



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

Informe final de investigación previo a la obtención del título de Licenciada en Ciencias de
la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Caracterización del virus del papiloma humano mediante técnicas moleculares,
inmunológicas y citológicas

Autora: Jeniffer Marianela Sarsoza Villamarín

Tutora: Mgs. Yisela Ramos Campi

Riobamba - Ecuador

2021

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación bibliográfica de título: **“Caracterización del virus del papiloma humano mediante técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas”** Presentado por Jeniffer Marianela Sarsoza Villamarín, dirigida por Mgs.Yisela Carolina Ramos Campi, una vez escuchada la defensa oral y realizado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación, escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para el uso y custodia de la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH.

Para la constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino Flores



Firmado electrónicamente por:
**XIMENA DEL ROCIO
ROBALINO FLORES**

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

Firma

Mgs. Iván Peñafiel Méndez



Firmado electrónicamente por:
**CARLOS IVAN
PENAFIEL
MENDEZ**

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Firma

Mgs. Eliana Martínez Durán



Firmado electrónicamente por:
**ELIANA
ELIZABETH
MARTINEZ DURAN**

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Firma

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, Yisela Ramos Campi, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: “Caracterización del virus del papiloma humano mediante técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas”, propuesto por la Srta. Jeniffer Marianela Sarsoza Villamarín, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 26 de mayo de 2021



Firma válida solo para:
titulación y gestión

.....

Mgs. Yisela Ramos Campi

Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido de este trabajo de investigación corresponde exclusivamente a su autora Jeniffer Marianela Sarsoza Villamarín con cédula de identidad 0503992075 y tutora Mgs.Yisela Carolina Ramos Campi, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



.....

Jeniffer Marianela Sarsoza Villamarín

Autora

CI: 0503992075



Firma válida solo para:
Yisela Ramos Campi
Titulación especial

.....

Mgs. Yisela Carolina Ramos Campi

Tutora

CI: 1201790456

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de Chimborazo y la Facultad Ciencias de la Salud por la acogida dándome la oportunidad de continuar con mis estudios académicos.

A los diferentes docentes de la carrera que han brindado su conocimiento para mi aprendizaje.

A mi tutora que ha sido una guía que con su experiencia, tiempo y paciencia se ha llegado a la culminación del presente trabajo.

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi fortaleza y por su voluntad existimos.

A mi hija ya que por ella he dado mi mayor esfuerzo y es mi razón para seguir.

Mi pareja y su familia quienes me han brindado su apoyo en los momentos que más necesitaba y han puesto su confianza en mí.

A mi hermano quien siempre confió en mí dándome fuerzas para seguir junto con su ayuda incondicional.

Mi familia que con sus consejos y valores han hecho de mí un ser de bien.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
Morfología	4
Datos clínicos.....	5
Factores de riesgo	5
Técnicas moleculares - PCR en tiempo real	6
Recogida de la muestra para PCR en tiempo real	7
Extracción del ADN	7
Cálculos de los reactivos para PCR en tiempo real.....	8
Primers y sondas diseñadas Taqman para VPH16 y VPH18	9
Condiciones del equipo PCR en tiempo real	9
Resultados del PCR en tiempo real	10
Técnicas inmunológicas-ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	10
Toma de muestra para microelisa	10
Procedimiento del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	11
Técnicas citológicas-citocervico vaginal.....	12
Toma de muestra citocervico vaginal	12
Procedimiento de coloración modificada de Papanicolaou	13
Otros métodos de diagnóstico	14
Captura Híbrida II	14
Citología base líquida: capa fina	14
Colposcopia.....	15
Inspección visual con ácido acético (IVAA)	15
Inspección visual con solución yodurada de Lugol (VILI).....	15
Telecolposcopia.....	15
Cervicografía.....	16
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	17
Nivel.....	17
Diseño:	17
Secuencia temporal	17
Cronología de los hechos	17
Población.....	17
Muestra	17
Técnicas y procedimientos.....	18

Técnicas	18
Instrumentos.....	18
Procedimiento	18
Procesamiento estadístico	18
CAPÍTULO III. DESARROLLO	20
Análisis y discusión	32
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue examinar la caracterización del Virus del Papiloma Humano mediante técnicas moleculares PCR en tiempo real, inmunológicas ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citológicas citocervico vaginal. Estudio de nivel descriptivo el cual usó diferentes literaturas, diseño documental–bibliográfica en base a estudios previos y publicados, secuencia temporal con cohorte transversal que abarcó los años 2016 al 2020, la cronología de los hechos fue retrospectivo con datos anterior al año realizado. La población constituyó 51 documentos en bases científicas. La muestra se utilizó en su totalidad, los criterios de inclusión fueron artículos al año mencionado relacionados al tema en idioma inglés y español, criterios de exclusión artículos de años inferiores al 2016 no relacionados al tema. La técnica fue la observación y los procedimientos la recolección y revisión de información. Los instrumentos fueron guías, revistas y libros. El PCR en tiempo real detectó varios genotipos del Virus del Papiloma Humano a la vez por la replicación de fragmentos de ADN con fluorescencia en muestras cérvico vaginal o biopsias como método de prevención y control, los resultados fueron interpretados por la amplificación como positivos o negativos. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas provocó una señal proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-VPH de manera precoz, se utilizó suero o plasma, los resultados fueron en base a la densidad óptica como positivos o negativos y en citología se recolectó células cervicovaginales para la observación de cambios morfológicos con un reporte en base a Bethesda.

Palabras claves: Virus del Papiloma Humano, verrugas, PCR en tiempo real, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citocervico vaginal.

ABSTRACT

The aim of the research is to examine the description of the Human Papilloma Virus using real-time PCR molecular and immunological techniques, enzyme-linked immunosorbent assay, and cytological cervicovaginal. This descriptive level study used different literature, documentary-bibliographic design based on previous and published studies, a temporal sequence with a cross-sectional cohort that will cover the years 2016 to 2020. The chronology of the events was retrospective with data prior to the year it carried out. The population constituted 51 documents on a scientific basis. The sample worked on in its entirety, the inclusion criteria were articles updated to the years mentioned related to the subject in English and Spanish, and exclusion criteria were articles from years lower than 2016 not related to the subject. The technique was the observation, and the procedures were the collection and review of information. The instruments were guides, magazines, and books. The real-time PCR detected several genotypes of the Human Papilloma Virus at the same time by the replication of DNA fragments with fluorescence in cervicovaginal samples or biopsies, as a prevention and control method, the results interpreted by the amplification as positive or negative. The enzyme-linked immunosorbent assay elicited a signal proportional to the amount of anti-HPV IgG antibodies early. It used serum or plasma and interpreted the results based on optical density as positive or negative, and the cervicovaginal cells collected in the pap smear for the observation of morphological changes with a report based on Bethesda.

Keywords: Human Papilloma Virus, warts, real-time PCR, enzyme-linked immunosorbent assay, and cervicovaginal.

Reviewed by:

Mgs. Maritza Chávez Aguagallo

ENGLISH PROFESSOR

c.c. 0602232324

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) está dada por las relaciones sexuales que hoy en día son más tempranas y la mayoría pasan desapercibidas durante mucho tiempo ¹. Su transmisión se da por relaciones sexuales vaginales, anales u orales con una persona infectada que puede o no presentar síntomas de la enfermedad como verrugas y papilomas. El virus está relacionado con lesiones benignas, premalignas y malignas del tracto orofaríngeo, anogenital, piel y otras ubicaciones ². Por lo cual se han desarrollado varias técnicas que muestran una gran variabilidad en los métodos aplicados para las pruebas diagnósticas del virus. Su uso dependerá del método en sí, teniendo en cuenta las características de la población/muestra evaluada, tipo de lesiones, cantidad y calidad del material biológico. El incremento de técnicas de diagnóstico mejora la eficiencia, precisión y efectividad de la detección oportuna de cáncer ¹.

A nivel mundial los cinco tipos más comunes fueron Virus del Papiloma Humano 16 (3,2 %), 18 (1,4 %), 52 (0,9 %), 31 (0,8 %) y 58 (0,7 %). El Virus del Papiloma Humano 16 siendo el tipo más común en todas las regiones geográficas indica una alta prevalencia tanto en infecciones simples como múltiples. No obstante, se observa pequeñas variaciones entre regiones geográficas y países de una misma región: América del norte y Europa son áreas con baja prevalencia del virus, pero su frecuencia de Virus del Papiloma Humano 16 fue alta. Los países de Europa del este, con respecto al resto del continente, presentaron las mayores frecuencias por el tipo 16 ³.

El Virus del Papiloma Humano 18 mostró ser el segundo tipo más frecuente a nivel mundial. Sin embargo, puede observarse diferencias como en Europa, donde ocupó el segundo lugar el Virus del Papiloma Humano tipo 31. En América Latina y el Caribe presentaron frecuencias similares los tipos 18 y 31. El tipo 52 resultó ser el tercero más frecuente a nivel global, pero en los países del este africano, Japón y Taiwán, ocupa el primer lugar entre las infecciones por estos virus. El Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo fue el tipo 6, frecuentes en los continentes americanos y europeos ³.

En América Latina la génesis del cáncer cérvico uterino es la infección constante por el Virus del Papiloma Humano de alto riesgo para los tipos virales 16 y 18, esta se presenta como la tercera causa de muerte por cáncer en las mujeres de la región, siendo superado por el cáncer de pulmón y de glándula mamaria, en algunos países como El Salvador, Nicaragua, Bolivia,

Honduras, Paraguay y Ecuador que aún continúa encabezando la mortalidad por cáncer en mujeres ⁴.

En mujeres de nacionalidades indígenas del sur del Ecuador presentaron genotipos de alto riesgo oncogénico con un 9,94 % referente al genotipo 58; 9,36 % genotipo 59; 8,77 % genotipo 39; 5,85 % genotipos 16 y 31; 5,26 % genotipos 66 y 68; 4,68 % genotipo 53; 3,51 % genotipo 52; 2,92 % genotipo 51 y 82; 1,75 % genotipos 18, 45 y 69; 1,17 % genotipos 26 y 56; 0,58 % genotipos 33 y 35; seguido de genotipos de bajo riesgo oncogénico, en las cuales se evidenció: 6,43 % genotipo 42; 5,26 % genotipo 54; 3,51 % genotipo 61 y 6; 2,92 % genotipo 70; 2,34 % genotipo 43; 1,17 % genotipo 44 y un 0,58 % del genotipo 40 ⁵. Se pretende analizar la técnica que brinde resultados verídicos para el diagnóstico de virus de papiloma humano ya que algunos presentan una sensibilidad y especificidad intermedias las cuales no dan una seguridad en su totalidad.

En el capítulo I se encontrará el estado del arte relacionado a la temática sobre los conceptos, definiciones, epidemiología, síntomas, morfología del Virus del Papiloma Humano, sus factores de riesgo en base al virus se describirá tipo de muestra, materiales, equipos, reactivo, exámenes necesarios entre los que se encuentran: técnicas moleculares PCR en tiempo real, inmunológicas ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citológicas citocervico vaginal.

En el capítulo II se encontrará la metodología donde se explicará el nivel de la investigación su diseño, secuencia temporal, población, muestra, técnicas, procedimientos y procedimientos estadísticos.

En el capítulo III se mostrará el desarrollo donde se dará a conocer los resultados con su análisis y discusión en base a la investigación.

El Virus del Papiloma Humano se manifiesta con alteraciones que ocasionan lesiones verrugosas siendo observadas como masas suaves y húmedas, una o varias, pequeñas o grandes, del color de la piel o rosadas, tanto benignas o malignas, visibles o no con forma de coliflor. Aparecen en zonas húmedas y de alta fricción durante el acto sexual como: vulva, vagina, cuello uterino y ano en la mujer, mientras que en el hombre se presenta en el ingle o muslo, pene, la punta del pene y escroto². El hombre presenta un papel de alta relevancia en la transmisión de este virus ya que es considerado un vector silencioso, sólo el 1% presenta algún signo o síntoma clínico relacionado a lesiones tipo verrugas. En el caso de las mujeres es todo lo contrario pues esta infección se presenta en un mayor porcentaje con el 99,7% de

los casos siendo el agente causal del cáncer cervicouterino (CCU). Las clases de VPH que pueden causar cáncer son distintos de los que producen verrugas genitales ⁶.

