



MECANISMO DE INFECCIÓN DEL VPH Y MÉTODOS MOLECULARES PARA SU IDENTIFICACIÓN. REVISIÓN DOCUMENTAL

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ DC
2020**



MECANISMO DE INFECCIÓN DEL VPH Y MÉTODOS MOLECULARES PARA SU IDENTIFICACIÓN. REVISIÓN DOCUMENTAL

Monografía requisito para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

ANDREA CATALINA ROCHA CHAMORRO

**ASESORA:
EDITH HERNANDEZ ROJAS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ DC
2020**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y la sabiduría para cumplir este sueño.

A mi familia, por soñar conmigo, estar presente en los buenos y malos momentos, por ser el mejor ejemplo.

A mi asesora Edith Hernández, por compartir sus conocimientos conmigo, ser inspiración y haber estado presente en muchas etapas de este proceso.

Al grupo de investigación ECZA, por abrirme las puertas y brindarme herramientas que marcaron positivamente mi carrera.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por permitirme desarrollar mi carrera profesional, darme excelentes docentes, compañeros y muy buenas experiencias.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	10
3. ANTECEDENTES	11
4. MARCO TEÓRICO.....	15
4.1 Virus del Papiloma Humano	15
4.1.1 Clasificación del VPH	15
4.1.2 Aspectos del genoma de VPH	16
4.1.3 Epidemiología.....	19
4.1.4 Mecanismo de infección de VPH	20
4.1.5 Respuesta inmune frente al VPH.....	23
4.1.6 Patologías causadas por VPH	24
4.1.7 Factores de riesgo y prevención	27
4.1.8 Vacunas	28
4.2 Métodos moleculares para la identificación de VPH.....	29
4.2.1 Hibridación de ácidos nucleicos	31
4.2.2 Métodos de amplificación de señal	32
4.2.3 Amplificación de ácidos nucleicos	32
4.2.4 Análisis de microarrays	34
4.2.5 Detección de la expresión de los genes E6/E7	35
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	38
5.1 Tipo de investigación	38
5.1.1 Universo.....	38
5.1.2 Población	38
5.1.3 Muestra	38
5.2 Criterios de selección de la bibliografía revisada.....	38
5.2.1 Criterios de inclusión.....	38
5.2.2 Criterios de exclusión	38
5.3 Procedimientos	39
5.3.1 Búsqueda de la información	39
5.3.2 Selección de documentos.....	39
5.3.3 Revisión bibliográfica.....	39
5.3.4 Análisis de la información	39

6. RESULTADOS.....	40
6.1 Tipo de información.....	40
6.2 Año de publicación.....	41
6.3 Lugar de publicación.....	41
6.4 Técnicas moleculares para identificación de VPH.....	42
6.5 Características de los ensayos comerciales para detección de VPH.....	44
6.6 Principales cebadores para la detección de VPH.....	45
6.7 Ventajas y desventajas de los métodos moleculares para la detección de VPH.....	45
7. DISCUSIÓN.....	47
8. CONCLUSIONES.....	51
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma del VPH	17
Figura 2. Ciclo viral del VPH	20
Figura 3. Representación de un epitelio normal y uno infectado por VPH	21
Figura 4. Inhibición de la función de P53 por acción de la oncoproteína viral E6.....	22
Figura 5. Unión de E7 con pRB.....	23
Figura 6. Patogenia del cáncer de cuello uterino	25
Figura 7. Tipo de información	40
Figura 8. Año de publicación.....	41
Figura 9. Lugar de publicación	41
Figura 10. Países de mayor publicación	42
Figura 11. Técnicas moleculares (2006 - 2019)	42
Figura 12. Técnicas de amplificación de ácido nucleico	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de serotipos de VPH según su tropismo y capacidad de infección.....	16
Tabla 2. Características y funciones de las proteínas del VPH	19
Tabla 3. Proporción del papel de VPH en los cánceres más comunes.....	27
Tabla 4. Línea del tiempo, principales sucesos sobre el VPH.	31
Tabla 5. Variantes de PCR empleadas para la identificación VPH	33
Tabla 6. Métodos aprobados y empleados para el diagnóstico de VPH basados en PCR.	34
Tabla 7. Principales características de los métodos para detección de VPH	45
Tabla 8. Principales cebadores empleados para la identificación de VPH.....	45
Tabla 9. Ventajas y desventajas de las técnicas molecular	47



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

***MECANISMO DE INFECCIÓN DEL VPH Y MÉTODOS MOLECULARES PARA SU
IDENTIFICACIÓN. REVISIÓN DOCUMENTAL***

RESUMEN

El VPH representa una gran amenaza para el desarrollo de diferentes enfermedades como el Cáncer de cuello uterino, el cual presenta una gran prevalencia en mujeres jóvenes en Colombia y a nivel mundial, también se ha encontrado relacionado con otros cánceres como los son el de vulva, vagina, ano, pene y algunos tumores orofaríngeos, representando no solo una amenaza para las mujeres sino también para los hombres, debido a su tropismo por diferentes epitelios, se clasifica según su capacidad oncogénica, en VPH de alto y bajo riesgo; el diagnóstico temprano de esta infección reduce notablemente la posibilidad de desarrollar cáncer, por lo que es muy importante conocer sus características genéticas y sus mecanismos de infección; la biología molecular, es una herramienta muy útil que ha permitido desarrollar técnicas que determinen la presencia o ausencia de estos virus en las células, adicionalmente al pasar de los años, se han desarrollado técnicas que permiten identificar de manera rápida y confiable el tipo específico del virus que genera la infección, siendo de gran importancia, para el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. En la siguiente revisión se explican las generalidades del VPH, sus mecanismos de infección y otras características relacionadas con el curso de la enfermedad, adicionalmente se encuentran las características de las principales técnicas moleculares para su detección, con sus ventajas y desventajas y una recopilación de los principales cebadores empleados para su diagnóstico.

Palabras clave: Virus del papiloma humano (VPH), Infección, Técnicas de biología molecular, Detección, Identificación.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano se ha identificado como el agente causal del cáncer de cuello uterino, siendo este un importante problema de salud pública ya que constituye una de las principales causas de muerte en mujeres jóvenes alrededor del mundo, adicionalmente se encuentra implicado en el desarrollo de diversos cánceres debido a su capacidad para infectar células epiteliales de diferentes ubicaciones anatómicas, se clasifica de acuerdo a su capacidad oncogénica en VPH de alto y bajo riesgo, de igual manera representa una amenaza para los hombres, se estima que dos tercios de las personas sexualmente activas tendrán contacto con el virus, la mayoría de ellos asintomáticos y con pronta resolución, ya que adicionalmente a la presencia del virus, el desarrollo de cáncer depende de ciertas condiciones ambientales como la mal nutrición, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, la multiparidad y la capacidad del sistema inmune, entre otras; por lo que es importante conocer sus mecanismos de acción y realizar una detección temprana que permita tomar medidas que eviten un desarrollo agresivo de la infección.

El diagnóstico del VPH es un tema muy importante en todo el mundo ya que permite tener un control sobre el virus y disminuir la mortalidad de la población, razón por la cual en esta revisión se da a conocer paso a paso el proceso infectivo del virus, sus características genéticas, la respuesta inmune del paciente, los factores de riesgo, prevención y las vacunas disponibles para evitar la infección, lo que nos permite conocer las características fundamentales del virus.

Con los avances de la ciencia, la biología molecular y la secuenciación de una gran diversidad de tipos del virus, se han desarrollado métodos que permiten una detección confiable y una identificación específica sobre el serotipo responsable de la infección, lo que permite conocer la capacidad infectiva de cada uno, el posible tratamiento y pronóstico de la enfermedad; debido a las características del VPH es necesario realizar estudios moleculares ya que este no es cultivable in vitro, los diferentes métodos usados para el diagnóstico e identificación del VPH utilizan diversos fundamentos basados en la detección de diferentes partes de su genoma, mediante técnicas de amplificación de señal, amplificación de ácidos nucleicos, utilización de microarrays, que cuentan con una alta sensibilidad y especificidad, reduciendo la posibilidad de falsos negativos y contando con controles para evaluar la integridad del material genético y el desarrollo de la prueba, difiriendo en los fundamentos,

genes diana, cebadores, tipos identificados, entre otros, la mayoría determinando únicamente la presencia del virus.

