Análisis de los Genes E6, E7 y L1 del virus Papiloma Humano tipo 16 como marcadores pronóstico tempranos de la progresión de lesiones de Cuello Uterino [PhD]. Posada, Misiones, Argentina: Universidad Nacional de Misiones. ; 2022.
32. Zhang L, Yang B, Zhang A, Zhou A, Yuan J, Wang Y, et al. Association between human papillomavirus type 16 E6 and E7 variants with subsequent persistent infection and recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization. *J Med Virol*. 2016;88(11):1982-8.
33. Mainali B, Schabath MB, Sudenga SL, Ye Y, Wiener HW, Villa LL, et al. Variants in immune-related genes and genital HPV 16 persistence in men. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)*. 2018;7:11-4.
34. Sait K, Turki R, Abuzenadah AM, Jiffiri OH, Bohmaidah A, Sohrab SS. Genetic diversity and phylogenetic analysis of HPV 16 & 18 variants isolated from cervical specimens of women in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019;26(2):317-24.
35. Tan G, Duan M, Li Y, Zhang N, Zhang W, Li B, et al. Distribution of HPV 16 E6 gene variants in screening women and its associations with cervical lesions progression. *Virus Res*. 2019;273:197740.
36. da Silva RL, da Silva Batista Z, Bastos GR, Cunha APA, Figueiredo FV, de Castro LO, et al. Role of HPV 16 variants among cervical carcinoma samples from Northeastern Brazil. *BMC Womens Health*. 2020;20(1):162.
37. Pérez-Quintanilla M, Méndez-Martínez R, Vázquez-Vega S, Espinosa-Romero R, Sotelo-Regil R, Pérez-Montiel MD, et al. High prevalence of human papillomavirus and European variants of HPV 16 infecting concomitantly to cervix and oral cavity in HIV positive women. *PLoS One*. 2020;15(4):e0227900.
38. Islami F, Fedewa SA, Jemal A. Trends in cervical cancer incidence rates by age, race/ethnicity, histological subtype, and stage at diagnosis in the United States. *Prev Med*. 2019;123:316-23.
39. Osazuwa-Peters N, Adjei Boakye E, Rohde RL, Ganesh RN, Moiyadi AS, Hussaini AS, et al. Understanding of risk factors for the human papillomavirus (HPV) infection based on gender and race. *Sci Rep*. 2019;9(1):297.
40. 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;3(1):307-17.

41. Carrión-Ordóñez JI, Soto-Brito Y, Pupo-Antúnez M, Loja-Chango R. Infección por Virus del Papiloma Humano y citología cérvico-vaginal en mujeres indígenas del Cañar, Ecuador. 2019. *Bionatura*. 2019;4(3):934-8.
42. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol*. 1907;48:12-7.
43. Walpusk JA, Galambos C. Electron microscopy identifies virus in cells lifted from microscopic slides: a useful method for a unique circumstance. *Pediatr Dev Pathol*. 2009;12(5):361-5.
44. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
45. Mammas IN, Spandidos DA. Four historic legends in human papillomaviruses research. *J buon*. 2015;20(2):658-61.
46. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1977;78:1-30.
47. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J Cancer Res Ther*. 2011;7(2):120-7.
48. Avendaño LF, Ferrés M, Luchsinger V, Spencer E. *Virología clínica*. Segunda Edición. Santiago, Chile: Editorial Mediterráneo Ltda; 2018. 379 p.
49. Howley PM, Schiller JT, Lowy DR. Papillomavirus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. II. 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1662-700.
50. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53(Suppl 2):S166-71.
51. Bernard HU. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol*. 2013;18:357-61.
52. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*. 2018;99(8):989-90.
53. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25 Suppl 1(Suppl Suppl 1):2-23.
54. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
55. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-4.
56. de Sanjose S, Brotons M, Pavon MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2-13.
57. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013;445(1-2):232-43.

58. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985;145(1):181-5.
59. Chen Z, de Freitas LB, Burk RD. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1249:3-26.
60. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012;86(12):6855-61.
61. Cornet I, Gheit T, Iannacone MR, Vignat J, Sylla BS, Del Mistro A, et al. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer*. 2013;108(1):240-4.
62. Ramirez-Pineda AT, González MI, Castañeda-Vanegas KM, Agudelo-Fernández MC, López-Urán C, Sánchez-Vásquez GI. Filogenia y oncogénesis del virus del papiloma humano: una aproximación translacional al descubrimiento de biomarcadores para la detección de lesiones precancerosas de cérvix. *Rev Acad Colomb Cienc Ex Fis Nat*. 2019;43(168):351-65.
63. Bernard HU. Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol*. 1994;2(4):140-3.
64. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology*. 2018;516:86-101.
65. Gottschling M, Stamatakis A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso A, Bravo IG. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol*. 2007;24(5):1242-58.
66. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*. 1993;67(11):6424-31.
67. Pimenoff VN, Bravo I. Sexual Transmission of HPVs from Neanderthals to Modern Humans. *HPV World*. 2019;77.
68. Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, Wood CE, Ruiz JC, et al. Niche adaptation and viral transmission of human papillomaviruses from archaic hominins to modern humans. *PLoS Pathog*. 2018;14(11):e1007352.
69. Pimenoff VN, de Oliveira CM, Bravo IG. Transmission between archaic and modern human ancestors during the evolution of the oncogenic human papillomavirus 16. *Molecular biology and evolution*. 2017;34(1):4-19.
70. Chen Z, Ho WCS, Boon SS, Law PTY, Chan MCW, DeSalle R, et al. Ancient Evolution and Dispersion of Human Papillomavirus 58 Variants. *J Virol*. 2017;91(21).
71. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjose S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16086.

72. Mirabello L, Clarke MA, Nelson CW, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses*. 2018;10(2).
73. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*. 2017;543(7645):378-84.
74. Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF, Gómez-Macias GS, Fajardo-Ramírez OR, Treviño V, et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infect Genet Evol*. 2018;61:134-44.
75. de la Garza-Salazar JG, Morales-Vasquez F, Meneses-García A. *Cervical Cancer*. 1.a ed. de la Garza-Salazar JG, Morales-Vasquez F, Meneses-García A, editors: Springer International Publishing; 2017. 277 p.
76. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Eienkel J, Hoekel M, et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*. 2003;22(25):3977-84.
77. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis*. 2009;9:119.
78. Barbisan G. Análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes asociados a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y la progresión neoplásica: un modelo poligénico de susceptibilidad al cáncer cervical. La Plata, Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2015.
79. Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:14-26.
80. Memon A, Bannister P. Epidemiology of Cervical Cancer. In: Farghaly SA, editor. *Uterine Cervical Cancer*. Switzerland: Springer International Publishing; 2019. p. 1-16.
81. Vargas Hernandez VM. Situation of the Cervical Cancer in Latin America. *Clin Oncol* 2018;3:1478.
82. Vaccarella S, Laversanne M, Ferlay J, Bray F. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: Regional inequalities and changing trends. *Int J Cancer*. 2017;141(10):1997-2001.
83. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer. Ecuador Fact sheets. Human Papillomavirus and Related Cancers. IARC-International Agency for Research on Cancer, 2021.
84. INEC-Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Registro estadístico de defunciones generales. [Internet]. 2020. Available from: [https://public.tableau.com/profile/instituto.nacional.de.estad.stica.y.censos.inec.#!/vizhome/Registroestadsticodedefuncionesgenerales\\_15907230182570/Men](https://public.tableau.com/profile/instituto.nacional.de.estad.stica.y.censos.inec.#!/vizhome/Registroestadsticodedefuncionesgenerales_15907230182570/Men).
85. Soto-De Leon S, Camargo M, Sanchez R, Munoz M, Perez-Prados A, Purroy A, et al. Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factors. *PLoS One*. 2011;6(2):e14705.

86. Capote LG. Epidemiology of cervical cancer in Latin America. *Ecancer*. 2015;9:577.
87. Ribeiro AA, Costa MC, Alves RR, Villa LL, Saddi VA, Carneiro MA, et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer*. 2015;10:16.
88. Cao M, Chenzhang Y, Ding X, Zhang Y, Jing Y, Chen Z. Genetic variability and lineage phylogeny of human papillomavirus type-16 and -53 based on the E6, E7, and L1 genes in Southwest China. *Gene*. 2016;592(1):49-59.
89. Fu Xi L, Schiffman M, Ke Y, Hughes JP, Galloway DA, He Z, et al. Type-dependent association between risk of cervical intraepithelial neoplasia and viral load of oncogenic human papillomavirus types other than types 16 and 18. *Int J Cancer*. 2017;140(8):1747-56.
90. Kim J, Kim BK, Jeon D, Lee CH, Roh JW, Kim JY, et al. Type-Specific Viral Load and Physical State of HPV Type 16, 18, and 58 as Diagnostic Biomarkers for High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or Cervical Cancer. *Cancer Res Treat*. 2020;52(2):396-405.
91. Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):d403.
92. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1048-56.
93. Bernard E, Pons-Salort M, Favre M, Heard I, Delarocque-Astagneau E, Guillemot D, et al. Comparing human papillomavirus prevalences in women with normal cytology or invasive cervical cancer to rank genotypes according to their oncogenic potential: a meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):373.
94. Mirabello L, Yeager M, Cullen M, Boland JF, Chen Z, Wentzensen N, et al. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(9).
95. Carozzi F, De Marco L, Gillio-Tos A, Del Mistro A, Girlando S, Baboci L, et al. Age and geographic variability of human papillomavirus high-risk genotype distribution in a large unvaccinated population and of vaccination impact on HPV prevalence. *J Clin Virol*. 2014;60(3):257-63.
96. Ferreira MT, Giulia Gonçalves M, Mendoza López RV, Sichero L. Genetic variants of HPV-16 and their geographical and anatomical distribution in men: A systematic review with meta-analysis. *Virology*. 2021;558:134-44.
97. Cornet I, Gheit T, Clifford GM, Combes JD, Dalstein V, Franceschi S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):4.
98. Dai MZ, Qiu Y, Di XH, Shi WW, Xu HH. Association of cervical carcinogenesis risk with HPV16 E6 and E7 variants in the Taizhou area, China. *BMC Cancer*. 2021;21(1):769.
99. Hadami K, Saby C, Dakka N, Collin G, Attaleb M, Khyatti M, et al. Degradation of p53 by HPV16-E6 variants isolated from cervical cancer specimens of Moroccan women. *Gene*. 2021;791:145709.