La infección genital por el Virus del Papiloma Humano es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) muy frecuentes donde el 80% de los individuos sexualmente activos se verán perjudicados por esta infección a lo largo de su vida. Un 50% de las mujeres adquieren el VPH en los 4-5 primeros años tras iniciar su vida sexual ⁷. El elevado intercambio de parejas sexuales es uno de los factores de riesgo más importantes para la transmisión directa del virus ⁸ lo que da como resultado que el genoma viral se incorpora al genoma de la célula hospedera provocando daño en el mismo ⁹. Existe varios tipos virales que son causas necesarias, pero no lo suficientes para la producción de cáncer, requiriendo cofactores como: relaciones sexuales a edad temprana, varias parejas sexuales, compañero con múltiples compañeras sexuales pasadas o presentes, consumo de anticonceptivos orales por más de 5 años, multiparidad, tabaquismo, otras infecciones de transmisión sexual, tamizaje insuficiente, inhalar producto que contenga sustancias cancerígenas y alteraciones inmunológicas ¹⁰.

En gran parte el virus se elimina de forma natural, pero al mantenerse la infección se produce un daño genético en la célula hospedera produciéndose o desarrollándose lesiones precursoras o lesiones intraepiteliales (LIE) y el cáncer ¹¹. Las infecciones de transmisión sexual representan una de las causas crucial de morbilidad y mortalidad. Un aproximado de 6.000 personas con edades mayores a los 15 años se infectan diariamente de alguna infección de transmisión sexual y de este grupo el 41% tiene edades inferiores a 24 años. El Virus del Papiloma Humano se ha considerado como un problema de salud pública, ya que afecta significativamente a nivel social, económico, psicológico y biológico a millones de personas en todo el mundo ¹².

Estos virus han mutado junto a su hospedero natural siendo específicos en cada una de las especies que infectan, de estos se han aislados más de 120 genotipos ¹³. Los Virus del Papiloma Humano transmitidos por vía sexual son aproximadamente 40 tipos en VPH de bajo riesgo y alto riesgo oncogénico. Los VPH de bajo riesgo (BR / VPH-BR) rara vez se convierten en cáncer causando verrugas (papilomas) en hombres como en mujeres los cuales incluyen los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 siendo los más recurrentes el 6 y 11. Aquellos que sí pueden causar cáncer tanto en hombres como en mujeres son llamados de alto riesgo (AR /

VPH-AR) incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70 siendo los recurrentes 16 y 18 ⁶.

El diagnóstico temprano es una medida importante para el control de la carga de la enfermedad. Al ser detectada la enfermedad en fases tempranas junto con el acceso a tratamientos efectivos mejora el pronóstico y supervivencia de los pacientes ¹⁴, proponiéndose así el siguiente problema: ¿Es de utilidad examinar la caracterización del Virus del Papiloma Humano mediante técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas?

Se da importancia al virus debido a que son los responsables de las verrugas genitales, cutáneas y el 99.7 % de los casos de cáncer cervicouterino son dados por el HPV especialmente el tipo 16 y 18 que también puede causar cáncer en las partes vaginal, anal, orofaríngea y vulva, este virus se contagia a través de relaciones sexuales con una persona infectada, el uso del preservativo reduce el riesgo de 65% al 85% de transmisión, pero no lo reduce por completo ¹⁵.

Morfología

El Virus del Papiloma Humano tiene un genoma de DNA bicatenario, circular, icosaédrico, sin envoltura, 55 nm de diámetro, 8 kbp, PM 5 millones con una composición de DNA (10%), proteínas (90%), ¹⁶ sus serotipos se clasifican según su potencial oncogénico: las cepas 6 y 11 tiene un DNA viral que no se integra al genoma de la célula infectada, causan verrugas genitales considerándose de bajo riesgo (VPH-BR), las cepas 16 y 18 son de alto riesgo (VPHAR), relacionada a lesiones displásicas y su potencial oncogénico realiza una integración en el genoma de la célula del huésped, producen las oncoproteínas E6 y E7 que dan la inmortalización de las células infectadas ¹⁷.

E6 se une a p53 intracelular para provocar su degradación. El p53 es una proteína supresora de tumores ya que promueve la apoptosis es decir la muerte celular programada de células dañados o infectadas. E7 activa el ciclo celular permitiendo la replicación. En las células no patológicas el ciclo celular se detiene en G1 con la unión de Rb (retinoblastoma es una proteína supresora de tumores que actúa como un freno al progreso de la célula desde la fase G1 de crecimiento a la fase S de síntesis del ciclo celular¹⁸) a E2F. E2F es una proteína que actúa como activador transcripcional para que la célula avance a la fase S, pero no puede cuando está unida a Rb. Las cepas de alto riesgo de VPH E7 se une a Rb, provocando la

liberación de E2F. Con E2F libre de Rb, se activa e indica a las células infectadas que comiencen la fase S para el periodo de síntesis o replicación ¹⁶.

Datos clínicos

En la mujer es importante la presencia de sangrado entre períodos, cambios en el ciclo menstrual, dispareunia, dolor pélvico, disuria¹⁶, sangrado vaginal después de la menopausia, flujo vaginal acuoso con sangre abundante y un olor fétido¹⁹, cambios en las deposiciones, pérdida de peso involuntaria y hematuria ²⁰.

En los hombres la mucosa del glande y del prepucio se vuelve más frágil, causando que se irrite con frecuencia tras las relaciones sexuales, observándose pequeñas manchas rojizas en el pene casi siempre en las mismas zonas, estas manchas no dolorosas vienen y se van ²¹. También tienen hasta cuatro veces más probabilidades de desarrollar cánceres relacionados con el HPV debido al sexo oral el cual abarca zonas como la garganta, detrás de la boca, las amígdalas, el paladar blando e incluye el tercio posterior de la lengua, presentando úlceras bucales dolorosas que no muestran mejoría en varias semanas, bultos en la boca y en el cuello que no desaparecen, aflojamiento de los dientes o alvéolos que no sanan después de las extracciones, entumecimiento en el labio o la lengua, manchas blancas o rojas en el revestimiento de la boca o la lengua ²².

Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el cáncer se relacionan con los hábitos y estilo de vida frecuente como: Se transmite de una persona a otra durante el contacto directo con la piel, uso de anticonceptivos orales por más de 5 años, al igual que ser multípara con más de 5 embarazos a término, una mala alimentación no es de ayuda en la producción de anticuerpos para hacer frente al VPH, el alcoholismo causa mayor progresión de infección VPH hacia cáncer invasor cervical y de vagina, la inmunosupresión limita la capacidad del cuerpo para la producción de anticuerpos, conductas de inicio temprano en las relaciones sexuales, compañero sexual promiscuo, así como múltiples compañeros sexuales y tabaquismo los cuales se han encontrado sustancias carcinógenas en la mucosa cervical y se cree que estas sustancias dañan el ADN (ácido desoxirribonucleico) de las células del cuello uterino involucrándose con el desarrollo del cáncer ²³.

Los exámenes de detección del cáncer son importantes para el cuidado médico regular, la identificación de lesiones precancerosas causadas por el VPH puede ser removidas con el fin de impedir que se hagan cánceres invasores o para encontrar cánceres en un estadio inicial que pueden ser tratados con éxito ²⁴.

Técnicas moleculares - PCR en tiempo real

En el combate contra las enfermedades infecciosas se ha visto necesario la optimización de la especificidad, sensibilidad y rapidez de técnicas de diagnóstico tradicional, han emergido técnicas de laboratorio con fundamento en biología molecular para la prevención, control y tratamiento ²⁵.

La técnica de PCR en tiempo real está basada en la replicación celular para obtener varias copias de un pequeño fragmento del ADN mediante la amplificación. El ADN blanco que se amplifica se detecta de forma simultánea según se vayan generando con el uso de moléculas con fluorescencia que absorben radiación de una longitud de onda determinada y emite la energía absorbida llamados fluoróforos que poseen una emisión proporcional al número de moléculas producidas siendo así una prueba cuantitativa ²⁶.

La cantidad de ADN esta medida por el valor Ct (Ciclo umbral) en cada ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia es detectada y esta correlacionada con la concentración del producto de ADN amplificado. El valor Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra es decir que una alta concentración de ADN tendrá un valor Ct menor en la señal de fluorescencia. Para obtener valores de Ct producto de amplificaciones específicas se realiza la temperatura de disociación (Tm) de los amplificados. Una reacción de PCR inespecífica muestras varias temperaturas y un valor de Ct es correcto con una sola temperatura de separación en cada reacción de PCR en tiempo real ²⁷.

La cuantificación de ADN por PCR en tiempo real puede ser absoluta o relativa. La cuantificación absoluta utiliza la curva de calibración para determinar la concentración de ADN en una muestra según el valor de Ct. La cuantificación relativa utiliza un gen o grupo de referencia según la concentración de ADN de un gen o de un microorganismo que se desea analizar ²⁷.

Recogida de la muestra para PCR en tiempo real

Se recogió la muestra dependiendo de la localización con el cepillado o una biopsia, en medio líquido en recipientes estériles de cierre hermético. Los cepillos son estériles y de material inerte evitando el de algodón debido a que son materiales naturales que inhiben la PCR. Se rechazan muestras con más de un 2% v/v de sangre ya que la hemoglobina inhibe la PCR. Para el cepillado cérvico vaginal se introdujo el citobrush las dos terceras partes del canal endocervical y rotando de manera suave entre 90 y 180 grados o 5 veces según las agujas del reloj para colocarlo en un medio de transporte líquido, si se desprende el cabezal se dejará en su interior o en el caso contrario se frotará 10 veces en el fondo del vial con el medio de transporte y se desechará ²⁸.

Para el cepillado anal en mujeres como en hombres se los toma de varias zonas al azar. Para la toma de muestra genitourinaria en el varón se pueden utilizar cepillados, orina, semen o la triple toma en glande en el surco coronario es decir la hendidura después del glande y uretra distal que corresponde a la mitad de la uretra colocando los tres cepillos en un mismo vial. Se pueden realizar cepillados de las amígdalas, interior de la boca y bordes de la lengua para infección oral, pero para un cribado de cáncer orofaríngeo se realiza una biopsia evitando el formol ya que inhibe la PCR ²⁸.

Extracción del ADN

Se realizó un tratamiento previo agitando con un vórtex el tubo que contiene el citobrush, para desprender las células que pudieran quedar en el mismo. Se retiró el citobrush y la solución restante fue trasvasada a un tubo de 1,5 mL. Se concentró la muestra por centrifugación a 12 000 rpm por 5 minutos, luego se eliminó todo el sobrenadante y se añadió el tubo blanco de extracción.

Para la extracción y purificación, se adicionó a la muestra 360 µL de buffer de lisis para destruir la membrana nuclear y liberar el ADN puro y 3 µL de β-mercaptoetanol para la desnaturalización de estructuras ricas en GC. Se incubó durante 1 hora en baño maría a 65°C, agitando en vórtex cada 10 minutos. Se adicionó 90 µL de acetato de potasio 8 M para precipitar las proteínas y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, posterior a esto se recuperó el sobrenadante en otro tubo de 1,5 mL (se repitió este paso dos veces) ²⁹.

En la precipitación, se añadió 450 µL de isopropanol el cual precipita el DNA porque compite con este por el agua, deshidratándolo y llevándolo al fondo del tubo y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 450 µL de etanol para precipitar al 70% y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos. Luego se dejó secar hasta eliminar la humedad. Se resuspendió en 25 µL de H₂O ultra pura. La diferencia entre etanol y el isopropanol es que el isopropanol posee una mayor capacidad y por lo tanto es posible usar menor volumen ²⁹.

Cálculos de los reactivos para PCR en tiempo real

PCR en tiempo real requiere los siguientes reactivos:

1. Cadena de ADN que contenga la región diana a ser amplificada es decir la muestra ²⁶.
2. Dos primers o cebadores que sean complementarios a la región 5' o 3' terminales del ADN lo cuales son oligonucleótidos con una secuencia corta de ADN diseñados específicamente para el fragmento génico que se necesita amplificar ³⁰.
3. Taq ADN polimerasa que es una enzima termoestable capaz de replicar ácidos nucleicos proviene de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de altas temperaturas dándole al ADN polimerasa esta cualidad ²⁶.
4. Trifosfatos desoxinucleósidos (dNTPs) está compuesto de bases nitrogenadas (citocina, adenina, guanina y timina) el cual sirve para que el ADN polimerasa sintetice la cadena nueva de ADN ²⁶.
5. Solución buffer es la solución amortiguadora con una dilución de Tris-HCl con cloruro potásico que proporciona un ambiente químico adecuado para la actividad y estabilidad de la ADN polimerasa manteniendo un pH estable ²⁶.
6. Cationes divalentes, iones de magnesio o manganeso (Mg²⁺) es un cofactor es decir una molécula que depende de su concentración la eficiencia de la reacción de la polimerasa ²⁶.
7. Sondas son fragmentos de ADN o ARN que son marcados para emitir fluorescencia al incorporarse en el surco mayor el cual es más profundo y amplio en el ADN ²⁶.
8. El agua destilada o ultrapura libre de nucleasas y enzimas que degraden a los ácidos nucleicos la cual actúa como disolvente ²⁶.