Una vez el virus ha infectado la célula este puede ser eliminado por el sistema inmune del paciente o puede progresar generando lesiones en el cuello uterino y en el caso más agresivo generar oncogénesis en las células, durante este proceso sus proteínas van cambiando sus proporciones y en algunas ocasiones cambia el estado de su ADN de episomal a integrado, identificar la condición en la que se encuentra el virus se convierte en un importante biomarcador de progresión de la infección, mediante la cuantificación de ARNm de las proteínas E2 y E6, encargadas principal mente de la regulación del virus y la supresión de los controles naturales de la célula respectivamente, mostrando un resultado cuantitativo que permite realizar seguimiento de la enfermedad

En la presente revisión se realizó una recopilación detallada de las principales características del VPH y de las diferentes técnicas moleculares empleadas para su identificación, diferenciando sus principales características, ventajas y desventajas y adicionalmente publicando los cebadores mayormente reportados en la literatura para la amplificación de ácidos nucleicos.

2. OBJETIVOS

- **GENERAL**

Realizar revisión documental sobre los mecanismos por los cuales el VPH infecta las células diana y los métodos moleculares empleados para su identificación.

- **ESPECÍFICOS**

Describir el proceso y los mecanismos moleculares por los cuales el VPH logra infectar las células diana.

Recopilar información sobre las técnicas moleculares empleados para la identificación de VPH en la actualidad.

Determinar el impacto, las ventajas y desventajas de las técnicas moleculares empleados para la identificación de VPH.

3. ANTECEDENTES

El virus del papiloma humano (VPH) fue observado por primera vez en 1949, en imágenes obtenidas con microscopio electrónico en muestras de papilomas de piel, fue hasta en 1983 luego de muchas investigaciones en modelos celulares animales y algunas controversias en el campo de la medicina que el médico virólogo alemán Zur Hausen, logró descubrir que el virus era el agente causal del cáncer de cérvix uterino, es decir que este tipo de cáncer era producido a partir de infección¹. Estableciendo el papel del hombre como principal transmisor²; dentro de las infecciones que están involucradas en la cancerogénesis humana encontramos las producidas a partir del contagio con virus como; el virus de Epstein-Barr, papilomavirus, virus de la hepatitis; de los individuos contagiados con estos, sólo un pequeño porcentaje desarrolla la respectiva forma de cáncer, generalmente después de transcurridas varias décadas entre la infección primaria y el desarrollo del cáncer³.

Alani et al³, establecen en su artículo denominado “*Human papillomaviruses and associated malignancies*” publicado en 1998 y realizado a partir de un análisis detallado de datos epidemiológicos representativos y estudios in vivo e in vitro que el VPH infecta células epiteliales e induce lesiones proliferativas, como en el cáncer de cuello uterino, en la cual está presente en todos los casos⁴.

Zur Hausen, publico en el año 2000 un artículo donde muestra la notable pluralidad de genotipos diferentes existentes de VPH. Hasta ese momento se habían identificado y secuenciado completamente 85 tipos de VPH, todos epiteliotrópicos es decir que infectan las células epiteliales de la piel o de la mucosa anogenital y orofaríngea⁵. Dos años más tarde 2002 Zur Hausen, realizó otra publicación, donde se centraba en la diferencia de serotipos de VPH, pues estos según su asociación y consecuencias en las células huésped, se puede clasificar en serotipos de alto riesgo altamente aislados de muestras diagnosticadas con cáncer de cérvix⁶, carcinomas anogenitales y tumores de cabeza y cuello y de bajo riesgo asociados con la aparición de verrugas; también mostró la influencia de la expresión de oncoproteínas virales específicas, E6 y E7, como mecanismo necesario para mantener el crecimiento maligno de las células cancerosas del cuello uterino, específicamente mediante la inhibición de los supresores de tumores p53 y RB^{7,8}.

En este mismo año, en el artículo denominado *“Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors.”* se determinó la capacidad de las oncoproteínas virales para subvertir los puntos de control del ciclo celular como un posible mecanismo por el cual las oncoproteínas virales inducen inestabilidad genética⁹. Poco tiempo después se realizó un modelo anatómico de la cápside del papilomavirus, en el cual se determinó que el virus tiene una estructura de cápside conservada, debido a la presencia de puentes disulfuro, esta es prácticamente idéntica entre los tipos de VPH que infectan a diferentes especies, teniendo hasta un 50% de identidad de secuencias en la proteína L1, la más abundante de la cual gran parte del extremo C terminal está expuesta en la superficie viral en este modelo, lo que sugirió su papel inmunogénico o su participación en epítomos inmunogénicos¹⁰.

En el 2003 se publicó un artículo que busca determinar las vías de endocitosis para ingresar a la célula que implementa el VPH, debido a que este es un virus no envuelto que contiene dos proteínas, L1 y L2, que encapsulan un ADN, la expresión de L1 da como resultado el autoensamblaje de partículas similares a virus (VLP) que tienen características similares a los viriones. Empleadas como sistemas sustitutos que utilizan pseudoviriones del VPH para probar la infectividad viral, permitiendo determinar específicamente en este estudio que los HPV-16 y HPV-58 ingresan a la célula mediados por clatrina, como normalmente lo hacen este tipo de virus, pero para el caso de VPH-31 parece involucrar a caveolas, planteando la hipótesis que entre virus muy similares hay diferentes vías de ingreso a la célula^{11,12}.

Para el año 2004 las cifras de muertes a causa de cáncer de cuello uterino se encontraban muy altas, siendo el segundo cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por cáncer entre las mujeres en el mundo, estimándose una mayor incidencia y prevalencia en los países en vía de desarrollo, magnitudes preocupantes debido a la posibilidad de prevención, tal como el caso de las regiones de Europa y Norteamérica¹³, donde los casos igualmente elevados, pero tras la implementación de exámenes organizados con citología cervical (la prueba de Papanicolaou), se obtuvieron mejoras, que permiten controlar la enfermedad¹⁴.

En 2004, los artículos titulados *“Physical state and expression of VPH DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade.”* y *“Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia”*

muestran que tras la infección, el ciclo de vida productivo de los VPH está vinculado a la diferenciación epitelial, Algunos autores sugerían que la progresión a cáncer estaba ligada a la integración del genoma viral que se encuentra en forma episomal, en el material genético de la célula epitelial, sin embargo en los resultados de estas investigaciones, realizadas mediante la detección de la integración en pacientes con lesiones intraepiteliales altamente desarrolladas, se sugirió que debido a la ausencia de integración del ADN del VPH 16 en algunos casos, la integración no siempre es necesaria para la progresión de las lesiones displásicas tempranas. Aunque, la integración de VPH tipo 18 y otros parece ser de gran importancia para la eficacia transformadora de la displasia cervical^{15,16}. En varias investigaciones publicadas en el 2006, se muestra el mecanismo de infección y transformación neoplásica producida por el VPH en las células cervicales, donde se describen las funciones de las proteínas tempranas y tardías en el proceso de reproducción de las células huésped y en la evasión de los mecanismos de control producidos por estas, que les facilitan la progresión de su ciclo infeccioso^{17,18,19}.

Debido a la importancia del diagnóstico temprano y aunque el examen de citología cervical ha disminuido la incidencia de cáncer de cuello uterino, se continúa evidenciando una baja especificidad de las pruebas de detección, por lo cual, los mecanismos moleculares que permiten la detección de VPH y por ende el desarrollo de las lesiones cervicales han proporcionado una serie de biomarcadores potenciales para el uso diagnósticos^{20,21}. Según una publicación del 2006 se muestra como los métodos diagnósticos moleculares van tomando cada vez mayor relevancia; a partir de la descripción de la molécula de ADN por Watson y Crick en 1953 y la posterior elucidación de como los ácidos nucleicos cómo se transcriben y traducen en proteína, la revolución de ADN recombinante seguida en la década de 1970 y las químicas para ADN de clonación, la secuenciación y la hibridación, permitieron la secuenciación automática de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)²⁰.

Abreu A y colaboradores en el 2012 mostraron el papel de los diagnósticos moleculares para la detección de VPH, resaltando la importancia esencial con este virus debido a que no se puede propagar en el cultivo de tejidos y, por lo tanto, en la mayoría de los casos, su identificación precisa se basa en la implementación de estas técnicas²¹. Las cuales han permitido avances importantes en la optimización de la especificidad, sensibilidad y rapidez

de técnicas de diagnóstico tradicional, que favorecen su prevención, control y tratamiento²²,
23 .