100. Kim N, Park JS, Kim JE, Park JH, Park H, Roh EY, et al. Fifteen new nucleotide substitutions in variants of human papillomavirus 18 in Korea : Korean HPV18 variants and clinical manifestation. *Virology*. 2020;17(1):70.
101. Chen AA, Gheit T, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *J Virol*. 2015;89(20):10680-7.
102. Silva RCO, Lima RCP, Cordeiro MN, Dos Santos DL, Pena LJ, Gurgel A, et al. Functional evaluation of human papillomavirus type 31 long control region variants. *Genomics*. 2020;112(6):5066-71.
103. Law PT, Boon SS, Hu C, Lung RW, Cheung GP, Ho WC, et al. Oncogenic comparison of human papillomavirus type 58 E7 variants. *J Cell Mol Med*. 2019;23(2):1517-27.
104. Xi LF, Schiffman M, Koutsky LA, Hughes JP, Hulbert A, Shen Z, et al. Variant-specific persistence of infections with human papillomavirus Types 31, 33, 45, 56 and 58 and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2016;139(5):1098-105.
105. 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;80(11):1959-65.
106. Brown CR, Leon ML, Munoz K, Fagioni A, Amador LG, Frain B, et al. Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(7):629-36.
107. Gonzalez-Andrade F, Sanchez D. HPV genotyping in anogenital abnormal samples of Ecuadorian women. *Cancer Biomark*. 2009;5(4):225-32.
108. 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.
109. Cárdenas O, Cabrera J, Campoverde A. Prevalencia de genotipos del Papiloma Virus en mujeres de Cuenca. *Rev Fac Cienc Méd Univ Cuenca*. 2014;32(1):16-28.
110. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*. 2013.
111. Rozman Borstnar C, Cardellach F. *Medicina Interna 18 Edición*. Farreras, Rozman, editors: Elsevier Health Sciences; 2017.
112. Kodaman N, Sobota RS, Mera R, Schneider BG, Williams SM. Disrupted human-pathogen co-evolution: a model for disease. *Frontiers in genetics*. 2014;5:290.
113. Dutta S, Singh RK, Mandal RK, Roychoudhury S, Basu P, Panda CK. Alteration of Human Papillomavirus Type 16 Genetic and Epigenetic Profiles in Cervical Cancer Patients Is Indicative of Poor Disease Prognosis: A Cohort Analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2016;26(4):750-7.
114. Kiseleva VI, Mkrtychyan LS, Ivanov SA, Lyubina LV, Bezyaeva GP, Panarina LV, et al. The Presence of Human Papillomavirus DNA Integration is Associated with Poor Clinical Results in Patients with Third-Stage Cervical Cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2019;168(1):87-91.
115. Nayar R, Wilbur DC. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. Third ed. Nayar R, Wilbur DC, editors. Chicago , IL. USA: Springer; 2014. 342 p.

116. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-9.
117. Richart RM. Screening. The next century. *Cancer*. 1995;76(10 Suppl):1919-27.
118. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res*. 2017;231:21-33.
119. Christensen ND, Budgeon LR. Vaccines and immunization against human papillomavirus. *Curr Probl Dermatol*. 2014;45:252-64.
120. Jee B, Yadav R, Pankaj S, Shahi SK. Immunology of HPV-mediated cervical cancer: current understanding. *International Reviews of Immunology*. 2021;40(5):359-78.
121. Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus immune evasion strategies target the infected cell and the local immune system. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:682.
122. Yadav R, Zhai L, Tumban E. Virus-like Particle-Based L2 Vaccines against HPVs: Where Are We Today? *Viruses*. 2020;12(1).
123. Bharadwaj M, Hussain S, Nasare V, Das BC. HPV & HPV vaccination: issues in developing countries. *Indian J Med Res*. 2009;130(3):327-33.
124. Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*. 2012;7(1):38.
125. Virus del papiloma humano. 2020. In: Manual de vacunas en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP. Available from: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-42>.
126. Haghshenas MR, Mousavi T, Kheradmand M, Afshari M, Moosazadeh M. Efficacy of Human Papillomavirus L1 Protein Vaccines (Cervarix and Gardasil) in Reducing the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Meta-analysis. *International journal of preventive medicine*. 2017;8:44.
127. Gilca V, Sauvageau C, Panicker G, De Serres G, Ouakki M, Unger ER. Antibody persistence after a single dose of quadrivalent HPV vaccine and the effect of a dose of nonavalent vaccine given 3-8 years later - an exploratory study. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(2):503-7.
128. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med*. 2015;372(8):711-23.
129. Shah PD, Calo WA, Gilkey MB, Boynton MH, Alton Dailey S, Todd KG, et al. Questions and Concerns About HPV Vaccine: A Communication Experiment. *Pediatrics*. 2019;143(2).
130. 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;76 ( Pt 4):1057-62.



131. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4):901-5.
132. Camargo M, Soto-De Leon S, Sanchez R, Munoz M, Vega E, Beltran M, et al. Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. *J Virol Methods.* 2011;178(1-2):68-74.
133. 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;8:100169.
134. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
135. Depuydt CE, Boulet GA, Horvath CA, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med.* 2007;11(4):881-91.
136. Barzon L, Militello V, Pagni S, Palu G. Comparison of INNO-LiPA genotyping extra and hybrid capture 2 assays for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes. *J Clin Virol.* 2012;55(3):256-61.
137. Zhao PY, Jiang HC, Li Y, Wang JB, Zhang TT, Liu CH, et al. Comparison of the cervista HPV HR test and luminex XMAP technology for the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;214:150-5.
138. Del Pino M, Alonso I, Rodriguez-Trujillo A, Bernal S, Geraets D, Guimera N, et al. Comparison of the analytical and clinical performance of five tests for the detection of human papillomavirus genital infection. *J Virol Methods.* 2017;248:238-43.
139. Duan L, Du H, Wang C, Huang X, Qu X, Shi B, et al. The effectiveness of HPV viral load, reflected by Cobas 4800 HPV-Ct values for the triage of HPV-positive women in primary cervical cancer screening: Direct endocervical samples. *PLoS One.* 2020;15(5):e0232107.
140. Wang S, He X, Meng F, Pan Q, Zhang L, Zeng J. Application of the Cobas 4800 System for the Detection of High-Risk Human Papillomavirus in 5650 Asymptomatic Women. *BioMed research international.* 2020;2020:1635324.
141. Cornall AM, Poljak M, Garland SM, Phillips S, Machalek DA, Tan JH, et al. HPV genotype-specific concordance between EuroArray HPV, Anyplex II HPV28 and Linear Array HPV Genotyping test in Australian cervical samples. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands).* 2017;4:79-84.
142. OPS/OMS. Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. Manual para gerentes de programas de salud. Washington, DC: OPS-Organización Panamericana de la Salud. ; 2016. p. 77.

143. Jung S, Lee B, Lee KN, Kim Y, Oh EJ. Clinical Validation of Anyplex II HPV HR Detection Test for Cervical Cancer Screening in Korea. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(3):276-80.
144. Cornall AM, Poljak M, Garland SM, Phillips S, Tan JH, Machalek DA, et al. Anyplex II HPV28 detection and Anyplex II HPV HR detection assays are highly concordant with other commercial assays for detection of high-risk HPV genotypes in women with high grade cervical abnormalities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(3):545-51.
145. Pasquier C, Saune K, Raymond S, Boisneau J, Courtade M, Izopet J. Comparison of Cobas(R) HPV and Anyplex II HPV28 assays for detecting and genotyping human papillomavirus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(1):25-7.
146. 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 de la Fac de Cien Méd de la Univ de Cuenca.* 2017(1):7-19.
147. Weston G, Dombrowski C, Harvey MJ, Iftner T, Kyrgiou M, Founta C, et al. Use of the Aptima mRNA high-risk human papillomavirus (HR-HPV) assay compared to a DNA HR-HPV assay in the English cervical screening programme: a decision tree model based economic evaluation. *BMJ Open.* 2020;10(3).
148. Gravitt PE, Manos MM. Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. *IARC Sci Publ.* 1992(119):121-33.
149. Maniatis F, Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor. Laboratory Press; 2000.
150. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-61.
151. de Araujo MR, De Marco L, Santos CF, Rubira-Bullen IR, Ronco G, Pennini I, et al. GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. *J Clin Virol.* 2009;45(2):90-5.
152. Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 5):1181-8.
153. Pientong C, Wongwarissara P, Ekalaksananan T, Swangphon P, Kleebkaow P, Kongyingyoes B, et al. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. *Virology.* 2013;10:30.
154. Frati E, Bianchi S, Colzani D, Zappa A, Orlando G, Tanzi E. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). *Infect Genet Evol.* 2011;11(8):2119-24.
155. Lurchachaiwong W, Junyangdikul P, Payungporn S, Chansaenroj J, Sampathanukul P, Tresukosol D, et al. Entire genome characterization of human papillomavirus type 16 from infected Thai women with different cytological findings. *Virus Genes.* 2009;39(1):30-8.