Tabla 1. Concentraciones y volúmenes MY09-11 Taq Platinum-Invitrogen para HPV ²⁹.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial

Buffer 10X	10 X	1 X	1,28 µl
Cebador de avance 10 mM	10 mM	0,2 mM	0,25 µl
Cebador de regresión 10 mM	10 mM	0,2 mM	0,25 µl
dNTPs 5 mM/C	5 mM/C	0,2 mM/C	0,5 µl
MgCL ₂ 50 mM	50 mM	2,75 mM	0,6875 µl
Taq Platinum 5 U/µl	5 U/µl	0,625 U/µl	0,125 µl
Sonda 5 µM	5 µM	50 µM	0.25 µl
ADN	>100 ng		5 µl
Agua			4,4075 µl
Volumen final			12,75 µl

Iglesias S, Serquén L. Virus papiloma humano y factores asociados en pacientes con citología desconocida atendidas en el norte de Perú. Rev Peru Ginecol Obstet. [Internet]. 2020 [citado 2021 Mar 16] ; 66 (1); 2.Obtenido de:<http://www.scielo.org.pe/pdf/rgo/v66n3/2304-5132-rgo-66-03-00009.pdf>

Primers y sondas diseñadas Taqman para VPH16 y VPH18

VPH16

Primer de avance: E6-Fw AGAATGTGTGTACTGCAAGCAACA

Primer de regresión: E6-Rv ATAAATCCCGAAAAGCAAAGTCAT

Sonda: 6FAM-TTACTGCGACGTGAGGTA-MGB/NFQ

VPH18

Primer de avance: E7-Fw CCGACGAGCCGAACCA

Primer de regresión: E7-Rv TGGCTTCACACTTACAACACATACA

Sonda: VIC-AACGTCACACAATGTT-MGB/NFQ³¹.

Los primers de avance sintetiza la cadena 5' a 3' y los primers de regresión sintetizan la cadena 3' a 5'.

Condiciones del equipo PCR en tiempo real

La reacción es un proceso de 3 etapas: desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión. Desnaturalización: Es necesario que el ADN molde se encuentren en forma de cadena simple para que se produzca la reacción. Se lo obtiene con altas temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los enlaces de puentes de hidrógeno intercatenarios provocando así la separación de ambas cadenas y se asegura su separación al mantener la

temperatura durante unos segundos o minutos ya que al desnaturalizarse parcialmente se volverá a renaturalizar muy rápido provocando errores en la hibridación y extensión ³¹.

Hibridación: Al estar el ADN desnaturalizado se disminuye la temperatura de la reacción entre los 40 y los 60°C para que se produzca la hibridación de los cebadores a las secuencias específicas del fragmento que se amplificara. La temperatura se establece para cada reacción de acuerdo con la longitud de los cebadores y su secuencia ³¹. **Extensión:** La ADN polimerasa agrega nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizando como molde la cadena de ADN desnaturalizada con una temperatura de 72°C así alcanza su máxima actividad ³².

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador en tiempo real RotorGene 3000, las diferentes etapas de la amplificación consisten en una fase de desnaturalización hibridación y extensión, las condiciones fueron: 95°C 15 min; 5 ciclos x (95°C 5 seg, 60°C 20 seg, 72°C 15 seg); 40 ciclos x (95°C 5 seg, 60°C 20 seg (detección de fluorescencia), 72°C 15 seg). Los resultados fueron analizados con el software Rotor-Gene Q Series Software ³³.

Resultados del PCR en tiempo real

Como paso final está el análisis de la reacción para precisar la cuantificación genética mediante un PC con un software en el termociclador que genera graficas con todos los datos necesarios para identificar si la reacción fue exitosa llamadas amplificación que muestra el progreso de la reacción. En el eje X señala los ciclos de la reacción y en el eje Y señala la cantidad de fluorescencia (Anexo 1)³¹.

Técnicas inmunológicas-ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Toma de muestra para microelisa

La sangre se extrajo por venopunción pueden ser con un tubo tapa roja, citrato, EDTA o heparina para obtener suero o plasma ya que no se ha observado influencia en la preparación de la muestra las cuales deben estar rotuladas. Las muestras hemolizadas e hiperlipémicas se descartan ya que generaran resultados falsos ³⁴.

Las microplacas están recubiertas con VLP (partículas similares al virus) recombinantes derivados del VPH tipo 6, 11, 16 y 18. En la incubación, la fase sólida se trata con muestras

diluidas y se capturan IgG anti-VPH, si están presentes por los antígenos. Después de lavar todos los demás componentes de la muestra, en la 2a incubación se unió el anti-VPH. Las IgG se detectan mediante la adición de un anticuerpo anti hIgG, marcado con peroxidasa (HRP). La enzima capturada en la fase sólida actúa sobre la mezcla sustrato / cromógeno, provocando una señal que es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-VPH presentes en la muestra. Un valor de corte convierte las densidades ópticas medidas en resultados positivos o negativos (Anexo 2)³⁴.

Procedimiento del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Dilución de las muestras 1:101 en un tubo (ejemplo: 1000 µL de diluyente de muestra + 10 µL muestra) y agitarlos en el vórtex. El pozo A1 fue vacío para el deblanking y se dispenseo 100 µL de control negativo y de control positivo por duplicado. Luego, se dispenseo 100 µL de muestras diluidas en cada pocillo identificado. Se incubo la microplaca durante 60 min a + 37 ° C. Se lavo la microplaca con un lavador automático que realiza 4-5 ciclos de lavado los cuales constan de aspiración + dispensación de 350 µL / pocillo de lavado solución = 1 ciclo con un remojo de 20 a 30 segundos entre ciclos ³⁴.

Se pipeteó 100 µL de conjugado enzimático en cada pocillo, a excepción del pocillo A1, y se cubrió con el sellador. Contiene anticuerpos policlonales conjugados con peroxidasa de rábano picante a IgG humana, 5% BSA que es albúmina de suero bovino como agente bloqueante, 10 mM Tris tampón (trisaminometano) pH 6,8 Kathon GC al 0,1% el cual es combinación de dos metil-cloro-isotiazolinona y metil-isotiazolinona utilizado como un conservantes y sulfato de gentamicina al 0,02% como conservantes. Se incubo la microplaca 60 min a + 37 ° C. Se lavó los micropocillos como se explicó anteriormente ³⁴.

Se pipeteó 100 µL de mezcla de cromógeno / sustrato en cada pocillo y el pocillo del blanco, el cromógeno / sustrato contiene tampón de citrato-fosfato 50 mM pH 3,5-3,8, 4% de dimetilsulfóxido, 0,03% de tetrametilbencidina (o TMB) y peróxido de hidrógeno al 0,02% (o H2O2) para después incubar la microplaca a temperatura ambiente (18-24 ° C) durante 20 minutos. Se pipeteó 100 µL de ácido sulfúrico en todos los pocillos y el pocillo del blanco, aquí se mostró un cambio de color en las muestras positivas de azul a amarillo. Se midió la intensidad del color a 450 nm ³⁴.

Control de calidad interno: Pocillo blanco A1 < 0,100 DO 450 nm, control negativo < 0,150 DO 450 nm después del blanco, control positivo > 0.500 DO 450 nm después del control

negativo. Se utilizó el valor medio de DO 450 nm del control negativo y luego se aplica la siguiente fórmula para calcular el valor de corte: $NC + 0.250 = \text{Corte}$. En la interpretación de resultados las muestras con una DO 450 nm inferior al valor de corte son consideradas no reactivas para la IgG de los antígenos del HPV. Las muestras con una DO 450nm superior al valor de corte son consideradas positivas para IgG del HPV de los antígenos ³⁴.

Técnicas citológicas-citocervico vaginal

Es una prueba diagnóstica que consiste en recoger una muestra de células del cérvix, cuello del útero, canal cervical o zona afectada para la observación de la morfología celular mediante microscopia con el uso de tinciones que permitan diferentes contrastes en las células ³⁵.

Toma de muestra citocervico vaginal

Se realizó una toma cérvico vaginal con la paciente en posición ginecológica en una camilla colocando el espéculo con las valvas cerradas en disposición paralela al eje longitudinal del paciente y se lo introdujo, se giró el espéculo hasta que las valvas queden en disposición perpendicular al eje longitudinal del paciente, se fijó las valvas centrándolo en el cérvix. Con la espátula Ayre se tomó muestra del exocérvix y endocérvix con un giro de 360°. Con el citobrush se introdujo en el canal endocervical con un giro de 90°, una sobre rotación puede distorsionar las células y provocar sangrados. El portaobjetos se divide en dos longitudinalmente por un lado del exocérvix y endocérvix de la espátula y del endocérvix con el citobrush rodando sobre la superficie se fija de inmediato con citocell a una distancia de 20 cm por 5 segundos. Se cierra el espéculo lentamente y se retira en una posición de 45° ³⁶.

Principio de la técnica de coloración modificada de Papanicolaou

El portaobjetos pasó a un baño de alcohol de 96% para eliminar el excedente de resina fijadora. Se realizó la coloración modificada de Papanicolaou el cual reduce y elimina reactivos tóxicos y cancerígenos. Para la coloración del núcleo se utilizó hematoxilina progresiva de Harris (coloración violeta azulado) permite la coloración en un solo punto y no necesita un diferenciador tradicional para remover el exceso de hematoxilina. Para la coloración del citoplasma se utilizó la solución policromática Orange G (coloración naranja)

y EA con eosina (coloración rosada), verde claro (verde azulado) y pardo de Bismarck (coloración pardo amarillento) en un solo paso, reduciendo la cantidad de alcoholes entre las fases. Para terminar en la fase de aclaramiento se usó resina de montaje entellan ya que los acrilatos mixtos de la resina confieren el aclaramiento completo ³⁷.

Procedimiento de coloración modificada de Papanicolaou

El esquema de coloración es el siguiente:

- Fase de hidratación: Agua de grifo con 10 inmersiones.
- Fase de coloración nuclear: Hematoxilina (colorante básico afinidad por estructuras acidas - núcleo) eosina de Harris (colorante ácido afinidad por estructuras básicas como el citoplasma) de 1 a 3 minutos, agua de grifo 10 inmersiones y alcohol 96 % 1 minuto.
- Fase de coloración citoplasmática: solución policromática (colorante ácido afinidad por estructuras básicas - citoplasma, células escamosas inmaduras y mucina que produce la secreción mucosa) 30 a 60 segundos y alcohol al 96% durante 1 minuto.
- Fase de aclaramiento y montaje: alcohol al 96 % 1 minuto y la resina entellan ³⁸.

La secreción vaginal, la sangre y los lubricantes pueden interferir con la interpretación de las pruebas de papanicolaou. Al realizar una prueba de papanicolaou, muchos profesionales usan agua o una pequeña cantidad de lubricante a base de agua para minimizar la incomodidad del paciente ³⁷. Los cambios morfológicos en las células anormales incluyen multinucleación, hipercromasia, vacuolización citoplásmica perinuclear, núcleos grandes alrededor de tres veces más que el núcleo celular normal, niveles más altos de queratinización, pero ausencia de nucléolos. Estos cambios que sufren las células escamosas se clasifican como coilocitos (Anexo 3)¹⁶.

Los virus de mucosa de alto riesgo poseen un tropismo por los queratinocitos lo cuales se encuentran en las células de la capa basal del cuello uterino y de la mucosa oral pueden llegar a provocar una progresión de la infección viral en el cuello uterino³⁹.

Cuadro 1. Cuadro de los diferentes sistemas de reporte en citología.