En los últimos años se han realizado modificaciones a los métodos moleculares actuales, que han optimizado el diagnóstico no solo de la presencia del material genético del virus, sino su tipificación, expresión de determinadas proteínas que permiten conocer la progresión del cáncer y la cuantificación de la integración viral²⁴, como lo sistemas de cebadores basado en PCR multiplex e hibridación²⁵, mediante PCR-RFLP, kits comerciales, entre otros²⁶.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Virus del Papiloma Humano

El virus papiloma humano (VPH) es un virus de tamaño pequeño, no encapsulado, con una estructura icosaédrica y una doble cadena de ADN circular de 7.500 a 8.000 pb. Este virus pertenece a la familia *Papillomaviridae*, incluida en el género Papilomavirus. Son virus especie específicos, ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan tanto a aves como mamíferos²⁷; infectan los tejidos epiteliales cutáneos y mucosos del tracto anogenital, las manos o los pies. Un subconjunto de los tipos de VPH son los agentes causantes del cáncer cervical, ya que el 99% de los tumores son positivos para el ADN del VPH. Hasta la fecha, se han identificado más de 200 tipos virales diferentes, y aproximadamente un tercio de estos infectan células epiteliales en el tracto genital¹⁶.

4.1.1 Clasificación del VPH

Los virus de VPH, en función de su oncogenicidad y tropismo se clasifican en dos categorías: alto riesgo y bajo riesgo. Los tipos de alto riesgo mucosotrópicos están asociados con el desarrollo de cánceres anogenitales, incluidos los del cuello uterino (CaCu), vulvar, vaginal, pene, ano y también se han encontrado implicados en tumores orofaríngeos, los VPH de bajo riesgo inducen solo verrugas genitales benignas asociados principalmente a los VPH-6 y 11²⁸.

Existe un grupo de papilomavirus que tienen tropismo por la piel, estos papilomavirus cutáneos raramente se relacionan con neoplasias, excepto los relacionados con una enfermedad dérmica denominada *epidermoplastia verruciforme (ev)*. En función de su capacidad para producir o no esta enfermedad, también poseen una clasificación²⁹. En la tabla 1 se muestra los principales serotipos de acuerdo a su clasificación.

Clasificación epidemiológica	Tipos de VPH
Alto riesgo	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59

Probable alto riesgo	26,53,66,68,73,82
Bajo riesgo	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81
Relacionados con EV	5,8,9,12,14,15,17,19,20,21,22,23,24,25,36,37,38,104,107
No relacionados con EV	1,2,3,4,7,10,26,27,28,29,41,48,49,57,60,63,65,75,76,77,78

Tabla 1 Clasificación de serotipos de VPH según su tropismo y capacidad de infección^{29,30}.

4.1.2 Aspectos del genoma de VPH

El material genético del VPH consiste en una molécula circular de ADN de doble cadena que presenta una estructura de aproximadamente 8.000 pares de bases^{17,18}

Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de la mayoría de los papilomavirus humanos y animales, lo que muestra que la organización general del genoma es muy parecida entre sí. Todas las secuencias potencialmente codificadoras de proteínas (ORF- Open Reading Frames- o marcos abiertos de lectura) se localizan en una de las dos cadenas de ADN; la mayoría de estos ocupan posiciones relativamente similares³¹ (Figura 1).

Los **ORFs** se han clasificado en dos grupos: Tempranos (**E** - early) y Tardíos (**L** - late). La mayoría de los genes **E** se expresan en las primeras etapas del ciclo vírico, los genes **L** se expresan en las etapas finales del ciclo³⁰. Estos genes están dispuestos en dos bloques separados por una región no codificante (LCR, Long control region) o también denominada URR (Upper regulatory region), que no codifica proteínas, pero contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales²⁹.

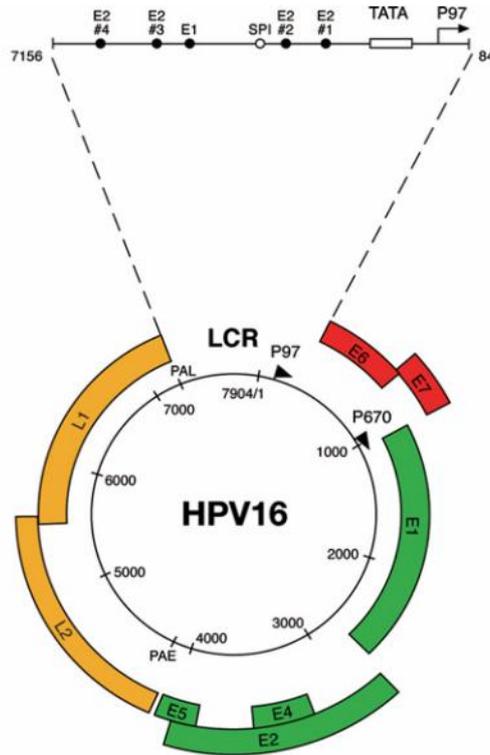


Figura 1. Organización del genoma del VPH

La mayoría de estos **ORFs**, no corresponden exactamente a una proteína, por lo cual algunos codifican segmentos para más de una, en la tabla 2 se describen las funciones y características de las proteínas.

Proteína	Longitud aprox	Función
E1	2.000 pb	Es una proteína multimérica con actividad ATPasa y ADN Helicasa, reconoce y está unida al origen de replicación del ADN viral, formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas, ADN polimerasa y proteínas de la célula huésped. Necesaria para replicación del ADN y el control de la transcripción
E2	1.100 pb	Principal regulador de la transcripción de los genes virales, se une al promotor transcripcional viral como un dímero, además reprime a los promotores encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7 (oncogenes virales), reduciendo su síntesis. Interfiere en la síntesis de la

		proteína p53, lo que produce la detección del ciclo celular en G1 y apoptosis.
E3	300 pb	No se conoce la función de esta proteína, solo está presente en algunos serotipos de VPH.
E4	300 pb	Esta proteína se fusiona con regiones de E1 formando una proteína mixta E1-E4. Interviene en el ciclo celular en G2, a través de la unión de ciclinas y quinasas dependientes y por bloque de E7, alterando el soporte estructural del citoesqueleto produciendo daño mitocondrial y apoptosis.
E5	230-250 pb	Se localiza principalmente en la membrana citoplasmática de la célula huésped, interactuando con algunos factores de proliferación celular. Inhibe la apoptosis y la migración del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a la superficie celular.
E6	450-500 pb	Induce la síntesis de ADN, activa la actividad de la telomerasa, interactúa e interfiere con la función de numerosas proteínas celulares. La unión de E6 de VPH de alto riesgo a p53 conduce a su degradación, en ausencia de p53 los reguladores negativos del ciclo celular no se expresan y la proliferación continua incluso en condiciones inadecuadas.
E7	300-320 pb	Induce la proliferación celular no programada, interactúa con factores de transcripción y enzimas remodeladoras de cromatina, actúa sobre los reguladores positivos del ciclo celular e inhibe los negativos y supresores de tumores, principalmente p10Rb causando su degradación y la activación de genes celulares involucrados en la replicación del ADN.
L1	1.700 pb	Es la proteína que compone mayormente a la cápside, se auto ensamblan en capsómeros y cápside, interactúa con L2 y con los receptores de la célula.
L2	1.400 pb	Proteína menor de la cápside viral, interactúa con el ADN; se cree que facilita el ensamblaje del virión; puede interactuar con receptores de las células.

LCR	800-1.000 pb	No codifica proteínas, pero contiene elementos necesarios para la regulación de la expresión de los genes, la replicación del genoma y su ensamblaje en partículas virales
------------	--------------	--

Tabla 2. Características y funciones de las proteínas del VPH^{29,30,31}

4.1.3 Epidemiología

El virus del papiloma humano (VPH) agente causal del cáncer de cuello de útero, ocupa el cuarto lugar entre los tipos más comunes de cáncer que afectan a mujeres, según la última actualización de la OMS, en agosto de 2017³², se estimó un número de 266.000 muertes y unos 528.000 nuevos casos en 2012. La gran mayoría (alrededor del 85%) de esas muertes se produjeron en las regiones menos desarrolladas, donde es el causante de casi el 12% de todos los cánceres femeninos³².