156. Zhingre A. Polimorfismos del gen L1 y E6 del Virus Papiloma Humano 16, en mujeres con lesiones cérvico-uterinas precancerosas y cancerosas en la región Litoral del Ecuador. . Guayaquil, Ecuador. 2016.
157. Chan PK, Luk AC, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Konno R, et al. Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. *J Infect Dis.* 2011;203(11):1565-73.
158. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29(8):1969-73.
159. Tamura K, Kumar S. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Molecular biology and evolution.* 2002;19(10):1727-36.
160. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution.* 2018;35(6):1547.
161. Martínez D, Albín J, Cabaleiro J, Pena T, Rivera F, Blanco V. El criterio de información de Akaike en la obtención de modelos estadísticos de Rendimiento. 2009:439-44.
162. Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, Burk RD. Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol.* 2009;83(3):1443-55.
163. Rector A, Lemey P, Tachezy R, Mostmans S, Ghim SJ, Van Doorslaer K, et al. Ancient papillomavirus-host co-speciation in Felidae. *Genome Biology.* 2007;8(4):R57.
164. Helsinki. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2018;310(20):2191-94.
165. Van Delden J, Van der Graaf R. Revised CIOMS International Ethical Guidelines for Health-Related Research Involving Humans. *JAMA.* 2016;317(2):135-6.
166. Jaruseviciene L, Orozco M, Ibarra M, Ossio FC, Vega B, Auquilla N, et al. Primary healthcare providers' views on improving sexual and reproductive healthcare for adolescents in Bolivia, Ecuador, and Nicaragua. *Glob Health Action.* 2013;6:20444.
167. Mendoza L, Mongelos P, Paez M, Castro A, Rodriguez-Riveros I, Gimenez G, et al. Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay: a cross-sectional analytical study. *BMC Infect Dis.* 2013;13:531.
168. Nugus P, Desalliers J, Morales J, Graves L, Evans A, Macaulay AC. Localizing Global Medicine: Challenges and Opportunities in Cervical Screening in an Indigenous Community in Ecuador. *Qual Health Res.* 2018;28(5):800-12.
169. Bedoya-Pilozo CH, Medina Magues LG, Espinosa-Garcia M, Sanchez M, PARRALES Valdivez 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;50(2):136-46.
170. Urrutia MT, Concha X, Riquelme G, Padilla O. [Knowledge and preventive behaviors related to cervical cancer and human papiloma virus in a group of Chilean adolescents]. *Rev Chilena Infectol.* 2012;29(6):600-6.

171. Demers AA, Shearer B, Severini A, Lotocki R, Kliwer EV, Stopera S, et al. Distribution of human papillomavirus types, cervical cancer screening history, and risk factors for infection in Manitoba. *Chronic Dis Inj Can.* 2012;32(4):177-85.
172. Lee CH, Peng CY, Li RN, Chen YC, Tsai HT, Hung YH, et al. Risk evaluation for the development of cervical intraepithelial neoplasia: Development and validation of risk-scoring schemes. *Int J Cancer.* 2015;136(2):340-9.
173. Moore SP, Forman D, Pineros M, Fernandez SM, de Oliveira Santos M, Bray F. Cancer in indigenous people in Latin America and the Caribbean: a review. *Cancer Med.* 2014;3(1):70-80.
174. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu.* 2020;32(6):720-8.
175. Belinson S, Smith JS, Myers E, Olshan A, Belinson J, Pretorius R, et al. Descriptive evidence that risk profiles for cervical intraepithelial neoplasia 1, 2, and 3 are unique. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(9):2350-5.
176. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer.* 2013;108(1):234-9.
177. Hellberg D. Sex steroids and cervical cancer. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3045-54.
178. Salavatiha Z, Farahmand M, Shoja Z, Jalilvand S. A meta-analysis of human papillomavirus prevalence and types among Iranian women with normal cervical cytology, premalignant lesions, and cervical cancer. *J Med Virol.* 2021;93(8):4647-58.
179. Farahmand Z, Soleimanjahi H, Garshasbi M, Hasanzadeh M, Zafari E. Distribution of the most common types of HPV in Iranian women with and without cervical cancer. *Women Health.* 2021;61(1):73-82.
180. Liao L, Cheng H, Zeng F, Zhou W, Ding Y. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes among women with high-grade squamous intraepithelial lesion and invasive cervical cancer in Ganzhou, China. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(3):e22708.
181. Mejia L, Munoz 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.
182. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789-99.
183. Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortes-Gutierrez EI, Salgado-Bernabe ME, Ramos-Gonzalez NP, Ortega-Cervantes L, et al. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol.* 2015;87(5):871-84.
184. Badano I, Pedrozo RW, Ruiz Diaz LS, Galuppo JA, Picconi MA, Campos RH, et al. Detección del virus papiloma humano (HPV) y citología de Papanicolaou en mujeres de bajos

recursos de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43(4):263-7.

185. Bruno A, Serravalle K, Travassos AG, Lima BG. Genotype distribution of human papillomavirus in women from the state of Bahia, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014;36(9):416-22.

186. Wang XC, Sun LQ, Ma L, Li HX, Wang XL, Wang X, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus among women from Henan, China. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(17):7333-6.

187. Sun B, He J, Chen X, He M, He Z, Wang Y, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection in Harbin, Northeast China. *Arch Virol.* 2014;159(5):1027-32.

188. Ortega-Cervantes L, Aguilar-Lemarroy A, Rojas-Garcia AE, Barron-Vivanco BS, Vallejo-Ruiz V, Leon DC, et al. Human papilloma virus genotypes in women from Nayarit, Mexico, with squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *International journal of health sciences.* 2016;10(3):327-38.

189. Guilarte-García E, Soto-Brito Y, Kourí-Cardellá V, Limia-León CM, Sánchez-Alvarez ML, Rodríguez-Díaz AE, et al. Circulation of Human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in Cuban Women. *MEDICC Review.* 2020;22(1):17-27.

190. Vaccarella S, Soderlund-Strand A, Franceschi S, Plummer M, Dillner J. Patterns of human papillomavirus types in multiple infections: an analysis in women and men of the high throughput human papillomavirus monitoring study. *PLoS One.* 2013;8(8):716-17.

191. 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;149((7)):287-92.

192. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, Zuna RE, Gold MA, Allen RA, et al. Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Int J Cancer.* 2009;125(9):2151-8.

193. 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;209(6):855-64.

194. Giambi C, Donati S, Carozzi F, Salmaso S, Declich S, Atti ML, et al. A cross-sectional study to estimate high-risk human papillomavirus prevalence and type distribution in Italian women aged 18-26 years. *BMC Infect Dis.* 2013;13:74.

195. de Oliveira GR, Vieira VC, Avila EC, Finger-Jardim F, Caldeira TD, Gatti FA, et al. Human papillomavirus type distribution and HPV16 intratype diversity in southern Brazil in women with and without cervical lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(7):492-8.

196. 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;125(2):138-43.

197. Badano I, Totaro ME, Culasso AC, Sanabria DJ, Schurr TG, Balette IC, et al. Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. *Infect Genet Evol.* 2015;29:103-9.
198. Lopera EA, Baena A, Florez V, Montiel J, Duque C, Ramirez T, et al. Unexpected inverse correlation between Native American ancestry and Asian American variants of HPV16 in admixed Colombian cervical cancer cases. *Infect Genet Evol.* 2014;28:339-48.
199. Mendoza L, Picconi MA, Mirazo S, Mongelos P, Gimenez G, Basiletti J, et al. Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013;122(1):44-7.
200. Rivera F, Ortega H, Larreátegui P, Riaño-Alcalá P. Migración forzada de colombianos. Medellín: Editorial Corporación Región. 2007.
201. Ramos Ordonez M. Migración peruana a Ecuador, ¿ En espera de una regulación definitiva? Boletín de Coyuntura del Sistema del Sistema de Información de Migraciones Andinas-SIMA. 2010.
202. Achilli A, Perego UA, Bravi CM, D. CM, Kong QP, Woodward SR, et al. The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 2008;3(1):e1764.
203. González-Andrade F, Sánchez D, González-Solórzano J, Gascón S, Martínez-Jarreta B. Sex-specific genetic admixture of mestizos, amerindian kichwas, and afro-ecuadorans from ecuador. *Human biology.* 2007;79(1):51-77.
204. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(17):1325-30.
205. Mane A, Patil L, Limaye S, Nirmalkar A, Kulkarni-Kale U. Characterization of major capsid protein (L1) variants of Human papillomavirus type 16 by cervical neoplastic status in Indian women: Phylogenetic and functional analysis. *J Med Virol.* 2020;92(8):1303-8.
206. Chan PK, Luk AC, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Konno R, et al. Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. *J Infect Dis.* 2011;203(11):1565-73.
207. Marin HM, Torres C, Deluca GD, Mbayed VA. Human papillomavirus detection in Corrientes, Argentina: High prevalence of type 58 and its phylodynamics. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47(4):302-11.
208. Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2005;79(21):13630-40.
209. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol.* 2005;79(11):7014-23.
210. Chang YJ, Chen HC, Lee BH, You SL, Lin CY, Pan MH, et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. *Int J Cancer.* 2011;129(4):965-73.