Sistema de Papanicolaou	Sistema de Richart	Sistema Bethesda
Negativa (I)	Negativa	Negativa

II	Atipia escamosa reactiva o imposible de clasificar	ASCUS-ASCH
	Infección por VPH	
III	Neoplasia intraepitelial cervical Grado I (NIC I)	Lesiones intraepiteliales de bajo grado de malignidad
III	Neoplasia intraepitelial cervical Grado II (NIC II)	Lesiones intraepiteliales de alto grado de malignidad
III	Neoplasia intraepitelial cervical Grado III (NIC III)	
IV	Carcinoma in situ	
V	Cáncer escamoso invasor del cuello uterino	

Fuente: Zamora R, Ybaseta J, Palomino A. Relación entre citología, biopsia y colposcopia en cáncer cérvico uterino. Rev méd panacea [Internet]. 2019 [citado 2021 Ene 19]; 8(1):37. Obtenido de: <https://doi.org/10.35563/rmp.v8i1.13>

Otros métodos de diagnóstico

Captura Híbrida II

Es la única prueba aprobada por la FDA para detectar el ADN de HPV de alto riesgo con una sensibilidad de 100% y especificidad de 96% donde se observa células cervicouterinas exfoliadas con un cepillo diseñado especial el cual se coloca en un medio líquido o en el fluido residual que sobra de las muestras de citología de base líquida, diseñada para detectar HPV AR tipo 16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, esta prueba detecta la presencia de uno o de varios tipos de VPH en el mismo momento. Su utilidad principal es detectar las cepas de alto riesgo que presenta las pacientes y tratar que estas lesiones no progresen a un cáncer invasivo, también es utilizada a manera de prevención siendo una recomendación ir incorporando este tipo de prueba ⁴⁰.

Citología base líquida: capa fina

La muestra se recolecta mediante un cepillo especial el cual es sumergido en un líquido conservador celular, se transporta en ese medio y el proceso de extensión y tinción se realiza mediante un proceso automatizado que acorta el tiempo y el número de muestras por procesar, se obtiene una muestra limpia de artefactos facilitando su interpretación⁴⁰.

Colposcopía

Vista aumentada del cuello uterino para detectar cambios celulares que pueden convertirse en cáncer, tiene una especificidad 82% y una sensibilidad 95% ⁴⁰.

Inspección visual con ácido acético (IVAA)

Se realiza una exploración vaginal con espéculo para aplicar ácido acético (vinagre) diluido de 3 a 5% en el cuello uterino con una torunda de algodón durante 1 minuto. También se puede realizar un tacto rectal cuando hay sospecha de VPH de alto riesgo o cáncer si existe una lesión visible en la región anal o perianal y realizar la respectiva citología, tiene una sensibilidad de 96% y una especificidad de 98%.

Categoría de los resultados de IVAA

Prueba negativa: Sin lesiones acetoblanco pálidas, pólipos, cervicitis, inflamaciones o quistes de Naboth.

Prueba positiva: áreas acetoblanco densas de color blanco opaco o blanco oster, nítidas, precisas, bien definidas, con o sin márgenes elevados que están en unión con las células escamosas cilíndricas, leucoplasias y verrugas.

Sospecha de cáncer: Lesión ulcerosa o en coliflor, visible clínicamente y sangrado al tacto de color acetoblanco ⁴¹.

Inspección visual con solución yodurada de Lugol (VILI)

También conocidas como la prueba de Schiller utiliza lugol para su coloración con una sensibilidad de 98% y especificidad de 91%.

Categoría de los resultados VILI

Negativo: Epitelio escamoso de color caoba o marrón oscuro y el epitelio cilíndrico no cambia de color o áreas irregulares con captación parcial de yodo o sin captación.

Positivo: Áreas bien definidas sin captación de yodo de color amarillo brillante: Amarillo mostaza, amarillo azafrán alrededor de la zona de transformación o cerca del orificio cervical.

Sospecha de cáncer: Tumor exofítico, endofítico, ulcerosos, visibles clínicamente, sangrado al tacto, sin captación de yodo, color amarillo mostaza o azafrán ⁴¹.

Telecolposcopia

Uso de tecnología y equipos para realizar un diagnóstico a distancia y tratamiento adecuado con una interacción del personal en un sitio diferente al que se está realizando la práctica en tiempo real ⁴¹.

Cervicografía

Fotografía de alta resolución del cuello uterino para su interpretación, para el tratamiento se realiza la remoción quirúrgica con bisturí o tijera, cauterización, criocirugía, electrocirugía y destrucción por láser ⁴¹.

El objetivo de la investigación es examinar la caracterización del Virus del Papiloma Humano mediante técnicas moleculares PCR en tiempo real, inmunológicas ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citológicas citocervico vaginal.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

Nivel: La presente investigación es de nivel descriptivo debido a la búsqueda de diferentes literaturas acordes al tema investigado técnicas moleculares como PCR en tiempo real, inmunológicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citológicas como el citocervico vaginal.

Diseño: De diseño documental–bibliográfica ya que se realizó una revisión para la investigación en base a estudios previos y publicados en revistas científicas con una literatura actualizada, con un tipo de diseño cualitativo debido a que se establece una relación entre los datos recopilados.

Secuencia temporal: Cohorte transversal ya que se efectúan en un momento o tiempo único tomando en cuenta los años 2016 al 2020.

Cronología de los hechos: Es retrospectivo porque los datos utilizados fueron tomados con un espacio de tiempo anterior al año realizado de los artículos científicos y de literatura actualizada acerca de las técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas en el Virus del Papiloma Humano.

Población: La población de estudio está constituida por 51 documentos actualizados validados, verificados e investigados que estas relacionadas con las técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas en el Virus del Papiloma Humano, siendo publicados en revistas con bases de datos regionales y de impacto mundial como: Scielo, Redalyc, PubMed, ProQuest, Medigraphic, Libros e Información en congresos publicados durante el periodo comprendido entre Enero 2016 y Febrero 2020.

Muestra: Se trabajó con su totalidad, se escogieron 51 publicaciones tomadas de las siguientes bases de datos con la distribución que se detalla a continuación: Scielo, Redalyc, PubMed, ProQuest, Medigraphic, Libros e Información en congresos. **Criterios de inclusión:** Artículos científicos pertenecientes al año 2016 al 2020 relacionados con técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas en el Virus del Papiloma Humano en el idioma (inglés y español) debido a que la mayoría de los resultados científicos en el área de las ciencias de la salud se publican en dichos idiomas en revistas de impacto mundial. **Criterios**

de exclusión: Artículos científicos de años inferiores al 2016 que no traten sobre el Virus del Papiloma Humano y sus técnicas.

Técnicas y procedimientos: Se utilizó la recolección y revisión de información junto con el análisis de literatura actualizada sobre la caracterización del Virus del Papiloma Humano mediante técnicas moleculares como el PCR en tiempo real, inmunológicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citológicas como el citocervico vaginal.

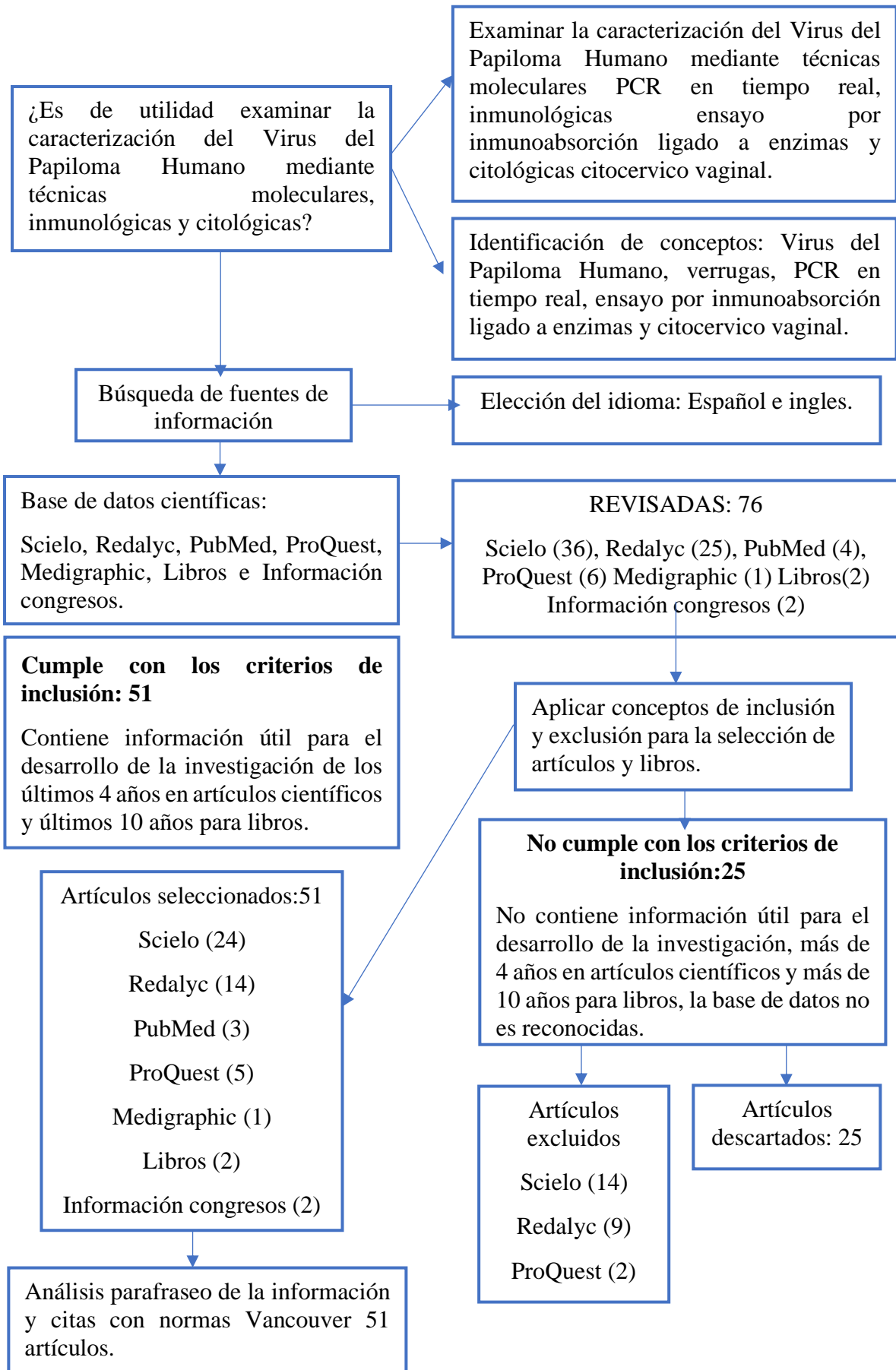
Técnicas: Observación

Instrumentos: Se utilizó guías como fuente de información en la recolección junto con revistas y libros que sea de aporte a la investigación que cumplan con el tiempo señalado anteriormente.

Procedimiento: Al ser aprobada la matrícula, el tema de investigación y la asignación de tutor por la comisión de carrera de titulación se realizó una reunión por teams para las indicaciones de la estructura y formato del proyecto de investigación por la docente a cargo y así proceder a realizar la búsqueda de artículos y libros que cumplan con el tiempo establecido y que sea acorde al tema de investigación las cuales son: técnicas moleculares como el PCR en tiempo real, inmunológicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y citológicas como citocervico vaginal.

Procesamiento estadístico: Se realizó mediante la aplicación de hojas de cálculo pertenecientes al sistema operativo Microsoft Office 2019, empleando la estadística descriptiva.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA



CAPÍTULO III. DESARROLLO

El Virus del Papiloma Humano ha incrementado su transmisión en la población humana debido a que cada vez son más frecuentes las relaciones sexuales sin ningún tipo de protección o la promiscuidad siendo necesario técnicas que brinden resultados de detección antes, durante y después de adquirir el virus.

En la investigación se muestra los resultados encontrados en los distintos estudios seleccionados sobre los diferentes métodos de diagnóstico mediante la recopilación de técnicas, el tipo de muestra a analizar para un procesamiento oportuno y los diferentes sistemas de reporte para un formato con una terminología uniforme en base a técnicas para el análisis del Virus del Papiloma Humano como la técnica molecular PCR en tiempo real, técnica inmunológica la que fue investigada ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y técnica citológica aplicado al citocervico vaginal, no se detallara en esta sección los temas de diagnóstico siguientes ya que fueron mencionados como referencia: captura hibrida II, citología base líquida: capa fina, colposcopía, inspección visual con ácido acético (IVAA) , inspección visual con solución yodurada de lugol (VILI), telecolposcopia y cervicografía.