Tanto la mujer como el hombre pueden ser portadores asintomáticos y vehículos de la infección por VPH. Aunque la prevalencia de infección varía en las distintas zonas geográficas del mundo, se considera que cerca del 80 % de las mujeres se habrán infectado por, al menos, un tipo de VPH a lo largo de su vida³³.

Estudios epidemiológicos realizados en Europa en mujeres con citología normal, detectan una prevalencia media de infección por VPH del 8,2 %. La prevalencia es mayor en las mujeres jóvenes, y a los 25 años de edad se sitúa sobre el 25 %. Más allá de los 30 años, la tasa de infección se reduce a un 5-10 % y vuelve a elevarse a partir de los 40-45 años, en varones la prevalencia de infección es más elevada que en las mujeres, con una tasa media estimada del 65 % entre los 18 y 70 años, y se mantiene estable a lo largo de la vida³³.

En Colombia de acuerdo con las estimaciones nacionales de incidencia de cáncer, en el periodo 2000 – 2006, se presentaron cerca de 70.887 casos anuales de cáncer: 32.316 en hombres y 38.571 en mujeres. En mujeres, la tasa de incidencia, ajustada por edad, para cáncer de cuello uterino fue de 36,4 casos nuevos por 100.000 mujeres con cerca de 6.900 casos nuevos anuales³⁴. De acuerdo con la semana epidemiológica 23, (junio 03 al 09 de 2018), se notificaron 1.639 casos nuevos³⁵ y según la última actualización disponible de la Semana Epidemiológica 22 al 28 de diciembre de 2019, se notificaron 5.696 casos nuevos mostrándose un incremento importante con el acumulado esperado³⁶.

4.1.4 Mecanismo de infección de VPH

Los VPH son virus no envueltos con cápsides icosaédricas que replican sus genomas dentro de los núcleos de las células huésped infectadas. El ciclo de vida del VPH está relacionado con el programa de diferenciación de la célula huésped infectada, el queratinocito, con la producción de partículas de virión maduras restringidas a células supra basales diferenciadas. Se cree que la infección por los virus del papiloma ocurre a través de micro heridas del epitelio que exponen las células en la capa basal a la entrada viral¹⁶. (Figura 2. Ciclo viral de VPH)

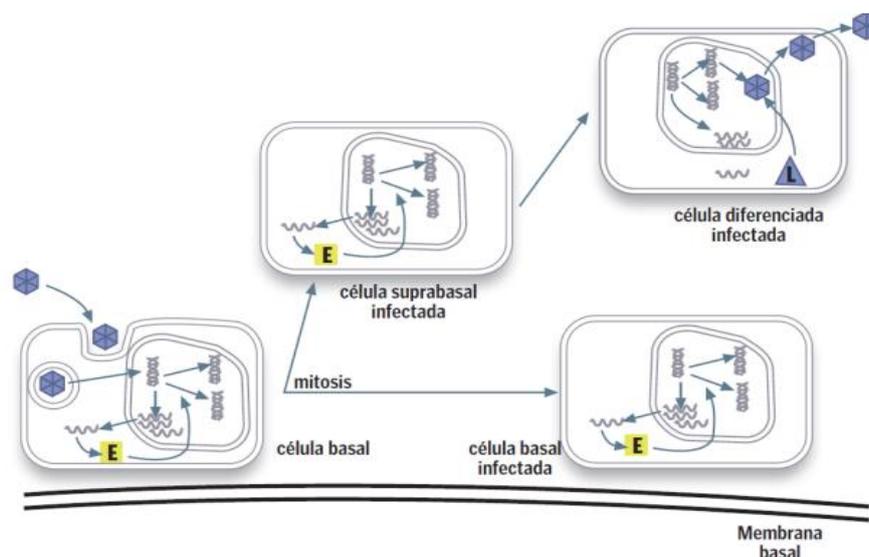


Figura 2. Ciclo viral del VPH³⁰.

Para explicar el proceso de infección por VPH de alto riesgo, se ha evidenciado que, durante la actividad sexual, el microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de VPH, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxilo terminal. Dicho receptor ha sido asociado estructuralmente con Heparán Sulfato para los tipos virales 16 - 33 y con Alfa-6-Integrina para VPH 6. Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, por endocitosis¹⁶. Para los cuales se han identificado dos sistemas; el primero involucra un complejo proteico llamado Clatrina, utilizado por los tipos 16 y 18; el segundo, utiliza un grupo de proteínas principalmente Caveolina, en el que participa el VPH 31¹². La infección por VPH de estas células conduce a la activación de una cascada de expresión génica viral que da como resultado la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extra cromosómicas de ADN

viral por célula. Este número promedio de copias se mantiene de manera estable en células basales indiferenciadas durante el curso de la infección¹⁶.

Entre las primeras proteínas virales que se expresan están los factores de replicación, E1 y E2. Estas proteínas forman un complejo que se une a secuencias en el origen viral de replicación y actúa para reclutar polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar en la replicación y promover su genoma en estado episomal (ADN libre en el núcleo) Figura 3.

La proteína E1 también exhibe actividad helicasa, lo que permite la separación de hebras de ADN viral por delante del complejo de replicación¹⁷. E2 es una proteína de unión a ADN específica del sitio que ayuda a reclutar E1 para el origen, pero también juega un papel en la regulación de la transcripción viral del promotor temprano. Los sitios de unión para E2 se encuentran adyacentes a sitios para factores de transcripción celular que activan el promotor temprano. A niveles bajos, E2 une sus secuencias de reconocimiento y activa el promotor temprano, mientras que, a altas concentraciones, reprime al bloquear la unión de los factores de transcripción celular actuando directamente en la síntesis de la proteína P53 lo que produce finalmente la detención del ciclo celular en G1 y apoptosis¹⁷.

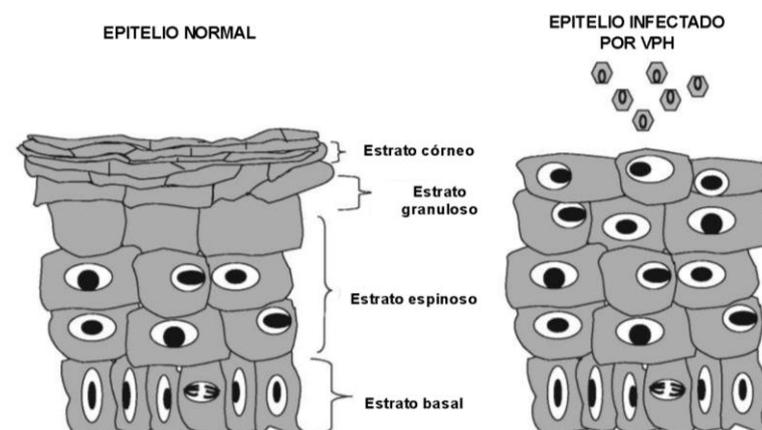


Figura 3. Representación de un epitelio normal y uno infectado por VPH

Las proteínas E6 y E7 de los tipos de VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas virales. E6 de alto riesgo se une a la proteína supresora de tumores p53 como parte de un complejo trimérico con la ubiquitina ligasa celular, E6AP, lo que lleva a la rápida renovación de p53¹⁶ (Figura 4). E7 se une a la familia de supresores tumorales de retinoblastoma (Rb), así como a otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular¹⁶ (Figura 5). Como HPV infecta las células basales que se dividen, los genomas virales se dividen en células hijas, una de las

cuales se separa de la capa basal, migra hacia el estrato granuloso, y se somete a la diferenciación. En los epitelios normales no infectados, las células salen del ciclo celular cuando salen de la capa basal. A medida que las células infectadas abandonan la capa basal, permanecen activas en el ciclo celular debido a la acción de la proteína E7¹⁹.