211. Ou Z, Chen Z, Zhao Y, Lu H, Liu W, Li W, et al. Genetic signatures for lineage/sublineage classification of HPV16, 18, 52 and 58 variants. *Virology*. 2021;553:62-9.
212. Vargas-Robles D, Magris M, Morales N, de Koning MNC, Rodriguez I, Nieves T, et al. High Rate of Infection by Only Oncogenic Human Papillomavirus in Amerindians. *mSphere*. 2018;3(3).
213. Clifford GM, Tenet V, Georges D, Alemany L, Pavón MA, Chen Z, et al. Human papillomavirus 16 sub-lineage dispersal and cervical cancer risk worldwide: Whole viral genome sequences from 7116 HPV16-positive women. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)*. 2019;7:67-74.
214. Zambrano AK, Gaviria A, Cobos-Navarrete S, Gruezo C, Rodríguez-Pollit C, Armendáriz-Castillo I, et al. The three-hybrid genetic composition of an Ecuadorian population using AIMs-InDels compared with autosomes, mitochondrial DNA and Y chromosome data. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-8.
215. Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero Ldel C, Jiménez-López MA, Garzón-Barrientos VH, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña HA, et al. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virol J*. 2015;12:29.
216. Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NA, Miranda AE, Spano LC, et al. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One*. 2014;9(7):e100746.
217. Antaño-Arias R, Del Moral-Hernández O, Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero LDC, Navor-Hernández JA, Leyva-Vázquez MA, et al. E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16 Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2021;10(6).
218. Negi SS, Sharma K, Sharma D, Singh P, Agarwala P, Hussain N, et al. Genetic analysis of human papilloma virus 16 E6/E7 variants obtained from cervical cancer cases in Chhattisgarh, a central state of India. *Virusdisease*. 2021;32(3):492-503.
219. Wang J, Guo Y, Wang H, Li Y, Zhang L, Wang Z, et al. Genetic diversity of E6, E7 and the long control region in human papillomavirus type 16 variants in Beijing, China. *Biochemistry and biophysics reports*. 2022;31:101286.
220. Mosmann JP, Monetti MS, Frutos MC, Kiguen AX, Venezuela RF, Cuffini CG. Mutation detection of E6 and LCR genes from HPV 16 associated with carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(3):1151-7.
221. Xi J, Chen J, Xu M, Yang H, Wen S, Pan Y, et al. The polymorphisms of LCR, E6, and E7 of HPV-58 isolates in Yunnan, Southwest China. *Virol J*. 2018;15(1):76.
222. Fang L, Lin X, Yang Y, Song Z, Ding X, Tan L, et al. Genetic variability, phylogeny and functional implication of the long control region in human papillomavirus type 16, 18 and 58 in Chengdu, China. *Virol J*. 2020;17(1):106.
223. Pillai MR, Hariharan R, Babu JM, Lakshmi S, Chiplunkar SV, Patkar M, et al. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *Int J Cancer*. 2009;125(1):91-103.

224. Vaezi T, Shoja Z, Hamkar R, Shahmahmoodi S, Nozarian Z, Marashi SM, et al. Human papillomavirus type 16 lineage analysis based on E6 region in cervical samples of Iranian women. *Infect Genet Evol.* 2017;55:26-30.
225. Chen Z, Jing Y, Wen Q, Ding X, Wang T, Mu X, et al. E6 and E7 Gene Polymorphisms in Human Papillomavirus Types-58 and 33 Identified in Southwest China. *PLoS One.* 2017;12(1):e0171140.
226. Martinelli M, Villa C, Sotgiu G, Muresu N, Perdoni F, Musumeci R, et al. Analysis of Human Papillomavirus (HPV) 16 Variants Associated with Cervical Infection in Italian Women. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(1).
227. Xi J, Chen J, Xu M, Yang H, Luo J, Pan Y, et al. Genetic variability and functional implication of the long control region in HPV-16 variants in Southwest China. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182388.
228. Cento V, Ciccozzi M, Ronga L, Perno CF, Ciotti M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. *J Med Virol.* 2009;81(9):1627-34.
229. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 12):2959-68.
230. Shen-Gunther J, Cai H, Zhang H, Wang Y. Abundance of HPV L1 Intra-Genotype Variants With Capsid Epitopic Modifications Found Within Low- and High-Grade Pap Smears With Potential Implications for Vaccinology. *Frontiers in genetics.* 2019;10:489.
231. Cento V, Rahmatalla N, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. Intratype variations of HPV 31 and 58 in Italian women with abnormal cervical cytology. *J Med Virol.* 2011;83(10):1752-61.
232. Liu JH, Lu ZT, Wang GL, Zhou WQ, Liu C, Yang LX, et al. Variations of human papillomavirus type 58 E6, E7, L1 genes and long control region in strains from women with cervical lesions in Liaoning province, China. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1466-72.
233. Chan PK, Zhang C, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Giovannelli L, et al. Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations. *Int J Cancer.* 2013;132(11):2528-36.
234. Chan PK. Human papillomavirus type 58: the unique role in cervical cancers in East Asia. *Cell Biosci.* 2012;2(1):17.
235. Chan PK, Zhang C, Park JS, Smith-McCune KK, Palefsky JM, Giovannelli L, et al. Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations. *Int J Cancer.* 2013;132(11):2528-36.
236. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2677-84.
237. Watson-Jones D, Baisley K, Brown J, Kavishe B, Andraesen A, Changalucha J, et al. High prevalence and incidence of human papillomavirus in a cohort of healthy young African female subjects. *Sex Transm Infect.* 2013;89(5):358-65.



238. Lupato V, Holzinger D, Hofler D, Menegaldo A, Giorgi Rossi P, Del Mistro A, et al. Prevalence and Determinants of Oral Human Papillomavirus Infection in 500 Young Adults from Italy. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170091.
239. Collins SI, Mazloomzadeh S, Winter H, Rollason TP, Blomfield P, Young LS, et al. Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study. *Int J Cancer*. 2005;114(3):498-500.
240. 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;59:391–8.
241. 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 9(2):26-30.
242. Bienkowska-Haba M, Luszczek W, Myers JE, Keiffer TR, DiGiuseppe S, Polk P, et al. A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle. *PLoS Pathog*. 2018;14(3):e1006846.
243. Wudtisan J, Tantipalakorn C, Charoenkwan K, Sreshthaputra RA, Srisomboon J. Factors Associated with Development of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Uterine Cervix in Women Younger than 30 Years. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(4):1031-6.
244. Cornet I, Bouvard V, Campo MS, Thomas M, Banks L, Gissmann L, et al. Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *J Virol*. 2012;86(4):2366-70.
245. Sun Z, Lu Z, Liu J, Wang G, Zhou W, Yang L, et al. Genetic variations of E6 and long control region of human papillomavirus type 16 from patients with cervical lesion in Liaoning, China. *BMC Cancer*. 2013;13:459.
246. Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):1060-6.
247. Kämmer C, Tommasino M, Syrjänen S, Delius H, Hebling U, Warthorst U, et al. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br J Cancer*. 2002;86(2):269-73.
248. Chang YJ, Chen HC, Pan MH, Lee BH, You SL, Lin CY, et al. Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical Neoplasia in Taiwan. *J Med Virol*. 2013;85(9):1567-76.

---

**CAPÍTULO VIII**  
**ANEXOS**

---



## **VIII. ANEXOS**

### **ANEXO 1. EVENTOS CIENTÍFICOS Y PROYECTOS Y TESIS RELACIONADOS CON EL TEMA.**

#### **Eventos científicos**

- Instructor del Curso “Diagnóstico Molecular del Virus de Papiloma Humano”, evento organizado por la Colegio Químico y Bioquímica Farmacéutico de Tungurahua, 26 y 27 de enero del 2019.
- Organizador, moderador y expositor en el Simposio “El Virus del Papiloma y en el Cáncer Cervical en el Ecuador”, V Congreso de Enfermedades Infecciosas - PUCE, del 10 al 12 de octubre del 2018.
- Organizador, moderador y expositor en el Simposio “El Virus del Papiloma en el Ecuador”, semana científica del INSPI, septiembre 2018.
- Capacitador del Curso teórico – práctico “Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano y toma de muestras de cepillados endocervicales”, evento organizado por la Universidad Nacional de Loja (UNL), del 23 al 27 de octubre 2017.
- Participación con Ponencia oral “Epidemiología, Filogenia de HPV en Mujeres de Región Litoral “y en mesa redonda, en el evento denominado “Segunda Jornada de Laboratorio Clínico, Rol de Evidencias en Decisiones Clínicas, organizado por el Hospital “Roberto Gilbert”, Guayaquil, 23 de septiembre 2017.
- Badano I, Bedoya C H Totaro M E, Parrales E, Zhingre A, Sanchez S, España K, Espinosa-Garcia M, Liotta DJ. Poster científico “CARACTERIZACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 EN MUJERES DE ARGENTINA Y DEL ECUADOR”. XII Congreso Argentino de Virología, septiembre 2017.
- Presentación de ponencia oral en el 1ER CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A LA SALUD, evento organizado por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil, 15 agosto 2017.
- Presentación de ponencia oral en el XXIII Congreso Médico Provincial, evento organizado por Colegio de Médico del Guayas, agosto 2017.