Cada información recolectada está distribuida en 6 bases de datos de artículos del año 2016 al 2020 que muestren afinidad por el tema tratado, las bases científicas utilizadas fueron: Scielo, Redalyc, PubMed, ProQuest, Medigraphic, Libros e Información de congresos. Esta información fue analizada y discutida de acuerdo con los resultados en los artículos y según el punto de vista de cada investigador las cuales fueron descritas de forma tabular acogidas a normas metodológicas aprobadas internacionalmente para este tipo de tabulación, las cuales constan de la identificación, título, cuerpo de la tabla, notas explicativas o aclaratorias y la fuente de dato secundaria ya que se utilizó datos ya existentes independientemente del estudio.

Se realizaron 5 tabulaciones donde se menciona datos de relevancia como lo son: título, autor, año, tipo de estudio, población, objetivo y resultados siendo esencial esta información para la interpretación de los resultados, su análisis es en base a información verídica con su respectiva discusión, contrastando el marco teórico en donde los autores pueden coincidir o no en sus investigaciones dando una explicación a esta resolución.

Tabla 2. Método de diagnóstico en base a una técnica de análisis molecular mediante la recopilación de las mismas para el análisis del Virus del Papiloma Humano.

Título	Autor	Tipo de estudio	Población	Objetivo	Resultados
Identificación molecular de los VPH oncogénicos mediante PCR en tiempo real con sondas taqman	Diego Bonifaz Pérez y Omar Rocabado Calizaya, 2020.	Estudio transversal y descriptivo.	Se trabajó con 151 muestras de hisopados genitales en 134 mujeres y 17 varones.	Determinar la infección por VPH y los genotipos en muestras genitales de varones y mujeres mediante PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan.	En 151 muestras 41 casos positivos para VPH-AR con prevalencia de 30,6% en mujeres. De las 41 muestras positivas, resultaron 10 casos positivos para VPH16, 8 para VPH18 y 5 casos con coinfección por ambos VPH oncogénicos y los no reportados son otro tipo de VPH-AR.
Detección del HPV mediante técnica de autotoma en un grupo de universitarias peruanas.	Manrique Javier, Núñez María, Pretel Lizeth, Sullcahuaman Allende, Roa Ysis, Juárez Patricia et al,2018.	Estudio transversal.	Se trabajo con 221 estudiantes.	Determinar la frecuencia y genotipos del VPH-AR mediante la técnica de autotoma en universitarias de Lima.	La frecuencia del VPH-AR fue de 43,4 %. Se mostró el genotipo 16 en el 15,6%, el 18 en el 4,2%, y otros genotipos del VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) con un 80,2 %, infección mixta por el VPH 16 con otros genotipos del VPHAR en el 13,9 % y por el VPH

					18 con otros genotipos del VPH-AR en el 2,1 %.
Detección y tipificación del HPV en tamizaje virológico en lesiones del cuello uterino Paraguay.	María Liz Bobadilla et al, 2019	Estudio transversal.	Se trabajo con 495 mujeres atendidas en tres hospitales del sistema de salud pública.	Investigar aspectos epidemiológicos de la infección genital por el VPH-AR en mujeres de 25 a 64 años.	Se identificaron 19 tipos virales once de alto riesgo (16,18,31,33,39,45,51,52,56,58,59); tres de probable alto riesgo (26,66,68) y cinco de bajo riesgo (6,43,53,55,70).
Tipificación de Virus de Papiloma Humano lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cérvix.	María Pacheco, Hugo Calderas, Indalecio Rivero, Ana Briceño y Norelis Tineo et al, 2016.	Estudio descriptivo transversal, no experimental y de campo.	Se trabajó con 42 pacientes de consulta de Patología cervical.	Determinar los tipos de HPV con la técnica de cadena polimerasa en lesiones preneoplásicas y neoplásica.	Se mostró positivo para VPH un total de 24 pacientes y para negativo VPH en 18 pacientes indicando que la técnica obtuvo una sensibilidad de 57,1% y especificidad de un 42,9 %.
Prevalencia de infección por VPH-AR y citología anormal en zona de	Cristhiam Sánchez, Mónica Guerrero, Jorge Rubio, Edith Müller, Gustavo	Estudio de corte transversal.	Se trabajo con pacientes entre 30 y 65 años con diagnóstico de	Establecer la prevalencia de infección anal por HPV de alto riesgo y citología anal anormal	Se encontró que 10/32 (31,2 %) de las mujeres positivas para VPH-AR manifestaron genotipos 16 o 18, mientras que en 22/32 (68,8 %) de

transformación anal mujeres con displasia cervical Colombia.	Rey y Luz Díaz , 2020.		displasia cervical.	en mujeres con displasia cervical confirmada.	mostraron otros genotipos de alto riesgo diferentes a 16 o 18.
--	------------------------	--	---------------------	---	--

Tabla 3. Método de diagnóstico en base a una técnica de análisis inmunológica mediante la recopilación de las mismas para el análisis del Virus del Papiloma Humano.

Título	Autor	Tipo de estudio	Población	Objetivo	Resultados
Detección serológica del Virus Papiloma Humano en mujeres mayores de 20 años. Sector “Gary Esparza”, Babahoyo, Ecuador.	Edgar Rodas, Betty Pazmiño Gómez y Roberto Coello Peralta, 2017.	Estudio descriptivo, prospectivo y transversal.	Se trabajó con 97 pacientes mujeres, mayores de 20 años del sector Gary Esparza.	Determinar el cribado de detección de anticuerpos IgG contra los genotipos 6, 11, 16 y 18 del Virus del Papiloma Humano mediante la técnica serológica de Microelisa.	De las 23 mujeres edades entre 20 a 25 años, 1 caso positivo. De las 24 mujeres edades de 26 a 30 años, 3 casos positivos. De las 18 mujeres edades entre 31 a 40 años, 2 casos positivos. De 13 mujeres edades entre 41 a 50, 1 caso positivo. De 19 mujeres mayores de 50 años, 1 caso positivo.

<p>Detección de anticuerpos IgG e IgM específicos del HPV 16, indicador potencial del factor de riesgo del COCE.</p>	<p>Jesinda Kerishnan Subash CB Gopinath, Sia Bik Kai, Thean Hock Tang, Helen Lee- Ching Ng et al. 2016.</p>	-	<p>Se trabajó con un total de 206 muestras de sueros de carcinoma oral de células escamosas.</p>	<p>Determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM de HPV como un indicador de riesgo de carcinoma oral de células escamosas.</p>	<p>De los 197/206 pacientes con carcinoma oral de células escamosas y el control 89/134 fueron positivos para HPV IgG, mientras que solo 42/206 de los pacientes con carcinoma oral de células escamosas dieron positivo para HPV 16 IgM.</p>
--	---	---	--	--	---

Tabla 4. Método de diagnóstico en base a la técnica de análisis citológica mediante la recopilación de las mismas para el análisis del Virus del Papiloma Humano.

Título	Autor	Tipo de estudio	Población	Objetivo	Resultados
<p>Diagnóstico del HPV en mujeres fértiles del área de salud No. 1 de Azogues, Ecuador.</p>	<p>Johanna Paulina Estrada Cherres y Adriana Ulloa Castro, 2018.</p>	<p>Estudio prospectivo, tipo analítico y transversal.</p>	<p>Se trabajó con 117 mujeres.</p>	<p>Identificar la presencia del HPV en mujeres fértiles, demostrar la existencia y disponibilidad de la técnica de PCR.</p>	<p>Las pacientes dieron un resultado de 13.7 % ASC-US, un 7.7 % LIE-AG y un 6.8 % LIE-BG.</p>
<p>Frecuencia de alteraciones citológicas</p>	<p>Angélica Melo, Sonia Montenegro, Sandra Liempi,</p>	-	<p>Se trabajó con 182 mujeres sexualmente</p>	<p>Analizar el estado del cuello uterino, presencia del VPH y conductas</p>	<p>El 53,1% (94/177) Pap normal y 46,9% (83/177) alteraciones citológicas cervicales: 29,4%</p>

cervicales y HPV en estudiantes universitarias en Temuco, Chile.	Sergio Moreno, Tiare de La Barra, Pablo Guzmán et al, 2019.		activas, menores de 25 años y no vacunadas para el VPH.	sexuales en mujeres menores de 25 años.	inflamación inespecífica/hemorrágico, 2,3% Candida/VHS, 3,4% con signos de VPH, 10,2% frotis atípico y 1,7% NIE I.
Tamizaje del cáncer de cuello uterino con test de HVP. Primeros resultados en el sistema público de Uruguay	Guillermo Rodríguez, Laura García, Andrea Beracochea, Rafael Alonso, Benedicta Caserta y Natalia Pérez, 2019.	Estudio transversal	Se trabajó con 1.010 mujeres asintomáticas entre 30 y 64 años.	Analizar los resultados con la aplicación del test de HPV captura híbrida HC2 (Qiagen ^R) como test de tamizaje primario del cáncer de cuello uterino en una zona del departamento de Canelones.	El test de HPV fue positivo en 126/1.010 mujeres (12,5%) y el PAP anormal en 167/1.010 (16,5%). El test de HPV fue positivo en todos los casos CIN2+ 13/13 (100%) mientras que el PAP fue anormal (ASCUS+) en 7/13 (54%) para CIN2+ por biopsia.
Infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres con VIH/SIDA	Rodrigues Bianca, Holzmann Ana, Santos Amanda, Lima Cássio, Gonçalves Renata y Santos Paiva, 2016.	Estudio documental, exploratorio, descriptivo y cuantitativo.	Se trabajó con 113 pacientes de Montes Claros y otras ciudades del Norte de Minas Gerais.	Verificar la prevalencia del VPH en mujeres con VIH/SIDA, conocer características sociodemográficas, clínicas y comportamentales.	Se encontraron lesiones de VPH en (15,6%) de las mujeres, siendo clasificada como LSIL bajo grado (60%) de estas.

Tabla 5. Especificación el tipo de muestra a analizar según la técnicas moleculares, inmunológicas y citológicas para el procesamiento oportuno.

Título	Autor	Tipo de estudio	Población	Objetivo	Resultados
Genotipificación, niveles de expresión y estado físico del HPV en pacientes con COCE.	Alveiro Erika, Leidy Motta, Andrés Chala, Andrey Moreno, Fredy Gamboa, Dabeiba García, 2016.	Estudio multicéntrico, descriptivo y de corte transversal	Se trabajó con 46 pacientes con carcinoma de células escamosas en la cavidad oral.	Identificar los tipos del Virus del Papiloma Humano más frecuentes en el cáncer de la cavidad bucal, niveles de expresión y estado físico del genoma viral.	La determinación de los niveles de expresión estuvo presentes en seis de las nueve muestras con un (66,7 %) para el genotipo HPV-16, las copias por debajo de 1 se consideraron como inactivas en la transcripción.
Prevalencia de los genotipos de HPV en lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino Uruguay	Natalia Pérez Pérez, Sofía Tedesco, Fernando González, Juan M Lopez Jordi y Grazzia Rey, 2020.	Estudio transversal, observacional, descriptivo.	Se trabajó con 81 pacientes que consultaron en el Hospital de Clínicas.	Conocer la prevalencia de los diferentes genotipos de HPV en mujeres con lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino.	El HPV 16 estaba presente en 60% (45/79) del total de las muestras. El HPV 18, fue encontrado en 4% (3/75). El HPV 31, 33, y 45 ocuparon un 12% (9/75), 10,6% (8/75) y 5,3% (4/75) en el total de las muestras.