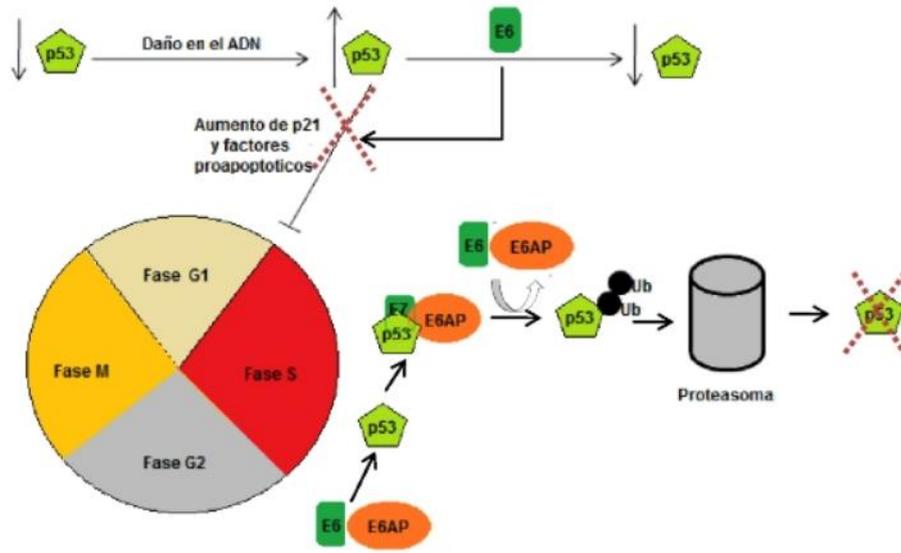


Figura 4. Inhibición de la función de P53 por acción de la oncoproteína viral E6

Las células vuelven a entrar en la fase S en células altamente diferenciadas y activan la expresión de los factores de replicación celular necesarios para la replicación viral. La presencia de E7 conduce a una retención característica de núcleos en todas las capas de epitelios infectados. Estas oncoproteínas son necesarias para la inmortalización celular, la retención de la capacidad del ciclo celular en la diferenciación y también para el mantenimiento de formas extra cromosomales de VPH en células basales indiferenciadas¹⁹. Las funciones de las proteínas E4 y E5 aún no se comprenden completamente; sin embargo, se ha propuesto que ambos participen en la regulación de las funciones virales tardías³⁷. Las proteínas L1 y L2 constituyen la cápside viral y se expresan únicamente en los queratinocitos diferenciados de la capa superficial de la lesión, donde se producen partículas víricas maduras³⁸.

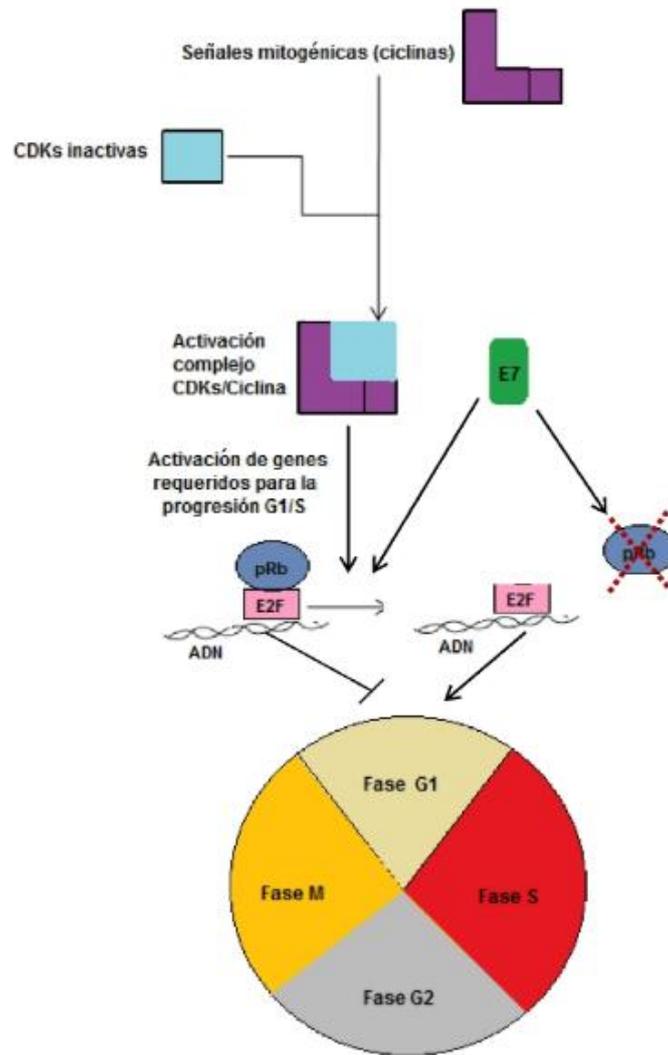


Figura 5. Unión de E7 con pRB

4.1.5 Respuesta inmune frente al VPH

La interacción entre el VPH y la célula es compleja y variada. En este virus no se ha encontrado un receptor celular específico que permita evitar la infección por el mismo bloqueo, la molécula de superficie que sirve de unión a los VPH está muy conservada y al parecer tienen funciones vitales que hacen imposible su uso como diana para bloqueo de la infección. En términos generales, tras la primera infección de la célula del epitelio cervical por VPH se desencadenan una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción, activación de macrófagos, intervención de la célula natural killer (NK), anticuerpos naturales, e incluso del sistema de complemento, que formarán una primera barrera de inmunidad específica. La prolongación de la barrera en el tiempo y la protección frente a futuras infecciones requiere mecanismos de inmunidad específica²⁹.

En algunas circunstancias, el VPH es capaz de pasar inadvertido para el sistema inmunitario y establecer una infección latente. Hay múltiples mecanismos a través de los que el virus logra evadir la respuesta del sistema inmunitario del hospedero y asegurar su supervivencia, replicación y patogenicidad. En primer lugar, el ciclo viral del VPH se desarrolla paulatinamente a medida que ocurre el ciclo celular de los queratinocitos, haciendo uso de la maquinaria de las células del hospedero para su replicación, evitando el reconocimiento de enzimas que pueden ser blanco de la respuesta inmunitaria. El mecanismo replicativo es lento y el virus no concentra sus partículas virales en las células de la capa basal, membrana basal o ambas que han sido blanco de invasión inicial, sino que lo hace en las capas superiores de la epidermis, a las que migra y donde la existencia de las células de respuesta inmunitaria es mínima. Hasta estos niveles el virus retrasa la transcripción de proteínas de la cápside L1 y L2, que suponen ser las partículas virales más inmunógenas. Al no producir la muerte de los queratinocitos tras el proceso infeccioso (sino permitir que éstos mueran mediante apoptosis una vez que alcanzan el estado de diferenciación a corneocitos, como naturalmente fueron programados), evade la producción de citocinas y quimiocinas al igual que la activación de células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos, neutrófilos, células NK, linfocitos NKT, entre otras células, que en condiciones normales hubiesen sido activadas tras la citopatogenicidad y citólisis con el fin de establecer una respuesta inmunitaria eficaz en el aclaramiento de la infección³⁹.

4.1.6 Patologías causadas por VPH

- **Cáncer de cuello uterino**

El cáncer de cuello uterino (CCU) se presenta frecuentemente a nivel mundial, constituyéndose en uno de los principales problemas de salud pública en la población femenina¹⁶. sin embargo, es una enfermedad que, a pesar de sus altas tasas de incidencia y mortalidad, puede ser prevenida cuando es detectada en sus etapas iniciales⁴⁰. El CCU, al igual que muchos otros cánceres, se desarrolla como resultado de múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas e inmunológicas; adicionalmente otros factores como la interacción entre medio ambiente y célula pueden facilitar la promoción de los procesos de transformación neoplásica. Según la historia natural de la ontogénesis de cuello uterino, el virus del papiloma humano (VPH) es considerado, como el principal factor etiológico de este tipo de cáncer. Se estima que gran porcentaje de la población sexualmente activa tiene

contacto con el virus, la mayoría de las infecciones por VPH no causan síntomas o enfermedad y se eliminan dentro de los 12 a 24 meses posteriores a la infección. Solo una pequeña fracción de esas infecciones que persisten o progresan a una lesión preneoplásica resultan en cáncer⁴¹. Para que se lleve a cabo este proceso el tejido pasa por una serie de etapas que determinan la magnitud de la infección, (Figura 6) para lo cual se usan diferentes clasificaciones que permiten realizar la distinción. Dentro de las cuales encontramos la nomenclatura de la OMS establecida en 1968, la de Richard y la de Bethesda determinada por el National Cancer Institute de los Estados Unidos en 1988^{42,43}.