- Presentación de ponencia oral en el 1ER CONGRESO INTERNACIONAL DE GENETICA MEDICA Y 1ER. CONGRESO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA A LA SALUD, evento organizado por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil, 14 julio 2017.
- Presentación de ponencia oral en el 2do Congreso Internacional de Investigación en Salud y 1er. Congreso en Salud Pública, evento organizado por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil, marzo 2017.
- Presentación de ponencia oral y coautor de posters científicos en las XL Jornadas Nacionales de Biología, organizadas por ESPOL y La Sociedad Ecuatoriana de Biología, del 16 al 18 de noviembre del 2016.
- Presentación de ponencia oral en el I Congreso Internacional de Investigación en Salud, organizado por la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil, del 17 al 21 de octubre.
- Presentación de conferencia en la semana científica del INSPI, septiembre 2016.
- Ponente oral en el the 3rd International and Interdisciplinary Workshop on Mathematical Modelling, Ecology, Evolution, Health, Challenges and Opportunities in Latin America, Julio 18 al 22, Quito.
- Coautor de poster científico en el IV Encuentro Internacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical que se llevó a cabo del 13 al 15 de junio de 2016 en las instalaciones de la PUCE, Quito.
- Coautor de ponencia oral en el IV Encuentro Internacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical que se llevó a cabo del 13 al 15 de junio de 2016 en las instalaciones de la PUCE, Quito.
- Participación como ponente oral en el SIMPOSIO Científico de Universidades e Institutos de Investigación, Loja, del 6 al 8 de abril 2016
- Dictado de charla científica sobre la epidemiología de HPV, SOLCA Cuenca, 5 febrero 2016.
- Participación como ponente oral en el Congreso Nacional de SOLCA, 20 noviembre del 2015.

- Participación como coautor en la presentación de póster científico en las IX Jornadas Técnicas y Científicas de la Universidad de Misiones, Argentina, del 28 al 30 de octubre del 2015.
- Participación como expositor en la semana científica del INSPI realizado en Guayaquil del 3 al 9 de septiembre del 2015.
- Participación como ponente oral en el Congreso IMMUNO-VACCIPHARMA realizado en Varadero, Cuba del 14 al 19 de mayo del 2015.
- Participación como asistente y expositor de ponencias o en el XVII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología realizado en Quito del 15 al 19 de mayo del 2015.
- Expositor en el II LATIN AMERICAN NETWORK OF MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND EVOLUTIONARY GENETICS OF INFECTIOUS DISEASES Y EL III ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MEDICINA TROPICAL, organizado por PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR (PUCE), del 21 al 23 de Julio de 2014.

#### **Proyectos y tesis relacionados con el tema**

- Preparación y Dirección del Proyecto “EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO PARA LA PREVENCION DEL CANCER DE CERVICO-UTERINO EN MUJERES DE LA REGION LITORAL DEL ECUADOR”, financiado por la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (SENESCYT), septiembre 2012 – diciembre 2015.
- Participación en la preparación y miembro de equipo técnico del proyecto semilla Fondos UEES “Variabilidad genética de Papillomavirus humano en cáncer cervicouterino y su correlación clínico-patológica”, 2015 – 2016.
- Tutor de la tesis para la obtención del título de Magister en Biotecnología de la Sra. Alicia Esperanza Zhingre Suárez, “Polimorfismos del gen L1 y E6 del Virus de Papiloma Humano en mujeres con lesiones cérvico – uterinas precancerosas y cancerosas en la región Litoral del Ecuador”, octubre 2016.
- Tutor de la tesis para la obtención del título de Magister en Biotecnología del Sr. Eduardo Xavier Parrales López, “Polimorfismos del gen E7 y LCR del Virus de Papiloma Humano

en mujeres con lesiones cérvico – uterinas precancerosas y cancerosas en la región Litoral del Ecuador”, octubre 2016.

- Tutor de tesis del Sr. Lex Medina para la obtención del título de Biólogo “Genotipificación del Virus del Papiloma Humano mediante secuenciamiento y PCR cuantitativa en tiempo real y detección de variantes intratípicas por análisis filogenético”, ESPOL 2015.
- Tutor de tesis de la Srta. Karla Párraga para la obtención del título de Biólogo “Epidemiología molecular del virus del papiloma humano (HPV) en mujeres con lesiones cervicales en la ciudad de Guayaquil-Ecuador”, ESPOL 2015.
- Tutor y evaluador del reporte final de la materia integradora del Sr Miguel Rojas, para la obtención del título de Biólogo titulado “Diseño de una matriz basada en el modelo de análisis RIDIT para la evaluación in-sílica de iniciadores usados en el estudio de filogenia molecular de HPV-16, 18 y 58”, septiembre 2017.
- Tutor y evaluador del reporte final de la materia integradora del Sr. Eduardo Concha para la obtención del título de Biólogo titulado “EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO GENOTIPO 58, EN MUJERES CON LESIONES CERVICALES, EN LAS PROVINCIAS DE LA COSTA ECUATORIANA”, Facultad de Ciencias de la Vida, ESPOL, septiembre 2016.

**ANEXO 2: REPRESENTACIÓN DE LOS GENOMAS DE REFERENCIA DEL GRUPO ALPHAPAPILLOMAVIRUS EN TÉRMINOS DE VARIANTES VIRALES DE LINAJES Y SUBLINAJES, ADAPTADO DE BURK, 2013 (57).**

Especie	Genotipo	Linaje	Sublinaje	Otros nombres	
ALFA-7	VPH 18	A	A1	AsAi, AA, E1	
			A2	AsAi, AA, E2	
			A3	E, E2	
			A4	E, E2	
			A5	E	
		B	B1	Af, Af1	
			B2	Af	
			B3	Af, Af2	
		C	Af		
	VPH 39	A	A1		
			A2		
	VPH 45	A	A1		
			A2		
			A3		
		B	B1		
			B2		
	VPH 59	A	A1		
			A2		
			A3		
		B			
	VPH 68	A	A1		A
			A2		A
		B			A
					A
		C	C1		B
			C2		B
		D	D1		B
			D2		B
E		B			
F	F1	B			
	F2	B			
VPH 70	A				
	B				
VPH 85	A				
VPH 97	A				
VPH 26	A				
ALFA-5	VPH 51	A	A1		
			A2		
			A3		
			A4		
		B	B1		
			B2		
	VPH 69	A	A1	A	
			A2	A	
			A3	A	
			A4	B	
	VPH 82	A	A1		
			A2		
			A3		
B		B1			
		B2			
C		C1			

			C2		
			C3		
			C4		
			C5		
Especie	Genotipo	Linaje	Sublinaje	Otros nombres	
ALFA-9	VPH 16	A	A1	Europeo (E)	
			A2	Europeo (E)	
			A3	E	
			A4	Asiático, E(As)	
		B	B1	Africano-1, Afr1a	
			B2	Africano-2, Afr1b	
		C		Africano-2, Afr2a	
		D	D1	Norteamericano (NA)1	
	D2		Asiático-americano (AA)2		
	D3		Asiático-americano (AA)1		
	VPH 31	A	A1		
			A2		
		B	B1		
			B2		
		C	C1		
			C2		
	C3				
	VPH 33	A	A1	A	
			A2	B	
			A3		
	B			C	
		C			
	VPH 35	A	A1		
			A2		
	VPH 52	A	A1		
			A2		
		B	B1		
			B2		
		C	C1		
	D	C2			
VPH 58	A	A1			
		A2			
		A3			
	B	B1			
		B2			
	C				
	D	D1			
D2					
Especie	Genotipo	Linaje	Sublinaje	Otros nombres	
ALFA-6	VPH 30	A	A1		
			A2		
			A3		
	B				
	VPH 53	A	A		A
			B		
			C		B
		D	D1		B
			D2		B
			D3		
D4				B	



	VPH 56	A	A1	A
			A2	B
	B		C	
	VPH 66	A		
B		B1		
ALFA-11	VPH 34	A	A1	
			A2	
		B		
	VPH 73	C	C1	
			C2	
		A	A1	
ALFA-10	VPH 6	B	A2	
	VPH 11	A	B1	
		B2		
ALFA-13	VPH 54	B	B3	
ALFA-3	VPH 61	A	A1	
			A2	
		B		
		C		

### ANEXO 3: FICHA DE DATOS DE PARTICIPANTES DE ESTUDIO.

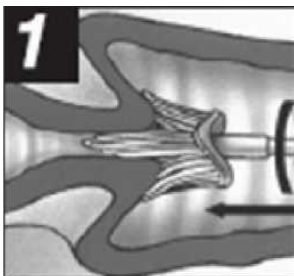
Ficha clínica

Proyecto: Infección por Virus de Papiloma Humano, sus variantes genéticas y factores asociados a lesiones cervicouterinas en mujeres de la región litoral del Ecuador. 2012-2015.

Responsable: César Bedoya Pilozo.

<b>Edad</b>	30-40 años	<input type="checkbox"/>	> 40 años	<input type="checkbox"/>		
<b>Procedencia</b>	Esmeraldas	<input type="checkbox"/>	Los Ríos	<input type="checkbox"/>		
	Manabí	<input type="checkbox"/>	Santa Elena	<input type="checkbox"/>		
	Guayas	<input type="checkbox"/>	El Oro	<input type="checkbox"/>		
<b>Nivel Escolaridad</b>	Educación básica (desde elemental hasta secundaria)				<input type="checkbox"/>	
	Educación superior (tecnológica y universitaria)				<input type="checkbox"/>	
<b>Estado civil</b>	Casada	<input type="checkbox"/>				
	Soltera	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
	Divorciada	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
	Viuda	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
	Otra	<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>
<b>Situación laboral</b>	Ama de casa		<input type="checkbox"/>			
	Estudiante		<input type="checkbox"/>			
	Profesional		<input type="checkbox"/>			
	Obrera		<input type="checkbox"/>			
	Técnica		<input type="checkbox"/>			
<b>Edad de inicio de las primeras</b>	10 – 18 años		<input type="checkbox"/>			
	> 18 años		<input type="checkbox"/>			
<b>Número de parejas sexuales en los dos últimos años</b>	0		<input type="checkbox"/>			
	1		<input type="checkbox"/>			
	>2		<input type="checkbox"/>			
	>3		<input type="checkbox"/>			
<b>Número de embarazos</b>	0 – 3		<input type="checkbox"/>			
	> 3		<input type="checkbox"/>			
<b>Trastornos menstruales</b>	Ninguno					<input type="checkbox"/>
	Metrorragia					<input type="checkbox"/>
	Leucorrea					<input type="checkbox"/>
	Menopausia					<input type="checkbox"/>
	Trastorno espontáneo					<input type="checkbox"/>
	Amenorrea					<input type="checkbox"/>
<b>Citología</b>	Metrorragia – Leucorrea					<input type="checkbox"/>
	Otros					<input type="checkbox"/>
	ASCUS					<input type="checkbox"/>
	LSIL (NIC 1)					<input type="checkbox"/>
	HSIL (NIC 2/NIC 3)					<input type="checkbox"/>
	CaCU					<input type="checkbox"/>

**ANEXO 4: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS CERVICALES USANDO EL CEPILLO ROVERS CERVEX® Y EL SISTEMA COBAS® PCR CELL COLLECTION MEDIA.**



**1. RECOGER:**

Usar guantes.