Prevalencia del HPV en pacientes con carcinoma escamoso de la cavidad oral.	Gina Pennacchiotti, Raúl Sáez, María J. Martínez, Marcela Cárcamo y Rodrigo Montes.	Estudio de corte transversal.	Se trabajó con 22 pacientes.	Determinar la prevalencia del VPH en pacientes con COCE en el Instituto nacional del Cáncer (INCANCER).	Se buscó VPH-16 a través de PCR en tiempo real y genérico para VPH-16 se confirmó su ausencia en la totalidad de las muestras.
Detección serológica del HPV en mujeres mayores de 20 años. Sector "Gary Esparza", Babahoyo, Ecuador.	Edgar Rodas, Betty Pazmiño Gómez y Roberto Coello Peralta, 2017.	Estudio descriptivo, prospectivo y transversal.	Se trabajó con 97 pacientes mujeres, mayores de 20 años del sector Gary Esparza.	Determinar el cribado de detección de anticuerpos IgG contra los genotipos 6, 11, 16 y 18 del Virus del Papiloma Humano mediante la técnica serológica de Microelisa.	De las 23 mujeres edades entre 20 a 25 años, 1 caso positivo. De las 24 mujeres edades de 26 a 30 años, 3 casos positivos. De las 18 mujeres edades entre 31 a 40 años, 2 casos positivos. De 13 mujeres edades entre 41 a 50, 1 caso positivo. De 19 mujeres mayores de 50 años, 1 caso positivo.
Detección de anticuerpos IgG e IgM específicos del HPV 16, indicador potencial del	Jesinda Kerishnan, Subash CB Gopinath, Sia Bik Kai ,Thean Hock Tang, Helen Lee-	-	Se trabajó con un total de 206 muestras de sueros de carcinoma oral	Determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM de HPV como indicador de riesgo de carcinoma oral de células escamosas.	De los 197/206 pacientes con carcinoma oral de células escamosas y el control 89/134 fueron positivos para HPV IgG, mientras que solo 42/206 de los pacientes con carcinoma oral de

factor de riesgo del COCE.	Ching Ng et al, 2016.		de células escamosas.		células escamosas dieron positivo para HPV 16 IgM.
Diagnóstico del HPV en mujeres fértiles del área de salud No. 1 de Azogues, Ecuador.	Johanna Estrada y Adriana Ulloa, 2018.	Estudio prospectivo, tipo analítico y transversal.	Se trabajó con 117 mujeres.	Identificar la presencia del HPV en mujeres fértiles, demostrar la disponibilidad de la técnica de PCR para la genotipificación del HPV.	Las pacientes dieron un resultado de 13.7 % ASC-US, un 7.7 % LIE-AG y un 6.8 % LIE-BG.
Frecuencia de alteraciones citológicas cervicales y HPV en estudiantes universitarias en Temuco, Chile.	Angélica Melo, Sonia Montenegro, Sandra Liempi, Sergio Moreno, Tiare de La Barra y Pablo Guzmán et al, 2019.	-	Se trabajó con 177 mujeres sexualmente activas menores de 25 años y no vacunadas para el VPH.	Analizar el estado del cuello uterino, presencia del VPH y conductas sexuales en mujeres menores de 25 años.	El 53,1% Pap normal y 46,9% alteraciones citológicas cervicales: 29,4% inflamación inespecífica/hemorrágico, 2,3% candida/VHS, 3,4% con signos de VPH, 10,2% frotis atípico y 1,7% NIE I.

Detección y tipificación del HPV tamizaje virológico para la detección de lesiones del cuello uterino en Paraguay.	María Bobadilla, Verónica Villagra, María Zorrilla, Gladys Olmedo, María Riveros y Francisco Franco et al, 2019	Estudio transversal	Se trabajó con 495 mujeres atendidas en servicios de patología cervical de tres hospitales.	Investigar los aspectos epidemiológicos de la infección genital por el (VPH-AR) en mujeres de 25 a 64 años que consultan en los servicios de Patología Cervical.	El 93,1% (461/495) no tenían lesión intraepitelial escamosa (N-SIL). El VPH-AR con 11,9% de los pacientes con N-SIL y la frecuencia de detección de VPH-AR aumentó en las pacientes con anomalías citológicas de mayor grado.
--	---	---------------------	---	--	---

Tabla 6. Sistemas de reporte para un formato con una terminología uniforme.

Título	Autor	Tipo de estudio	Población	Objetivo	Resultados
Tamizaje del cáncer de cuello uterino con test de HVP en el sistema público de Uruguay.	Guillermo Rodríguez, Laura García, Andrea Beracochea, Rafael Alonso, Benedicta Caserta y Natalia Pérez, 2019.	Estudio transversal	Se trabajó con 1.010 mujeres asintomáticas entre 30 y 64 años en el departamento de Canelones.	Analizar los resultados piloto con la aplicación del test de HPV captura híbrida HC2 (Qiagen ^R) como test de tamizaje primario del cáncer de cuello uterino.	El test de HPV fue positivo en 126 con un 12,5% y el PAP anormal en 167 con un 16,5%. El test de HPV fue positivo en todos los casos CIN2+ 13/13 (100%) mientras que el PAP fue anormal (ASCUS+) en 7/13 (54%) para CIN2+ por biopsia.

Infección por el VPH en mujeres con VIH/SIDA.	Rodrigues Bianca, Erika Ana, Santos Amanda, Lima Cássio, Gonçalves Renata.	Estudio documental, exploratorio, descriptivo y cuantitativo.	Se trabajó con 113 mujeres	Verificar la prevalencia del VPH en mujeres VIH/SIDA, características sociodemográficas, clínicas y comportamentales.	Se encontraron lesiones de VPH en (15,6%) de las mujeres, siendo clasificada como LSIL bajo grado (60%).
Detección y tipificación del HPV tamizaje virológico para la detección de lesiones del cuello uterino en Paraguay.	María Bobadilla, Verónica Villagra, María Zorrilla, Gladys Olmedo, María Riveros y Francisco Franco, et al, 2019.	Estudio transversal.	Se trabajó con 495 mujeres de patología cervical de tres hospitales.	Investigar los aspectos epidemiológicos de la infección genital por el VPH-AR en mujeres de 25 a 64 años en los servicios de Patología Cervical.	El 93,1% (461/495) no tenían lesión intraepitelial escamosa (N-SIL). Se detectó VPH-AR en 11,9% con N-SIL y la frecuencia de detección de VPH-AR aumentó en las pacientes con anomalías citológicas de mayor grado.

Prevalencia de los genotipos de HPV en lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino Uruguay.	Natalia Pérez, Sofía Tedesco, Fernando González, Juan Lopez y Grazzia Rey, 2020.	Estudio transversal, observacional, descriptivo.	Se trabajó con 81 pacientes que consultaron en el Hospital de Clínicas.	Conocer la prevalencia de los diferentes genotipos de HPV en mujeres con lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino del Hospital de Clínicas.	El HPV 16 estaba presente en 60% (45/79) del total de las muestras. El HPV 18, fue encontrado en 4% (3/75). El HPV 31, 33, y 45 ocuparon un 12% (9/75), 10,6% (8/75) y 5,3% (4/75) en el total de las muestras.
Detección serológica del HPV en mujeres mayores de 20 años. Sector “Gary Esparza”, Babahoyo, Ecuador.	Edgar Rodas, Betty Pazmiño y Roberto Coello, 2017.	Estudio descriptivo, prospectivo y transversal.	Se trabajó con 97 pacientes mujeres, mayores de 20 años del sector Gary Esparza.	Determinar el cribado de detección de anticuerpos IgG contra los genotipos 6, 11, 16 y 18 del Virus del Papiloma Humano mediante la técnica serológica de Microelisa.	De las 23 mujeres edades entre 20 a 25 años, 1 caso positivo. De las 24 mujeres edades de 26 a 30 años, 3 casos positivos. De las 18 mujeres edades entre 31 a 40 años, 2 casos positivos. De 13 mujeres edades entre 41 a 50, 1 caso positivo. De 19 mujeres mayores de 50 años, 1 caso positivo.

Análisis y discusión

En la tabla 2 se destaca el método de diagnóstico PCR en tiempo real mediante la recopilación de técnicas para el análisis del Virus del Papiloma. En los artículos revisados el PCR en tiempo real es catalogado como una técnica con una alta especificidad ya que es capaz de detectar el tipo de HPV presente en la muestra como menciona Diego Bonifaz y Omar Rocabado³¹, que actualmente se están desarrollando técnicas más novedosas para determinar genotipos de alto riesgo con el uso de reactivos y equipos más sofisticados que permita una identificación con más exactitud al igual que Crithiam Sánchez, Mónica Guerrero, Jorge Rubio, Edith Müller, Gustavo Rey y Luz Díaz⁴² refieren que las mujeres con displasia cervical confirmada presentaron una prevalencia en PCR en tiempo real un VPH de alto riesgo positiva anal del 32 % siendo más específica que la citología.

Javier Manrique, Núñez María del Carmen, Pretel Lizeth, Sullcahuaman Allende, Roa Ysis, Juárez Patricia et al⁴³, mencionaron en sus resultados que mediante esta técnica se puede identificar en la muestra varios genotipos e incluso más de uno a la vez tanto de los genotipos de HPV de alto riesgo como los genotipos de HPV de bajo riesgo. María Bobadilla⁴⁴ y María Pacheco⁴⁵ recalcan la importancia de la implementación y la utilización apropiada de las pruebas moleculares para la prevención y control del CCU ya que pueden proporcionar información valiosa para la selección de pacientes.

En la tabla 3 se destaca el método de diagnóstico ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas mediante la recopilación de técnicas para el análisis del Virus del Papiloma. Edgar Rodas, Betty Pazmiño Gómez y Roberto Coello Peralta³⁴ mencionaron que este tipo de investigación permitió identificar tempranamente la presencia del virus por lo cual se debería realizar como rutina para detectar de forma precoz el Virus del Papiloma Humano, los autores Jesinda Kerishnan, Subash Gopinath, Sia Bik Kai, Thean Hock Tang, Helen Lee-Ching Ng et al⁴⁶, manifiestan la misma opinión en su investigación de identificación de la infección por VPH mediante los anticuerpos IgG e IgM que podría ayudar a una detección temprana de cánceres derivados del VPH.

En la tabla 4 se destaca el método de diagnóstico citocervico vaginal mediante la recopilación de técnicas para el análisis del Virus del Papiloma Johanna Estrada y Adriana Ulloa¹ mencionan que en otras bibliografías se cataloga con una baja sensibilidad el

papanicolaou siendo una de sus desventajas la especificidad que esta se verá incrementa con la edad generando una necesidad de nuevas técnicas de prevención siendo también un inconveniente como dan a conocer Angélica Melo, Sonia Montenegro, Sandra Liempi, Sergio Moreno, Tiare de La Barra, Pablo Guzmán et al⁴⁷ en la técnica de papanicolau se rechazan frotis sin células endocervicales o metaplásicas, con fijación deficiente o muestra escasa siendo inadecuados para examen citológico.

Guillermo Rodríguez, Laura García, Andrea Beracochea, Rafael Alonso, Benedicta Caserta y Natalia Pérez⁴⁸ indicaron que el papanicolau posee una baja sensibilidad para la detección de lesiones siendo así necesario repetirse con frecuencia para cubrir de cierta manera esa deficiencia al igual que opinan Rodrigues Bianca, Holzmann Ana, Santos Amanda, Lima Cássio, Gonçalves Renata y Santos Silvânia⁴⁹ concuerdan en que el examen es un método accesible y rápido que sin embargo debido a elevados falsos negativos con una variación en los resultados se ve en la necesidad de métodos complementarios para el diagnóstico.

En la tabla 5 se menciona el tipo de muestra a analizar según la técnica PCR en tiempo real, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y papanicolau para el procesamiento oportuno. Entre las muestras obtenidas para PCR en tiempo real según Alveiro Ereira, Leidy Motta, Andrés Chala, Andrey Moreno, Fredy Gamboa, Dabeiba García⁵⁰ fueron tomaron de tejido tumoral en la cavidad bucal mientras que Natalia Pérez Pérez, Sofía Tedesco, Fernando González, Lopez Jordi y Grazzia Rey³³, realizaron la toma cérvico vaginal con citocepillo incluyendo el exocérvix, endocérvix y fondos de saco vaginales que es donde se encuentra el HPV y Pennacchiotti G, Sáez R, Martínez M, Cárcamo M, Montes R tomaron un muestra fresca de lesiones con diagnóstico clínico y anatomopatológico de COCE biopsias⁵¹.

Entre las muestras obtenidas para microelisa Edgar Rodas, Betty Pazmiño Gómez y Roberto Coello Peralta³⁴ obtuvieron suero o plasma ya que no se ha observado influencia en la preparación de la muestra y Kerishnan J, Gopinath S, Kai S, Hock T, Lee H, et al⁴⁷ mencionan en su análisis serológicos el uso de suero como muestra. Entre las muestras obtenidas para citología Johanna Paulina Estrada Cherres y Adriana Ulloa Castro¹ indicaron el uso del citocepillo para la toma de muestras de las paredes del cérvix al igual que Angélica Melo, Sonia Montenegro, Sandra Liempi, Sergio Moreno, Tiare de La Barra, Pablo Guzmán⁴⁸; indicaron en su investigación el uso de citobrush en la zona exo endocervical para el

papanicolau y con un mismo método María Liz Bobadilla, Verónica Villagra, María Elena Zorrilla, Gladys Olmedo, María, Cristina Riveros y Francisco Franco⁴⁵ recolectaron células cérvico vaginales exfoliadas.