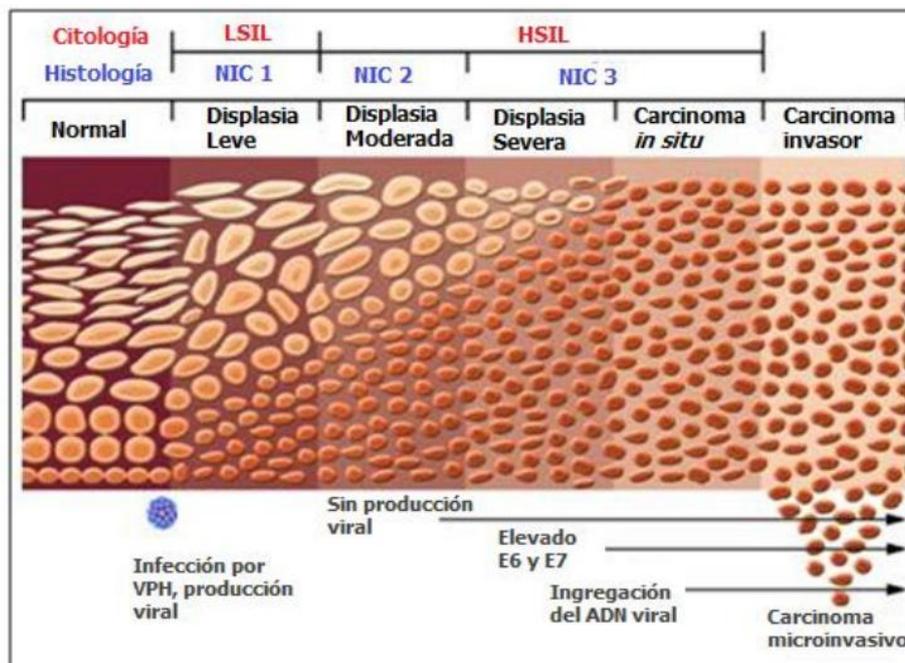


Figura 6. Patogenia del cáncer de cuello uterino

Tomando como referencia la clasificación de Richard, las modificaciones celulares se clasifican en:

- **Neoplasia intraepitelial cervical grado 1**

Una vez adquirida una infección por VPH, bien sea oncogénica o no, se pueden presentar lesiones intraepiteliales de bajo grado, caracterizadas por la producción de células inmaduras, en el tercio inferior del epitelio, mostrando anomalías leves cuando éstas maduran^{42,43}.

- **Neoplasia intraepitelial cervical grado 2**

Cuando la infección ha avanzado hasta el tercio central del cérvix, se observan células anormales hasta la mitad del tejido y la actividad mitótica continúa en progreso^{42,43}.

- **Neoplasia intraepitelial cervical grado 3**

En la mayoría de casos las células muestran maduración muy escasa, se observan atipias nucleares. En la displasia severa, la cromatina nuclear es menos densa y hay mayor variación en forma y tamaño de los núcleos. La mitosis se encuentra en todos los niveles, varían en cantidad y se observan numerosas mitosis atípicas^{42,43}.

- **Cánceres diferentes al de cuello uterino**

La infección por VPH además de ser una causa necesaria de todos los cánceres cervicales está etimológicamente relacionada con un subconjunto de cánceres de ano, orofaringe, pene, vagina, y vulva. Dada esta asociación con varios cánceres importantes, se estima que el 5.2% de todos los cánceres que ocurren en todo el mundo son atribuibles a la infección por VPH, debido a sus mecanismos oncogénicos explicados anteriormente⁴⁴. Lo anterior respaldado con evidencia molecular de una asociación causal que incluye la presencia de genomas de VPH, integración y especificidad de genomas en núcleos de células tumorales, alta carga viral de VPH y expresión elevada y constitutiva de oncogenes E6 y E7 en células tumorales⁷. Debido a que los VPH son estrictamente epiteliotrópicos e infectan preferentemente epitelios escamosos. Los tumores asociados al VPH en sitios anatómicos con heterogeneidad etiológica con frecuencia tienen una histopatología escamosa basaloide. Por lo tanto, se espera que los cánceres asociados con el VPH sean predominantemente de origen escamocelular, por lo que esta histología representa una predilección por el virus para infectar un tipo de célula particular o posiblemente una diferenciación tumoral inducida por el virus en el proceso de transformación⁴⁵.

La alta incidencia de VPH siempre ha sido motivo de preocupación al ser una posterior causa de muerte en mujeres, sin embargo, en las últimas décadas se ha aumentado la importancia de la presencia de este en hombres, no solo por su papel como fuente de transmisión sino al aumento de casos de cáncer de pene, anales y orales en esta población⁴⁶. La infección por VPH también se ha implicado en la etiología de varios otros tipos de cáncer, incluidos los de la cavidad oral, el esófago, el pulmón, la próstata y el seno, los cuales en su mayoría son atribuibles a los tipos de VPH de alto riesgo 16 y 18⁴⁵. Aunque no todos los cánceres mencionados son 100% producidos por la presencia de este virus, si se ha considerado un papel del mismo para su desarrollo, a continuación, se presenta una proporción de la

implicación del virus en los diferentes tipos de cáncer, dando cabida a variables como la ubicación geográfica y métodos de detección del virus⁴¹. Tabla 3

Tipo de cáncer	Relación con el VPH	Presencia en mujeres	Presencia en hombres
Cáncer de cuello uterino	100%	X	
Cánceres anales	90% –93%	X	X
Cánceres de orofaringe	12% –63%	X	X
Cánceres de pene	36% –40%		X
Cánceres vaginales	40% –64%	X	
Cánceres vulvares	40% –51%	X	

Tabla 3. Proporción del papel de VPH en los cánceres más comunes.

4.1.7 Factores de riesgo y prevención

El principal factor del riesgo para contraer una infección por VPH, está relacionado con la conducta sexual, estudios han demostrado que la mayor prevalencia de mujeres infectadas son aquellas cuya actividad sexual es activa y que la prevalencia de este en mujeres que no ha iniciado su vida sexual es casi nula; el VPH es considerado una infección de transmisión sexual (ITS), por lo cual el número de parejas, su historial y las conductas sexuales, son un factor relevante en la adquisición del virus, del mismo modo que el uso de preservativo⁴⁷. En cuanto al desarrollo del cáncer de cuello uterino se ha identificado a los hombres como principales transmisores del virus².

Sin embargo, hay otros factores que facilitan la infección, como antecedentes de infecciones por *C. trachomatis* y el virus del *herpes simple tipo 2*, el uso prolongado de anticonceptivos orales, la alta paridad, el tabaquismo, la mala nutrición, algunas características demográficas, la inmunosupresión y la coinfección con VIH, características que hacen a personas más susceptibles⁴⁸.

El riesgo estimado de contagio tras una relación sexual sin protección con una persona infectada es elevado y oscila entre el 40 y el 80 %. El uso de preservativo reduce, pero no elimina el riesgo de transmisión sexual.

La conducta sexual es un factor que determina el mayor o menor riesgo de infección:

- La edad precoz en el inicio de las relaciones sexuales se asocia a mayor riesgo de prevalencia.
- El número de compañeros sexuales a lo largo de toda la vida sexual es el factor correlacionado con un mayor riesgo de infección, estimándose un incremento de un 3-5 % por cada compañero sexual para la infección por VPH 16 y 18. Un incremento del número de contactos sexuales de la pareja masculina de una mujer, aumenta el riesgo de infección de esta.

La mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y no causan problemas clínicos. En la mayoría de los casos la infección se resuelve espontáneamente, generalmente entre los 12 y 24 meses en mujeres y entre los 6 y 12 meses en los varones. En un 3-10·% de las mujeres infectadas por los VPH de alto riesgo la infección se vuelve persistente y constituyen el grupo de riesgo de desarrollo de neoplasias. La persistencia y la enfermedad son más comunes en las infecciones por los tipos de VPH 16 y 18 que en otros tipos de alto riesgo.³³.

En los últimos años los gobiernos de la mayoría de los países han trabajado fuertemente, buscando alternativas para mitigar el impacto del VPH en la población, por lo cual se han empleado esquemas tanto para el control, detección y prevención del virus. Teniendo en cuenta los factores de riesgo anteriormente mencionados, algunos de ellos son modificables, por lo tanto los cambios en ciertas conductas como el uso del preservativo, cambios dietarios y consumo de tabaco pueden disminuir las proporciones de infección⁴⁹, por otro lado es importante realizar exámenes periódicos donde se pueda ver lesiones tumorales de cérvix mediante el reconocimiento de la morfología de las células, como primera medida de cribado mediante el análisis citológico, Papanicolaou (Pap test), permitiendo una detección temprana la cual puede ser tratada y posiblemente resuelta⁴².