Para recolectar, colocar las cerdas centrales del cepillo en el canal endocervical.

Inserte el cepillo lo suficientemente profundo para permitir que las cerdas más cortas estén completamente en contacto con el ecto-cérvix. Empuje suavemente y gire en sentido horario la escoba cinco veces.



**2. ENJUAGUAR:**

Enjuague el cepillo en el sistema COBAS® PCR CELL COLLECTION MEDIA empujando la escoba en la parte inferior de la cubeta diez veces, obligando a las cerdas separarse.

Remoline la escoba vigorosamente para liberar aún más el material.

Deseche el dispositivo de recolección.

No deje la cabeza de escoba en el frasco.



**3. CERRAR:**

Apriete la tapa para que la línea de esfuerzo de torsión de la tapa pase la línea de esfuerzo de torsión en el vial.

La muestra está ahora lista para el transporte.

**ANEXO 5: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DEL DNA MINIKIT (QIAGEN, EE.UU.) A PARTIR DE MUESTRAS DE CEPILLADO ENDOCERVICAL.**

- Programar el bloque térmico a 56°C. antes de empezar la extracción.
  - Verificar AW1 y AW2 que estén preparados según indicaciones del fabricante y que Buffer AL no esté precipitado.
1. Se toma 1mL de la(s) muestra(s) y se centrifuga a 8000 rpm o 6000 g durante 5 min. Este paso se repite hasta que la concentración de Pellet sea adecuada para la extracción (5ml aproximadamente).
  2. Decantar hasta sólo dejar el Pellet.
  3. Se coloca 20µL de Proteinasa K en la muestra y 200µL de PBS.
  4. Colocar 4µL de RNasa A (100mg/ml) y mezclar e incubar por 15 min a 37°C.
  5. Colocar 200µL Buffer AL. Se realiza vórtex para homogeneizar.
    - a. Nota 1: No colocar la Proteinasa K y el Buffer AL, al mismo tiempo
    - b. Nota 2: Si el pellet de células es muy abundante, la colocación de la Proteinasa K, el PBS y el Buffer AL deberán ser aumentados de manera proporcional ejemplo: 30 µL, 300 µL y 300 µL respectivamente.
  6. Se incuba en el bloque térmico con una ligera agitación a 56 °C, por un tiempo mínimo de 10 minutos.
  7. Centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa.
  8. Adicionar 400 µL de etanol al 100 a la muestra y mezclar por 15 segundos en el vórtex. Brevemente centrifugar para remover las gotas de la tapa.
  9. Cuidadosamente colocar 700 µL de la mezcla en la columna cuidando de no topar los bordes del tubo. Tapar la columna colocarla dentro del tubo de 2 mL y centrifugar a 8 000 rpm o 6 000g por 1 min.
  10. Colocar la columna en un tubo limpio y descartar el filtrado.
  11. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 µL de Buffer AW1 sin topar los bordes del tubo, tapar la columna.
  12. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 min.
  13. Colocar la columna en un tubo limpio y descartar el filtrado.
  14. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 µL de Buffer AW2 sin topar los bordes del tubo. Tapar la columna.
  15. Centrifugar a 14.000 rpm por 3min.
  16. Colocar la columna en un tubo limpio de 2 mL y descartar el filtrado.
  17. Centrifugar a 14 000 rpm por 1 min y descartar el filtrado.
  18. Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 mL.
  19. Adicionar 50 a 100 µL de Buffer AE e incubar a temperatura ambiente por 1 min y luego centrifugar a 8 000 rpm por 1min.
  20. Colocar el ADN extraído para la conservación a -80 °C.

**ANEXO 6: PROTOCOLO ANYPLEX II HPV28**

Para este ensayo se utilizó el sistema para qPCR CFX96™ C1000 (Bio-Rad), provisto por la empresa SIMED y se siguió el protocolo del fabricante.

**Diagnóstico molecular del virus**

Para este diagnóstico se utilizaron las muestras que dieron positivas para VPH con los cebadores MY. Los reactivos necesarios y controles son provistos en el kit. El diagnóstico molecular de los 28 tipos del VPH se lleva a cabo en dos reacciones por muestra. Cada reacción lleva un set de cebadores llamados «TOCE Oligo Mix (TOM)» y denotados como A TOM y B TOM. El A TOM es capaz de detectar 14 tipos del VPH de AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), mientras que el B TOM detecta cinco VPH de AR (VPH 26, 53, 69, 73 y 82) y nueve de BR (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 y 70).

Componente	Volumen (µL)
4X HPV28 A TOM o B TOM	5
4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)	5
Agua ultrapura	5
Muestra	5
Volumen total de la reacción	20

**Fuente:** Seegene Inc. (Seul, Corea)

**Controles empleados:**

Control negativo: Agua ultrapura libre de ARNasa.

Control positivo: Los tubos PC1, PC2 y PC3, de cada uno de los dos sets de TOM (TOM A y TOM B).

Para el desarrollo de la técnica se utiliza el Sistema de qPCR CFX-96 (Bio-Rad).

Una vez que las reacciones estén hechas y posicionadas adecuadamente, se configura el siguiente protocolo de ciclado, protocolo de la placa y se ejecuta la corrida.

Segment	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	4 min
2	1	95°C	15 min
3		95°C	30 sec
4	30	60°C	1 min
5		72°C	30 sec
6	1	55°C	30 sec
7*	1	<b>Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)</b>	
8		95°C	30 sec
9	10	60°C	1 min
10		72°C	30 sec
11	1	55°C	30 sec
12*	1	<b>Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)</b>	
13		95°C	30 sec
14	10	60°C	1 min
15		72°C	30 sec
16	1	55°C	30 sec
17*	1	<b>Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)</b>	

**Fuente:** Seegene Inc. (Seul, Corea)

Una vez finalizada la corrida se archiva los resultados en una carpeta específica y se generan los resultados.

**ANEXO 7: CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PCR ESPECÍFICAS PARA LAS REGIONES L1, LCR, E6 Y E7 DE VPH 16. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN L1**

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (uL) 1rx
H2O	--	-	11.55ul
Buffer de PCR	10 X	1X	2.5ul
MgCl2	50mM	2.5mM	1.25ul
dNTPs	10mM	0.8mM	2ul
Primer Foward	10uM	0.5uM	1.25ul
Primer Revers	10uM	0.5uM	1.25ul
Taq	5 U/ul	1U/25ul (0.04U/ul)	0.2ul
ADN	-	-	5ul
Volumen Final			25ul

Perfil térmico para L1:

Ciclaje de PCR L1- 911pb y 947pb		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	5 min	1x
94°C	30 segundos	40x
58°C	60seg	
72°C	60 seg	1x
72°C	7 min	

**CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN E6**

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (uL) 1rx
Agua	--	-	13,65ul
Buffer	10 X	1X	2,5ul
MgCl2	50mM	2.5mM	1.5ul
dNTPs	10mM	0.8mM	2ul
Primer Hpv_variant_F	10uM	0.5uM	1.25ul
Primer Hpv_variant_R	10uM	0.5uM	1.25ul
Taq	5 U/ul	0.5U/25ul (0.02U/ul)	0.1ul
ADN	-	-	5ul
Volumen Final			25 ul

Perfil térmico para E6:

<b>Ciclaje de PCR Punto final</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>94°C</b>	<b>5 min</b>	<b>1x</b>
<b>94°C</b>	<b>60seg</b>	<b>35x</b>
<b>55°C</b>	<b>60seg</b>	
<b>72°C</b>	<b>60 seg</b>	
<b>72°C</b>	<b>7 min</b>	<b>1x</b>

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN E7

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACIÓN INICIAL</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL</b>	<b>VOLUMEN POR REACCIÓN (uL)</b>
Agua	-	-	11,65 uL
Buffer	10x	1x	2,5 uL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	1,25 uL
dNTPs	10 mM	0,8 mM	2 uL
Iniciador Forward	10 uM	0,5 uM	1,25 uL
Iniciador Reverse	10 uM	0,5 uM	1,25 uL
Taq polimerasa	5 U/uL	0,5 U por reacción	0,1 uL
ADN muestra	-	-	5 uL
Volumen total			<b>25 uL</b>

Perfil de amplificación para E7:

<b>CICLAJE DE PCR PUNTO FINAL</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>94°C</b>	<b>2 min</b>	<b>1x</b>
<b>94°C</b>	<b>1 min</b>	<b>40x</b>
<b>50°C</b>	<b>1 min</b>	
<b>72°C</b>	<b>1 min</b>	
<b>72°C</b>	<b>10 min</b>	<b>1x</b>



## CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN LCR

## PCR MASTER MIX PARA LCR3 Y LCR4

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (uL)
Agua	-	-	12,05 uL
Buffer	10x	1x	2,5 uL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	1,25 uL
dNTPs	10 mM	0,8 mM	2 uL
Iniciador Forward	10 uM	0,4 uM	1,0 uL
Iniciador Reverse	10 uM	0,4 uM	1,0 uL
Taq polimerasa	5 U/uL	1 U por reacción	0,2 uL
ADN muestra	-	-	5 uL
Volumen total			<b>25 uL</b>

## PCR MASTER MIX PARA L1c (LCR).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (uL)
Agua	-	-	11,55 uL
Buffer	10x	1x	2,5 uL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	1,25 uL
dNTPs	10 mM	0,8 mM	2 uL
Iniciador Forward	10 uM	0,5 uM	1,25 uL
Iniciador Reverse	10 uM	0,5 uM	1,25 uL
Taq polimerasa	5 U/uL	1 U por reacción	0,2 uL
ADN muestra	-	-	5 uL
Volumen total			<b>25 uL</b>

Perfil térmico para la región LCR:

CICLAJE DE PCR PUNTO FINAL		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	2 min	1x
94°C	1 min	40x
55°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x

---

**ANEXO 8: PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR CON EL SISTEMA QIAQUICK (QIAGEN, EEUU).**

1. Añadir 5 volúmenes de tampón PB a 1 volumen de la muestra PCR y mezcla. No es necesario para eliminar el aceite mineral o queroseno.  
Ejemplo, añadir 100 µL de tampón PB y 20 µL de muestra de PCR
2. Coloque una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recogida de 2 mL provisto.
3. Para unirse al ADN, aplicar la muestra a la columna y centrifugar durante 30-60 s.
4. Descarte el filtrado. Colocar la columna QIAquick de nuevo en el mismo tubo.  
tubos de recogida se vuelven a utilizar para reducir los residuos de plástico.  
Para lavar, añadir 0,75 mL de tampón PE a la columna y centrifugar durante 30-60 s.  
Descarte el filtrado y coloque la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo.
5. Centrifugar nuevamente durante 60 s.
6. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 mL.
7. Para eluir el ADN, añadir 50 µL de tampón EB (Tris 10 mM · Cl, pH 8,5). en el centro de la columna para que caiga directamente en la membrana QIAquick
8. Centrifugar la columna por 1 min.
9. Añadir 30µL tampón EB, para el aumento de la concentración de ADN, y centrifugar durante 30-60 s.
10. Eliminar la columna y observar el ADN que ha sido recuperado en el tubo de 1.5 mL.

**ANEXO 9: CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
***Para Investigación del Virus del Papiloma Humano***

Se me ha solicitado participar en un proyecto de investigación que estudia la EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) PARA LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER DE CERVICO-UTERINO EN MUJERES MAYORES DE 30 AÑOS DE LA REGIÓN COSTA DEL ECUADOR facilitando una muestra citológica que previo a un test de Papanicolaou, presente por lo menos células atípicas para ser incluida en la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH). Los Papillomavirus Humanos están asociados con alteraciones en células del cuello del útero y puede provocar cáncer cervicouterino. Los resultados obtenidos con las técnicas moleculares serán analizados en paralelo con los datos clínicos y epidemiológicos de las pacientes estudiadas para determinar las relaciones entre los hallazgos virológicos y las variables clínicas y epidemiológicas analizadas en la población estudiada, y su extrapolación a la comunidad femenina en general

**YO ENTIENDO QUE:**

- A. No existen riesgos en este procedimiento de toma de muestra de hisopado cervicouterino.
- B. Los posibles beneficios que tendré en este estudio son: Se podrá establecer un mejor diagnóstico de la enfermedad lo que permitirá un seguimiento adecuado y se mejorará la calidad de vida de pacientes infectadas por VPH con lesiones pre-malignas ya que se focalizará el tratamiento invasivo solamente a las mujeres con lesiones malignas.
- C. Cualquier pregunta que yo quisiera hacer en relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por: Ac. César Bedoya Piloso MsC. Director del Proyecto, Martha Sánchez MsC. Subdirectora del Proyecto, Dr. Carlos Mosquera Martínez, Coordinador de Investigación y Diagnóstico Microbiológico del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y Manuel González Jefe del Subproceso de Virología del INSPI.
- D. Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelada y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad sea solicitada por ley.
- E. Mi consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado u obligado.

Fecha: día \_\_\_\_ mes \_\_\_\_\_ año \_\_\_\_\_

Nombre y Apellidos del Paciente

\_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre y Apellidos del Profesional responsable de la toma de muestra

\_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

## ANEXO 10: POLIMORFISMOS DETECTADOS EN EL GEN L1 DE VPH 16

REGIÓN DE ANALISIS	Regiones: L1_16_1F/L1_16_1R y F6835L/R7764L (1850 pb)														Linaje	Citología
Posición en el prototipo (nt) Muestras	5862 <sup>a</sup>	5909 <sup>b</sup>	6023 <sup>c</sup>	6163 <sup>d</sup>	6178 <sup>e</sup>	6245 <sup>f</sup>	6314 <sup>g</sup>	6377 <sup>h</sup>	6379 <sup>i</sup>	6432 <sup>j</sup>	6860 <sup>k</sup>	6968 <sup>l</sup>	6992 <sup>m</sup>	7058 <sup>n</sup>		
Referencia. Af536179	C	T	A	C	A	T	A	-	-	G	C	C	A	G		
PO24											-	t	-	T	A	ASCUS
SHL05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	A	ASCUS
C80	T	c	-	A	C	c	-	-	-	-	-	t	-	T	A	LSIL
SEM65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	g	-	A	HSIL
MRM02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	HSIL
C035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	HSIL
C066											-	-	g	-	A	HSIL
C107	-	-	t	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	A	HSIL
C116	T	c	-	A	C	c	-	-	-	-	-	-	-	-	D	HSIL
C093	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	g	-	A	CaCU
C079	T	c	c	A	-	c	g	-	-	-	-	-	-	-	D	CaCU
C084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	CaCU
C021	T	c	c	A	-	c	g	-	-	-	-	-	-	-	D	CaCU
C104	-	-	-	-	-	-	-	-	Ins T	A	-	-	-	-	A	CaCU
C111	-	-	-	-	-	-	-	Ins T	-	-	-	-	g	-	A	CaCU
C124	-	-	c	A	-	c	g	-	Ins T	-	-	-	-	-	D	CaCU
Cambio de aminoácido	H102Y	silente	silente	T202N	N207T	silente	silente	Ins T	Ins T	C292Y	silente	silente	silente	L500F		

Letras en minúscula; Se refiere a mutaciones que no producen ninguna sustitución de aminoácidos (silente). Los linajes se encuentran en la posición derecha; A, linaje europeo, D, Linaje asiático-americano. <sup>a, b, c, d, e, f, g, j, k, l, m, n</sup> mutaciones reportadas por Pillai y cols., 2009 (223). <sup>h, i</sup> inserciones noveles.

## ANEXO 11: POLIMORFISMOS DETECTADOS EN EL GEN E6 DE VPH 16

REGIÓN DE ANÁLISIS	Región: HPV_variant_F/HPV_variant_R (524 pb)									Linaje	Citología
	145 <sup>a</sup>	176 <sup>b</sup>	183 <sup>c</sup>	187 <sup>d</sup>	286 <sup>e</sup>	289 <sup>f</sup>	335 <sup>g</sup>	350 <sup>h</sup>	532 <sup>i</sup>		
Ref. K02718	G	G	T	A	T	A	C	T	A		
SMP11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	ASCUS
SHL05	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	ASCUS
C66	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	ASCUS
C80	T	-	-	-	a	g	T	G	-	D	ASCUS
C64	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	HSIL
HIG08	T	-	-	-	a	g	T	G	-	D	HSIL
SEM07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	HSIL
SEM17	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	HSIL
SEM22	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	HSIL
SEM65	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	HSIL
MRM02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	HSIL
C035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	HSIL
C107	-	-	-	g	-	-	-	-	-	A	HSIL
C115	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	HSIL
C116	T	A		-	a	g	T	G	g	D	HSIL
C021	T	-	G	-	a	g	T	G	g	D	CaCU
C079	T	-	G	-	a	g	T	G	g	D	CaCU
C104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	CaCU
C93	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	CaCU
C84	-	-	-	-	-	-	-	G	-	A	CaCU
Cambio de aminoácido	Q14H	D25N	I27R	silente	silente	silente	H78Y	L83V	silente		

Letras en minúscula; Se refiere a mutaciones que no producen ninguna sustitución de aminoácidos (silente). Los linajes se encuentran en la posición derecha; A, linaje europeo, D, Linaje asiático-americano. <sup>a, d, e, f, i</sup> Mutaciones reportadas por Cornet y cols., 2012 (60, 244). <sup>b, g, h</sup> Mutaciones reportadas por Sun y cols., 2013 (245). <sup>c</sup> Mutación reportada por Pillai y cols., 2009 (223).