En la tabla 6 se menciona los sistemas de reporte para un formato con una terminología uniforme para PCR en tiempo real, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas y papanicolau. En papanicolau Guillermo Rodríguez, Laura García, Andrea Beracochea, Rafael Alonso, Benedicta Caserta y Natalia Pérez ⁴⁸ en su reporte utilizaron la clasificación Bethesda dadas en el formulario programa de prevención de cáncer de cuello uterino al igual que los investigadores Rodrigues Bianca, Holzmann Ana, Santos Amanda, Lima Cássio, Gonçalves Renata y Santos Silvânia ⁴⁹ en su estudio en Brasil utilizaron la nomenclatura de clasificación de las lesiones cervicales según el sistema de Bethesda las cuales son clasificada en (LSIL) y (HSIL).

En PCR en tiempo real María Liz Bobadilla, Verónica Villagra, María Elena Zorrilla, Gladys Olmedo, María Cristina Riveros y Francisco Franco ⁴⁴ sus resultados fueron interpretados por el software del sistema al igual que Natalia Pérez Pérez, Sofía Tedesco, Fernando González, Juan M Lopez Jordi y Grazzia Rey ³³ ya que sus resultados fueron analizados con el software Rotor-Gene Q Series Software siendo sus resultados positivos o negativos para la presencia de cualquier genotipo del Virus del Papiloma encontrados en la muestra. Para microelisa Kerishnan J, Gopinath S, Kai S, Hock T, Lee H, et al ⁴⁷ y Edgar Rodas, Betty Pazmiño Gómez y Roberto Coello Peralta ³⁴ observaron cambio de color los cuales se midieron espectrofotométricamente a 450 nm utilizando un lector de microplacas en base a la densidad óptica se interpreta como positivo o negativo.

CONCLUSIONES

La técnica de análisis PCR en tiempo real tiene la facilidad de detectar varios genotipos del Virus del Papiloma Humano tanto de alto riesgo como de bajo riesgo en una misma muestra y de forma rápida ya que está basada en la replicación celular para obtener varias copias de un fragmento del ADN dado por la amplificación mediante la emisión de fluorescencia pudiendo aplicar esta técnica como prevención y control ya que puede identificar de forma exacta los genotipos del virus. La técnica de análisis de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas provoca una señal que es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-VPH presentes en la muestra, permite identificar de forma temprana la presencia del Virus del Papiloma Humano de forma precoz siendo esencial que sea aplicada como rutina. La técnica de análisis citocervico vaginal está basada en la recolección de células del exocérvix, endocérvix y la zona de transformación para ser teñidas y observadas microscópicamente las alteraciones morfológicas celulares, brinda una sensibilidad baja para detectar lesiones siendo necesario repetir este tipo de examen con frecuencia para cubrir esta deficiencia.

El tipo de muestra utilizada para PCR en tiempo real fueron variadas de acuerdo a la localización de virus como tejido tumoral en la cavidad bucal, toma cérico vaginal del exocérvix, endocérvix, fondos de saco y biopsias, mientras que para ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas fue utilizado suero y plasma como muestra ya que no mostraba ninguna interferencia en el procesamiento y para citocervico vaginal se tomó muestra del exo y endocérvix para la observación en los cambios morfológicos de las células.

En cuanto al reporte utilizado para PCR en tiempo real fue dado por la interpretación de las amplificaciones dadas en un software para ser reportados como positivos o negativos, en el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas mostró un valor de corte basado en la densidad óptica dando los resultados como positivos o negativos y en citocervico vaginal utilizaron la clasificación Bethesda, estos reportes permiten un formato con una terminología uniforme.

Como recomendación se propondría implementar en los establecimientos de salud las técnicas PCR en tiempo real, análisis citocervico vaginal y la técnica de análisis de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas como complementariedad para los exámenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estrada P, Ulloa A. Diagnóstico del virus del papiloma humano en mujeres en edad fértil del área de salud No. 1 de Azogues, Ecuador. Rev Inf Cient. [Internet]. 2018 Feb [citado 2021 Ene 14]; 97(1): 19-28. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102899332018000100019&lng=es
2. Meléndez I, Camero Y, Sánchez E, Álvarez D. Conocimiento sobre el Virus de Papiloma Humano en mujeres sexualmente activas. Rev Cuatri Con Libe. [Internet]. 2019 Jun [citado 2021 Ene 14];3(1):25. Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:dtfMRFhjk0J:https://revistaitsl.it.slibertad.edu.ec/index.php/ITSL/article/download/69/189/+&cd=8&hl=es419&ct=clnk&gl=ec>
3. Trujillo Tania, Domínguez Susana, Ríos María, Hernández M. Prevalencia del virus del papiloma humano en mujeres con citología negativa. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2017 Mar [citado 2021 Ene 14]; 43(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138600X2017000100017&lng=es
4. Bravo E, Águila N, Guerra N, Blanco Y, Rodríguez O, Santana M. Cáncer cérvico uterino: prevención y tratamiento. Rev MediSur [Internet]. 2020 Jul [citado 2021 Ene 14]; 8 (4). Obtenido de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/1800/180064571018/html/index.html>
5. Zapata S, Mosquera J, Mejía L, Cruz L, Sánchez S, García M. et al. Estudios sobre el virus del papiloma humano y cáncer cervical en el Ecuador. Rev Cie Digit INSPILIP [Internet]. 2019 Mar [citado 2021 Ene 14];3(1):13. Disponible en: <https://www.inspilip.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/A.-ESTUDIOS-SOBRE-EL-VIRUS-DEL-PAPILOMA-HUMANO-Y-CANCER-CERVICAL-EN-EL-ECUADOR111.pdf>
6. Capa p, Betancourt F, Orellana C, Cedeño M. El virus del papiloma humano de alto riesgo y su prevención. Rev Cient Mun Inves Cono [Internet]. 2019 Sep [citado 2021 Ene 14];3(3): 1104. Disponible en: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/561>
7. McKinney S, Gálvez C, Gracia R. virus del papiloma humano. Rev Electr Port Med [Internet]. 2020 May [citado 2021 Ene 17];15 (11):522. Obtenido de: <https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/revision-bibliografica-virus-del-papiloma-humano/>
8. Herrera D, Tamayo A, Valencia M, Sánchez G. Infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo y factores asociados en canal anal de pacientes con VIH en Medellín, 2017–2018. Rev. Saúde Pública [Internet]. 2020 [citado 2021 Ene 17]; 54: 93. Disponible en:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003489102020000100271&lng=en.

9. Jordá B, Ramos J, Mosmann J, Lopez M, Wegert A, Cuffini C. Prevalencia del virus papiloma humano y factores de riesgo asociados en mujeres afiliadas al seguro de salud estatal en Posadas, Misiones (Argentina). *Rev Chil Infectol* [Internet]. 2020 Abr [citado 2021 Ene 17]; 37(2): 111-116. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182020000200111&lng=es.

10. Bravo E, Águila N, Guerra N, Blanco Y, Rodríguez O, Santana M. Cáncer cérvico uterino: prevención y tratamiento. *Rev MediSur* [Internet]. 2020 Jul [citado 2021 Ene 17]; 8 (4). Obtenido de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/1800/180064571018/html/index.html>

11. Viñas L, Chávez M, Calderón M. Papiloma virus humano en adolescentes y jóvenes menores de 25 años. *Arch Méd Camagüey* [Internet]. 2020 [citado 17 Ene 2021]; 24(3). Disponible en: <http://revistaamc.sld.cu/index.php/amc/article/view/6823>

12. Palacios O, Méndez S, Galarza D, Torres T. Dominios culturales de Salud Sexual y Virus del Papiloma Humano en adolescentes mexicanos. *Rev Ces Psic* [Internet]. 2016 jul [citado 2021 Ene 17]; 9 (2):152-153. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/4235/423548400010.pdf>

13. Bohorquez R, Rincón B, Martínez R. Sedentarismo y Sobrepeso/Obesidad asociados a la prevalencia de infección por Virus de Papiloma Humano de alto riesgo en mujeres de la zona norte de Bucaramanga. *Rev Uni Indu Sant* [Internet]. 2019 [citado 2021 Ene 17]; 51(1). Obtenido de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/3438/343860354007/html/index.html>

14. Bendezu G, Soriano A., Urrunaga D, Venegas G, Benites V. Asociación entre conocimientos acerca del cáncer de cuello uterino y realizarse una prueba de Papanicolaou en mujeres peruanas. *Rev Perú Med Exp Salud publica* [Internet]. 2020 Ene [citado 2021 Ene 17]; 37(1): 17-24. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342020000100017&lng=es. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4730>.

15. Brito T, Romo M, Sánchez M, Araiza M. Intervención educativa de enfermería en el nivel de conocimiento sobre VPH en estudiantes de una secundaria pública de Aguascalientes. *Lux Med* [Internet]. 2019 Nov [citado 2021 Ene 17]; 15(43):72. Obtenido de: <https://revistas.uaa.mx/index.php/luxmedica/article/view/2501>

16. Mayer C, Budh D. Frotis de Papanicolaou anormal. *StatPearls* [Internet]. 2020 Oct [citado 2021 Ene 17]. Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560850/>

17. Sierra L, Zapata J, Rangel D. Progresión maligna de condilomas acuminados anogenitales asociados a Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo en mujeres. *Medicas UIS* [Internet]. 2020 Abr [citado el 17 de enero del 2021];33 (1): 9-11. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192020000100009.
18. García C, Salas M, Gil M. Algunas consideraciones sobre etiología y fisiopatogenia del carcinoma epidermoide bucal. *Medisur* [Internet]. 2018 Feb [citado 2021 Ene 17];16(1): 63-75. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2018000100010&lng=es.
19. Leyva J. Mujeres con VIH con más riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino. *El Debate* [Internet]. [citado el 17 de enero del 2021]. Disponible en: <https://search.proquest.com/newspapers/mujeres-con-vih-más-riesgo-de-desarrollar-cáncer/docview/2475287874/se-2?accountid=36757>.
20. Leyva J. 8 signos del cáncer de cuello uterino que nunca debe ignorar. *El Debate* [Internet]. [citado el 17 de enero del 2021]. Disponible en: <https://search.proquest.com/newspapers/8-signos-del-cáncer-de-cuello-uterino-que-nunca/docview/2479407276/se-2?accountid=36757>.
21. Yelina Pérez Sánchez. Balanitis, una afección con graves consecuencias. *La Estrella de Panamá* [Internet]. 2020 Octub [citado el 17 de enero del 2021]. Disponible en: <https://search.proquest.com/newspapers/balanitis-una-afección-con-graves-consecuencias/docview/2469409808/se-2?accountid=36757>.
22. Las personas con múltiples parejas sexuales tienen cuatro veces más riesgo de contraer cáncer de boca y garganta por el HPV. *Infobae* [Internet]. [citado el 17 de enero del 2021]. Disponible en: <https://search.proquest.com/newspapers/las-personas-con-múltiples-parejas-sexuales/docview/2477577584/se-2?accountid=36757>.
23. Ocaña C, González A, Pedraza R. Prevención del cáncer de cérvix desde la perspectiva enfermera. *Sanum* [Internet]. 2020 [citado el 18 de enero del 2021];4(3):31. Disponible en: https://www.revistacientificasanum.com/pdf/sanum_v4_n3_a4.pdf
24. Translated by ContentEngine LLC. Diagnóstico rápido previene males de transmisión sexual. *CE Noticias Financieras* [Internet]. 2019 Jul [citado el 18 de enero del 2021]. Disponible en: <https://search.proquest.com/wire-feeds/diagnóstico-rápido-previene-males-de-transmisión/docview/2443411592/se-2?accountid=36757>.
25. Merchán M, Torres M, Díaz A. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2017 Oct [citado