4.1.8 Vacunas

Actualmente hay tres vacunas disponibles para prevenir la infección con los tipos de VPH responsables de la mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino. El objetivo de la vacunación profiláctica es reducir la incidencia de cánceres anogenitales y lesiones

precancerosas, con beneficios protectores adicionales contra las verrugas genitales para quienes reciben la vacuna cuadrivalente⁵⁰.

En junio de 2006, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) aprobó la vacuna tetravalente profiláctica, Gardasil ®, para las mujeres de entre 9-26 años de edad. Esta vacuna previene los precursores del cáncer cervical y las lesiones genitales externas causadas por el VPH-6, 11, 16 y 18.

La vacuna bivalente, Cervarix ®, protege contra los tipos de VPH 16 y 18. Siendo estas fuentes importantes de protección contra el virus⁵¹.

Gardasil 9®, Fue la última vacuna aprobada por la FDA, tras investigaciones que determinaron que, al ser aplicada a mujeres de 27 a 45 años de edad, la vacuna continuaba siendo efectiva⁵².

Para la prevención primaria, el Programa Ampliado de Inmunización (PAI) cuenta con la vacuna tetravalente contra el VPH, dirigida a niñas de cuarto año escolar con edad mayor o igual a 9 años o más, hasta el grado 11, al igual que a todas las mujeres no escolarizadas desde los 9 años hasta los 18 años.

En Colombia, las pruebas específicas para la detección temprana del cáncer de cuello uterino son:

- De los 25 - 30 años: Citología de cuello uterino bajo el esquema 1-1-3 (una citología cada año durante dos años consecutivos y si el resultado de las dos es negativo se hace cada 3 años).
- De los 30 - 65 años: citología combinada con las pruebas de detección del Virus de Papiloma Humano (ADN/VPH).
- Mujeres entre 25 - 50 años, residentes en zonas de difícil acceso a servicios de salud: técnicas de inspección visual del cuello uterino⁵³.

4.2 Métodos moleculares para la identificación de VPH

El diagnóstico molecular es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico. La detección y cuantificación específica de material genético en una

muestra biológica ha mostrado un significativo impacto en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y el cáncer. El desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas, ha transformado al diagnóstico molecular en una herramienta clave para el beneficio del paciente²², con el auge de la investigación y la necesidad de diagnósticos oportunos y eficaces, han surgido técnicas de laboratorio fundamentados en esta área, aplicadas en programas de prevención, control y tratamiento²³.

En cuanto al VPH y su mecanismo de infección, el cual se desarrolla durante un período prolongado a través de lesiones precursoras, que pueden detectarse mediante pruebas citológicas que, aunque han disminuido la incidencia de cáncer cervical, este continúa siendo fuente importante de enfermedad en mujeres²⁰. De Acuerdo a los mecanismos moleculares impulsados por el VPH que permiten el desarrollo de las lesiones cervicales, se ha proporcionado una serie de biomarcadores potenciales para el uso diagnóstico y pronóstico en el tratamiento clínico de las mujeres con esta enfermedad, que se pueden utilizar para aumentar la predicción positiva²¹.

Adicionalmente, el VPH no se puede propagar en el cultivo de tejidos y, por lo tanto, en la mayoría de los casos, su identificación precisa se basa en técnicas de biología molecular, que permiten su detección y tipificación precisa, trayendo mayores beneficios que los proporcionados por los métodos de diagnóstico convencional²¹, permitiendo:

- La clasificación de mujeres con anomalías citológicas equívocas o de bajo grado
- El seguimiento de mujeres con resultados anormales de detección que son negativos en la colposcopia / biopsia
- Predicción del resultado terapéutico después del tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN)
- Detección primaria para la prueba de ADN del VPH⁵⁴.
- Conocimiento de tipos específicos de VPH implicados en la infección⁵⁵.
- Investigaciones de prevalencia regional y nacional de VPH de tipo específico⁵⁶.

A continuación, se presenta una línea del tiempo con los principales hechos en el curso de la investigación sobre el VPH^{20,57}. Tabla 4

AÑO	AUTOR	SUCESO
1907		Descripción de la existencia del Virus del Papiloma (VP)
1933	Shope y Hurst	Descripción el primer virus del papiloma cutáneo con potencial oncogénico en una especie de conejos silvestres.
1949		Primera observación del virus por microscopía electrónica
1977	Zur Hausen	Posible asociación entre VPH y CaCu
1982	Chen y Danos	Clonación completa del genoma del virus del papiloma bovino tipo 1 (VPB-1) y el genoma del VPH tipo 1 (VPH-1)
1983	Schwarz y su grupo	Clonación completa del genoma completo del VPH tipo 6 (VPH-6) en 1983
1983	Zur Hausen	VPH como agente causal de cáncer
1984	Zur Hausen	Inicio del desarrollo de la vacuna
2006	FDA	Aprobación de la vacuna
2008	Zur Hausen	Ganador de premio nobel
2014		Identificación de más de 200 serotipos

Tabla 4. Línea del tiempo, principales sucesos sobre el VPH.

4.2.1 Hibridación de ácidos nucleicos

Las técnicas de hibridación molecular se basan en el estudio de secuencias específicas de ADN o ARN, tanto para su identificación como eventual cuantificación. Para llevar a cabo este proceso se parte de sondas que son secuencias de material genético, complementarias a aquellas que se quieren detectar. La hibridación o acoplamiento de la secuencia génica diana y la sonda complementaria se puede reconocer con métodos radiactivos y colorimétricos⁵⁸. Inicialmente fue por medio de estas técnicas que se adquirió información sobre el VPH, aunque estas técnicas generaron información de alta calidad, las desventajas de estos enfoques de sonda directa incluyen baja sensibilidad, la necesidad de cantidades relativamente grandes de ADN purificado y procedimientos que requieren mucho tiempo²¹.

4.2.2 Métodos de amplificación de señal

▪ Captura de Híbridos 2

La captura de híbridos es un método de amplificación de la señal, basado en la hibridación del ADN del VPH con sondas de ARN marcadas. Los híbridos ADN-ARN se detectan con un anticuerpo monoclonal específico y un sustrato quimioluminiscente, lo que proporciona una medida cuantitativa del ADN del VPH²⁹.

Esta es la prueba más antigua utilizada en tamizaje y ha sido validada clínicamente en múltiples estudios. Como su nombre indica, es una técnica en la cual se identifican híbridos ADN con sondas de ARN. La técnica cuenta desde el año 2000 con la aprobación de la FDA para uso rutinario en las actividades de detección temprana en combinación con la citología. Esta prueba permite la detección de VPH-AR por medio de la utilización de un cóctel de sondas de ARN para los 13 VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), permitiendo la formación de un híbrido ADN viral - ARN. Una prueba positiva significa que la mujer ha sido infectada por alguno de los 13 tipos de VPH-AR. Esta prueba no permite identificar cuál de ellos es y tampoco si la paciente tiene uno o varios de estos tipos^{21,59}

4.2.3 Amplificación de ácidos nucleicos

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Las técnicas basadas en PCR son altamente sensibles, específicas y ampliamente utilizadas. En una PCR convencional, la ADN polimerasa termoestable reconoce y extiende un par de cebadores oligonucleótidos que flanquean la región de interés. En el proceso final, la PCR puede generar mil millones de copias de una sola molécula de ADN de doble cadena después de 30 ciclos de amplificación⁵⁹, los protocolos de HPV-PCR utilizan cebadores de consenso como PGMY09 / PGMY1 y GP5 + / GP6 +, que permiten la amplificación de una gran cantidad de genotipos de HPV en una sola reacción. Los cebadores se dirigen a regiones conservadas del genoma del VPH, como el gen de la cápside L1⁶⁰. Una vez terminada la amplificación, la genotipificación del virus se puede llevar a cabo por diferentes técnicas; dentro de los tipos de PCR utilizadas, encontramos:^{61,62,21}: (Tabla 5)

Técnica	Características	Aplicaciones
PCR Estándar	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos	Identificación de VPH a partir de sondas dirigidas a segmentos conservados.

	cebadores. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	
PCR Múltiple	Amplificación de 2 o más segmentos de ADN utilizando varios cebadores en una sola reacción de amplificación.	Detección de varios tipos de VPH a partir de diferentes sondas específicas para cada uno de ellos en una sola PCR
PCR en tiempo real	Herramienta confiable, sensible y específica para la detección y genotipado de genotipos específicos de VPH en muestras de tejido.	Puede detectar la carga viral, usa diferentes fluorocromos que emiten fluorescencia, a medida que avanza la reacción de PCR, detectando ácidos nucleicos en concentraciones muy pequeñas.
RPC-RFLP	RPC estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Tipificación el VPH, y es más fácil y menos costoso que la secuenciación. buen poder discriminatorio al diferenciar el virus en HR o LR, identificación de infecciones únicas o múltiples, el ADN amplificado es digerido por enzimas de restricción, lo que resulta en fragmentos de ADN de varias longitudes.