## ANEXO 12: POLIMORFISMOS DETECTADOS EN EL GEN E7 DE VPH 16

REGIÓN DE ANÁLISIS	Región E7_120F/E7_120R (506 pb)					Linaje	Citología
	678 <sup>a</sup>	732 <sup>b</sup>	789 <sup>c</sup>	795 <sup>d</sup>	828 <sup>e</sup>		
Posición en el prototipo (nt)							
Muestras							
Ref. K02718	T	T	T	T	T		
SMP11	-	-	-	-	-	A	ASCUS
SHL05	c	-	-	-	-	A	ASCUS
P024	-	c	c	g	-	D	ASCUS
C80	-	c	c	g	-	D	LSIL
SMP30	-	-	c	-	c	A	LSIL
SMP29	c	c	c	g	-	D	HSIL
C115	-	-	-	-	-	A	HSIL
SEM22	-	-	-	-	-	A	HSIL
MRM02	-	-	-	-	-	A	HSIL
C35	-	-	-	-	-	A	HSIL
SEM 17	-	-	-	-	-	A	HSIL
C50	-	-	-	-	-	A	HSIL
C66	-	-	-	-	-	A	HSIL
SEM07	-	-	-	-	-	A	HSIL
C116	-	c	c	g	-	D	HSIL
SMP15	-	-	-	-	-	A	CaCU
C104	-	-	-	-	-	A	CaCU
C111	-	-	-	-	-	A	CaCU
C93	-	-	-	-	-	A	CaCU
C84	-	-	-	-	-	A	CaCU
C79	-	c	c	g	-	D	CaCU
C21	-	c	c	g	-	D	CaCU
Cambio de aminoácido	silente	silente	silente	silente	silente		

Los linajes se encuentran en la posición derecha; A, linaje europeo, D, Linaje asiático-americano. <sup>a</sup> Mutación novel. <sup>b, c, d, e</sup> Mutaciones reportadas por Pande y cols., 2008 (246).

## ANEXO 13. POLIMORFISMOS DETECTADOS EN LA REGIÓN LCR DE VPH 16

REGIÓN DE ANÁLISIS	Región LCR3_F/LCR3_R y LCR4_F/LCR4_R (350 pb)																		Linaje	Citología					
	7193 <sup>a</sup>	7233 <sup>b</sup>	7339 <sup>c</sup>	7394 <sup>d</sup>	7395 <sup>e</sup>	7422 <sup>f</sup>	7450 <sup>g</sup>	7485 <sup>h</sup>	7489 <sup>i</sup>	7521 <sup>j</sup>	7669 <sup>k</sup>	7689 <sup>l</sup>	7729 <sup>m</sup>	7743 <sup>n</sup>	7764 <sup>o</sup>	7772 <sup>p</sup>	7786 <sup>q</sup>	7866 <sup>r</sup>			7868 <sup>s</sup>	7886 <sup>t</sup>	7894 <sup>u</sup>		
Posición en prototipo (nt)																									
Muestras																									
Ref. AY686584.1	G	A	A	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	C	A	C	C	G	C	A	A			
SHL05	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A													A	ASCUS	
P024	T	-	T	T	T	-	-	C	A	A													D	ASCUS	
SMP11	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A								-	-	-	-		A	ASCUS	
C80	T	C	T	T	T	-	-	C	A	A													D	LSIL	
SEM65	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A													A	HSIL	
C66	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A													A	HSIL	
HIG08	T	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	A	C	G	T	-	T						D	HSIL	
SEM16																		-	-	-	-		A	HSIL	
MRM02	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A													A	HSIL	
C93	T	-	-	-	-	-	C	-	-	A	-	-	-	-	-	G	-	-	A	-	-		A	CaCU	
C111	T	-	-	-	-	In (T)	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		A	CaCU	
C84											-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		A	CaCU	
C115											-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		A	HSIL	
C116											-	-	C	G	T	-	T	G	-	-	-		D	HSIL	
C104											-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		A	CaCU	
C21											T	A	C	-	T	-	T	-	-	G	C		D	CaCU	
C79											T	A	C	-	T	-	T	-	-	G	C		D	CaCU	
C92																		-	A	-	-		A	HSIL	
C107																		-	-	-	-		A	HSIL	
C124											-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		A	HSIL	

Los linajes se encuentran en la posición derecha; A, linaje europeo, D, Linaje asiático-americano. <sup>a, b</sup> Mutaciones reportadas por Kämmer y cols., 2002 (247). <sup>c</sup> Mutación reportada por Sun y cols., 2013 (245). <sup>d, e, g, h, i, j, k, l, m, n, o, q, t, u</sup> Mutaciones reportadas por Chang y cols., 2013 (248). <sup>s</sup> Mutación reportada por Pientong et al, 2013 (153).

**ANEXO 14. POLIMORFISMOS, LINAJES Y SUBLINAJES IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN MY09/MAY011 DEL GEN L1 DE VPH 16**

Posición en el prototipo (nt) Muestras	6695 <sup>a</sup>	6721 <sup>b</sup>	6803 <sup>c</sup>	6862 <sup>d</sup>	6865 <sup>e</sup>	6970 <sup>f</sup>	6994 <sup>g</sup>	Linaje	Citología
<b>Ref. K02718</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>-</b>
<b>K02718</b>	-	G	-	T	-	-	G	A	-
<b>AF536179</b>	-	G	-	-	-	-	A	A	-
<b>HQ644236</b>	-	G	-	T	-	-	G	A	-
<b>AF534061</b>	-	G	-	T	-	-	G	A	-
<b>AF536180</b>	-	-	-	T	-	T	-	B	-
<b>HQ644298</b>	-	-	-	T	-	T	-	B	-
<b>AF472509</b>	C	-	-	T	T	T	-	C	-
<b>HQ644257</b>	C	-	-	T	T	T	-	D	-
<b>AY686579</b>	C	-	-	C	T	T	-	D	-
<b>AF402678</b>	C	-	t	T	T	T	-	D	-
C066	C	-	-	-	T	T	-	D	HSIL
C055	C	-	-	-	T	T	-	D	LSIL
C091	C	-	-	-	T	T	-	D	HSIL
C124	C	-	-	-	T	T	-	D	CaCU
MAT148	C	-	-	-	T	T	-	D	LSIL
C092	C	-	t	T	T	T	-	D	HSIL
C116	C	-	t	T	T	T	-	D	HSIL
C059	C	-	t	T	T	T	-	D	CaCU
C007	C	-	t	T	T	T	-	D	CaCU
C020	C	-	t	T	T	T	-	D	HSIL
C028	C	-	t	T	T	T	-	D	HSIL
C044	C	-	t	T	T	?	?	D	CaCU
C036	?	?	?	T	-	-	G	A	LSIL
SEM01	?	?	-	T	-	-	G	A	LSIL
C053	-	G	-	T	-	-	G	A	CaCU
C050	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C055	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C012	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C026	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C031	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C035	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C064	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C068	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C084	-	G	-	T	-	-	G	A	CaCU
C104	-	G	-	T	-	-	G	A	CaCU
C111	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C115	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C117	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL



C107	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
MAT158	-	G	-	T	-	-	G	A	LSIL
MRM01	-	G	-	T	-	-	G	A	CaCU
MAT144	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
SEM07	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
SEM14	-	G	-	T	-	-	G	A	LSIL
SEM16	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
SEM17	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
SEM22	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
SEM62	-	G	-	T	-	-	G	A	LSIL
SEM65	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C125	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
C123	-	G	-	T	-	-	G	A	HSIL
<b>Cambio de aminoácidos</b>	T379P	E388G	Silente	P435L	P436L	T471I	E479G		

Las posiciones en nucleótidos de las mutaciones detectadas dentro de la región L1 MY09/MY11 están descritas en forma vertical en los encabezados de cada columna. La ausencia de variaciones relativas al prototipo es señalada con puntos, la presencia de una variante nucleotídica está indicada por la letra correspondiente al nucleótido. Una señal de interrogación (?) indica la pérdida de información para la posición. <sup>a, b, c, e, f, g</sup> Reportadas por Cento y cols., 2009 (228) y corregidas por Pillai y cols., 2009 (223). <sup>d</sup> Reportada por Villa y cols., 2000 (229).

**ANEXO 15. POLIMORFISMOS, LINAJES Y SUBLINAJES IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN MY09/MAY011 DEL GEN L1 DE VPH 58**

Posición en el prototipo (nt) Muestras	6641 <sup>a</sup>	6827 <sup>b</sup>	6926 <sup>c</sup>	7000 <sup>d</sup>	Linaje	Citología
<b>Ref. D90400</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>		
HQ537752	A	-	-	-	A	-
HQ537758	-	A	-	-	A	-
HQ537762	-	A	-	-	B	-
HQ537764	-	A	-	-	B	-
HQ537774	-	A	-	-	C	-
HQ537768	-	A	-	-	D	-
HQ537770	-	A	-	-	D	-
C098	A	-	-	-	A	LSIL
C128	A	-	-	-	A	LSIL
C080	A	-	-	-	A	LSIL
C067	A	-	-	-	A	LSIL
C103	A	-	-	-	A	LSIL
C099	A	-	-	-	A	HSIL
C060	A	-	-	-	A	CaCU
C033	A	-	-	-	A	HSIL
C049	A	-	-	-	A	HSIL
C075	-	A	-	-	A	HSIL
C085	-	A	G	-	A	HSIL
C114	A	-	-	C	A	HSIL
C050	-	A	G	-	A	HSIL
C055	A	-	-	-	A	HSIL
C045	A	-	-	-	A	HSIL
<b>Cambio de aminoácidos</b>	silente	silente	novel (silente)	K479T		

Las posiciones en nucleótidos de las mutaciones detectadas dentro de la región MY09/MY11 del gen L1 están descritos en forma vertical en los encabezados de cada columna. La ausencia de variaciones relativas al prototipo es señalada con puntos, en donde la presencia de una variante nucleotídica está indicada por la correspondiente letra nucleotídica. Una señal de interrogación (?) indica la pérdida de información para la posición. <sup>a, b</sup> Reportado por Cento y cols., 2011 (228), corregido por Liu y cols., 2012 (232). <sup>c</sup> Novel. <sup>d</sup> Reportado por Liu y cols., 2012 (232).