- 2021 Mar 16]; 16(5): 796-807. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X2017000500012&lng=es
26. Gomez J, Roe C, Roe E. Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas. [Internet]. 1^a ed. Perú. 2016 [citado 2021 Mar 16]. Disponible en: <https://www.apiinfectologia.org/diagnostico-molecular-de-enfermedades-infecciosas/>
27. Cuevas E, Carrillo M, Treviño L, Aparicio R, Hernández J. Evaluación de oligonucleótidos para medir expresión genética durante la marchitez bacteriana del tomate. *Rev Fitotec Mex* [Internet]. 2016 Jun [citado 2021 Mar 16];39 (2): 141-150. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000200141&lng=es.
28. Mateos M, Pérez S, Pérez M, Rodríguez M. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. *Seimc* [Internet]. 2016 [citado 2021 Mar 16]: 14. Obtenido de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia57.pdf>
29. Iglesias S, Serquén L. Virus papiloma humano y factores asociados en pacientes con citología desconocida atendidas en el norte de Perú. *Rev Peru Ginecol Obstet.* [Internet]. 2020 [citado 2021 Mar 16]; 66 (1); 2. Obtenido de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgo/v66n3/2304-5132-rgo-66-03-00009.pdf>
30. Pérez Prada A, Castillo E, Castellanos W. Detección del gen fusión PML-RAR α en pacientes colombianos con leucemia mieloide aguda. *Rev CES Medicina mex* [Internet]. 2019 Jun [citado 2021 Mar 16];33 (2): 90. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/2611/261162058003/261162058003.pdf>
31. Bonifaz D, Rocabado O. Identificación Molecular de los VPH Oncogénicos mediante PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan. *Rev Cient Cienc Med* [Internet]. 2020 [citado 2021 Mar 16];23(2): 122 – 128. Obtenido de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S181774332020000200002&script=sci_arttext
32. Armand B. Polymerase Chain Reaction, una revolución en el diagnóstico molecular. *Tecnifood* [Internet]. 2016 [citado 2021 Ene 18]:67. Obtenido de: https://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Monografico_XIV_workshop_MRAMA.pdf
33. Pérez N, Tedesco S, González F, Lopez J, Rey G. Prevalence of HPV genotypes in cervical high risk Perú epithelial lesions and cervical cancer in the population of Hospital de Clínicas. Montevideo-Uruguay. *Anfamed* [Internet]. 2020.[citado 2021 Ene 18]; 7 (2): e202.

Disponible en:
http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S230112542020000201202&script=sci_arttext&lng=en

34. Rodas E, Pazmiño B, Coello R, Bermudez J, Rodas K, Cagua L, et al. Detección serológica del Virus Papiloma Humano en mujeres mayores de 20 años. Caso sector “Gary Esparza”, Babahoyo, Ecuador. *Revi Cie UNEMI* [Internet]. 2017 [citado 2021 Ene 18]; 10(23):113-114. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/jatsRepo/5826/582661260011/index.html>

35. Miranda A, Magaña L, García J, Contrera J. Factores Socioculturales Que Interfieren En La Realización Del Papanicolaou En Mujeres Indígenas Mexicanas. *European Scientific* [Internet]. 2018 Feb [citado 2021 Ene 18]; 14:75. Obtenido de: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:gfW_WCFjTbgJ:eujournal.org/index.php/esj/article/view/10517/10050+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec

36. Naranjo I, Naranjo A, Cuzco L, Quinteros A, Romero E. citología cervical: condiciones técnicas de una toma correcta e interpretación. *Rev Cienc Serv Salud Nutri* [Internet] 2019 [citado 21 marzo 2021]; 10 (especial):91,92. Obtenido de: <http://revistas.esPOCH.edu.ec/index.php/cssn/article/view/290/255>

37. Zumaran V, Moya J. La ecologización de la coloración del Papanicolaou en el diagnóstico del cáncer de cuello uterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* [Internet] 2018 [citado 22 marzo 2021]; 56 (3):218,219. Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=84063>

38. Cocina F, Cox C. Frotis de Papanicolaou. *StatPearls* [Internet]. 2020 Oct [citado 2021 Ene 18]. Obtenido en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470165/>

39. Rincón D, Morales L, Rincón B. Modernas metodologías diagnosticas para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino. *Rev Univ Ind Santander Salud*. [Internet]. 2017 Sept [citado 2021 Ene 18]. 49(3): 479. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/3438/343855203008/343855203008.pdf>

40. Citorushtc. Vph- parte 4 métodos diagnósticos i [Internet] 2019 Dici [citado 28 marzo 2021] Obtenido de: <https://www.youtube.com/watch?v=9s32xN0Ka40>

41. Citorushtc. Vph- parte 4 métodos diagnósticos vili iv [Internet] 2019 Dici [citado 28 marzo 2021] Obtenido de: https://www.youtube.com/watch?v=_VG4w25ti6o

42. Corredor S, Guerrero C, Rubio M, Ángel J, Rey E, Díaz G, et al. Prevalencia de infección por virus del papiloma humano de alto riesgo y citología anormal en la zona de transformación anal en mujeres con displasia cervical. Bogotá, Colombia, 2017-2019. *Rev*

Colomb Obstet Ginecol [Internet]. 2020 Diciemb [citado 2021 Mar 24]; 71(4): 345-355.Obtenido de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342020000400003

43. Manrique J, Núñez M, Pretel L, Sullcahuaman A, Roa Y, Juárez P et al. Detección del virus del papiloma humano en muestras obtenidas mediante técnica de autotoma en un grupo de universitarias peruanas. Rev Perú Med Exp Salud publica [Internet]. 2018 Oct [citado 2021 Mar 27]; 35(4): 642-646. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342018000400012&lng=es.

44. Bobadilla M, Villagra V, Zorrilla M, Olmedo G, Riveros M, Franco Francisco et al. Detección y tipificación del Virus Papiloma Humano en el marco del tamizaje virológico para la detección de lesiones del cuello uterino en Asunción, Paraguay. Mem Inst Investig Cienc Salud [Internet]. 2019 Apr [cited 2021 Mar 26]; 17 (1): 6-15. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S181295282019000100006&lng=en.

45. Pacheco M, Calderas H, Rivero I, Briceño A, Tineo N. Tipificación de virus de papiloma humano en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cérvix. Rev Obstet Ginecol Venez [Internet]. 2016 Mar [citado 2021 Mar 27]; 76 (1): 23-33. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S004877322016000100004&lng=es

46. Kerishnan J, Gopinath S, Kai S, Hock T, Lee H, et al. Detección de anticuerpos IgG e IgM específicos del virus del papiloma humano 16 en el suero del paciente: un indicador potencial del factor de riesgo del carcinoma oral de células escamosas. Rev Int J Med Sci [Internet].2016 [citado 24 Marz 2021];13 (6): 424–431. Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4893556/>

47. Montenegro A, Moreno L, Pablo G, Barra T, Moreno S, Liempi S, et al. Frecuencia de alteraciones citológicas cervicales y virus papiloma humano en una muestra de estudiantes universitarias en Temuco, Chile. Rev chil infectol [Internet]. 2019 Ago [citado 2021 Mar 24]; 36 (4): 421-427. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182019000400421&lng=es.

48. Guillermo R, García L, Beracochea A, Caserta A, Pérez N et al. Tamizaje del cáncer de cuello uterino con test de HVP. Primeros resultados en el sistema público de Uruguay. Rev Méd Urug [Internet]. 2019 Dic [citado 2021 Mar 24]; 35(4): 52-90. Disponible en:

http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S168803902019000400052&lng=es

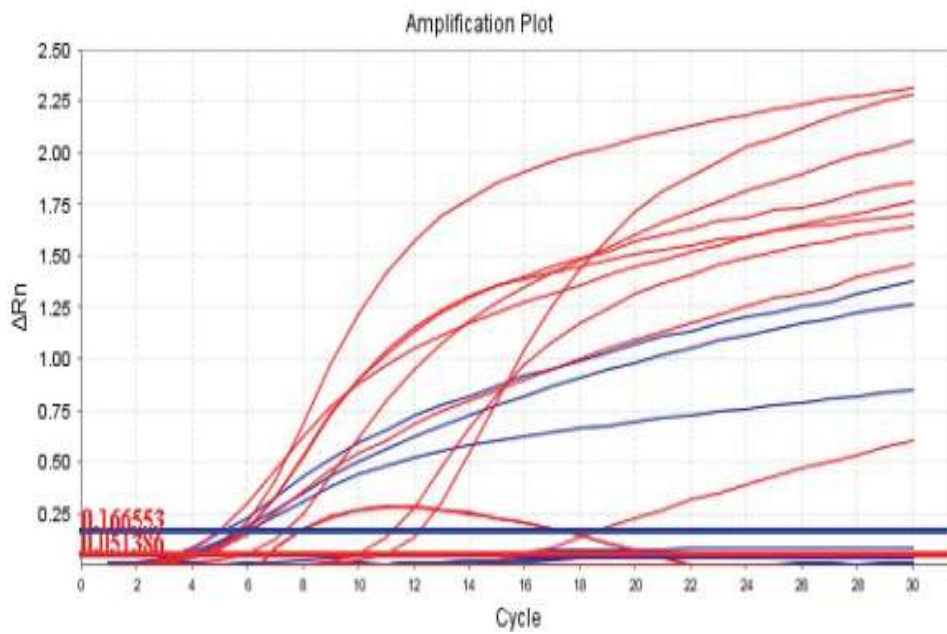
49. Rodrigues B, Holzmann A, Santos A, Lima C, Gonçalves R, Santos S. Infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres con VIH/SIDA. *Enferm glob* [Internet]. 2016 Oct [citado 2021 Mar 25]; 15(44): 1-12. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169561412016000400001&lng=es.

50. Alveiro E, Motta L, Chala A, Moreno A, Gamboa F, García D. Genotipificación, niveles de expresión y estado físico del virus del papiloma humano en pacientes colombianos con cáncer de células escamosas en la cavidad oral. *Biomédica* [Internet]. 2016 Ago [citado 2021 Mar 25]; 36(2): 14-24. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012041572016000600003&lng=en.

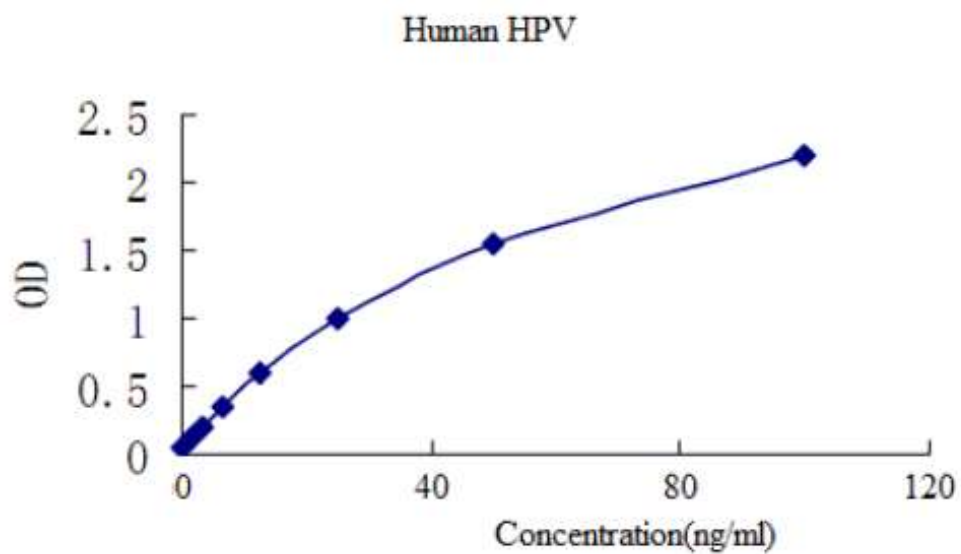
51. Pennacchiotti G, Sáez R, Martínez M, Cárcamo M, Montes R. Prevalencia del virus papiloma humano en pacientes con diagnóstico de carcinoma escamoso de la cavidad oral. *Rev Chil Cir* [Internet]. 2016 Abr [citado 2021 Mar 26]; 68 (2): 137-142. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071840262016000200005&lng=es.

ANEXOS

ANEXO 1: Curvas de Amplificación para VPH16 (rojo 10 casos) y VPH18 (azul ocho casos). Estudio realizado mediante la técnica de genotipificación por PCR en tiempo real.



ANEXO 2: La técnica ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas provoca la formación de inmunocomplejos específicos que se miden fácilmente con los lectores de microplacas, en la curva se muestra la densidad óptica y la concentración en ng/ml.



ANEXO 3: Frotis citológico citocervico vaginal. Célula escamosa con amplio halo perinuclear, la binucleación y núcleos agrandados.