Tabla 5. Variantes de PCR empleadas para la identificación VPH

Dentro de los métodos aprobados y empleados para el diagnóstico de VPH basados en PCR encontramos: (Tabla 6)

Nombre	Característica	Variante de PCR
COBAS 4800	Prueba cualitativa in vitro que detecta 14 tipos de VPH-AR y que ha sido validada clínicamente. Puede detectar 12 genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), y reporta específicamente los genotipos de alto riesgo 16 y 18.	PCR en tiempo real, que utiliza cebadores para la región L1 del VPH
Abbott RealTime	Permite detectar 14 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). Esta prueba reporta, de manera separada otros 2 genotipos de alto riesgo, los genotipos 16 y 18.	PCR en tiempo real, que mezcla múltiples cebadores para la amplificación y detección de ADN del VPH-AR
Becton Dickinson (BD)	Detección de regiones específicas, según el tipo del virus, en lugar de la amplificación de las regiones genómicas detectadas con conjuntos de cebos de L1. El ensayo proporciona información individual para 6 tipos de VPH (16, 18, 31, 45, 51, y 52), al igual que la detección de todos los 14 VPH-AR	PCR en tiempo real que amplifica la región que codifica las oncoproteínas E6/E7 de los tipos de VPH-AR, permitiendo una detección específica.
Linear Array	Prueba cualitativa in vitro para la detección del VPH en muestras clínicas, detecta treinta y siete genotipos de ADN del VPH anogenital tanto de alto como bajo riesgo, mediante la amplificación de las regiones genómicas detectadas con conjuntos de cebos de L1.	PCR e hibridación de ácidos nucleico, cebadores que amplifican la región L1 de VPH.

Tabla 6. Métodos aprobados y empleados para el diagnóstico de VPH basados en PCR.

4.2.4 Análisis de microarrays

La tecnología de microarrays es una tecnología en desarrollo para estudiar la expresión de muchos genes a la vez. Consiste en colocar miles de secuencias génicas en lugares determinados sobre un portaobjetos llamado chip. Una muestra que contiene ADN o ARN se pone en contacto con el chip. El apareamiento de las bases complementarias entre la muestra y las secuencias de genes en el chip produce una cantidad de luz que se puede medir. Las áreas del chip que producen luz identifican los genes que se expresan en esa muestra⁶³.

Los análisis de microarrays de ADN junto con la PCR se ha aplicado con éxito en los últimos años y permite una detección y genotipado de calidad de VPH, dentro de los kits comerciales encontramos:

- **HPV Direct Flow Chip Kit**

Prueba que permite el screening y genotipado del virus del papiloma humano mediante amplificación e hibridación, permite la detección cualitativa del virus HPV y el genotipado de 36 tipos de HPV (Alto riesgo- HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82, y bajo riesgo- HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 84) mediante reacción de PCR, seguida de hibridación reversa sobre una membrana que contiene sondas específicas. Las muestras clínicas pueden amplificarse directamente, sin necesidad de una extracción previa de ADN⁶⁴.

- **PapilloCheck**

Es un equipo de ensayo basado en micromatrices para la detección y la genotipificación de un fragmento del gen E1 del genoma del virus del papiloma humano (VPH).

Este ensayo detecta e identifica 24 tipos de VPH en una sola reacción (VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82). El ensayo utiliza una PCR multiplex con cebadores fluorescentes para amplificar un fragmento de 350 pb del gen E1 del VPH, que comprende 28 sondas, cada una en 5 puntos replicados fijados en un chip de ADN. La hibridación se realiza en un chip de microarrays, que se escanea y analiza automáticamente⁶⁵.

- **Geno Flow**

Ensayo basado en PCR que co amplifica el gen humano como un control interno para medir la integridad de la muestra. Este ensayo, emplea una tecnología de hibridación de flujo basado en membrana, identifica 33 genotipos virales de VPH AR y BR (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 84). También diseñó una nueva sonda universal para capturar genotipos de VPH que no se incluyen en el panel de prueba para expandir la cobertura viral^{66,67}.

4.2.5 Detección de la expresión de los genes E6/E7

Las oncoproteínas E6/E7 tienen una importancia significativa, debido a que son cruciales para proveer las propiedades oncogénicas del virus pues se expresan durante su ciclo de vida contribuyendo a su replicación y persistencia, son requeridos para la inhibición de la función de las proteínas celulares p53 y pRB en la transformación maligna del epitelio, de acuerdo a algunas investigaciones se ha encontrado una elevada expresión de estos oncogenes en las lesiones de alto grado y el carcinoma cervical invasivo; la cantidad de proteína oncogénica,

traducida in vivo en la célula, es dependiente de múltiples factores, como el tipo y carga viral, tasa de transcripción de ARN, integridad de ADN y activación o inhibición de promotores y reguladores³⁰.

En los casos donde el virus permanece íntegro, es decir episomal, la expresión de estas oncoproteínas está invariablemente conservada y se modifica únicamente en respuesta a señales moduladora de sus promotores dependiendo la fase de la infección, por lo que será constante una vez que la infección se hace persistente. En el caso que el ADN del VPH se encuentre integrado, la interrupción de la región E2 del VPH actúa sobre los promotores de E6/E7 desregulan los positivamente e incrementando la producción de ARNm y la traducción a proteínas oncogénicas⁶⁸.

La prueba mRNA E6/E7 permite identificar precisamente la sobreexpresión de las proteínas virales del VPH. E6 y E7 se expresan durante el ciclo de vida del virus y son necesarias para su replicación, por lo que supone un mayor riesgo de lesión preneoplásico⁶⁹.

Los principales métodos utilizados para la detección de la integración del VPH son PCR, hibridación fluorescente in situ y PCR en tiempo real. Este último permite el cálculo de la relación entre los niveles de genes de VPH E2 y E6 / E7. Cuando hay integración del VPH, el genoma viral muestra una relación 1: 1 entre los genes E2 y E6 / E7⁷⁰.

- **Aptima HPV Assay**

Es una prueba de amplificación de diana por sonda de ácidos nucleicos para la detección cualitativa in vitro del RNA mensajero (mRNA) vírico E6/E7 procedente de los 14 tipos del virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). El Aptima HPV Assay no discrimina entre los 14 tipos de alto riesgo.

El Aptima HPV Assay consta de tres pasos principales, que tienen lugar en un solo tubo: captura de diana; amplificación mediada por transcripción de la diana; y detección de los productos de la amplificación, mediante el ensayo de protección de la hibridación. El ensayo incorpora un control interno (CI) para supervisar la captura, la amplificación y la detección del ácido nucleico, así como los errores del usuario o del instrumento⁷¹.

- **PreTect HPV-Proof HPV**

Ensayo para la detección cualitativa de la presencia de VPH, mediante la detección del ARN de las oncoproteína E6 / E7 de los tipos de VPH cancerígenos 16, 18, 31, 33 y 45. El control de muestras intrínsecas de ISC está incluido en para evaluar la calidad de la muestra y revelar posibles factores que pueden inhibir la amplificación. El kit se basa en la tecnología NASBA en tiempo real. PreTect HPV-Proofer HV es ideal ya que tiene una alta especificidad en el triaje del diagnóstico de citología ASC-US y LSIL. Es una herramienta valiosa para identificar a las mujeres que tienen un alto riesgo de displasia severa y al mismo tiempo reduce los costos de derivación innecesarios, cuenta con una placa de microtitulación precargada con reactivos listos para la adición de muestra, controles positivos y negativo, se pueden identificar 30 muestras por corrida, en un bajo tiempo de práctica⁷².

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Tipo de investigación

Es una investigación de tipo mixto que incluye un enfoque cuantitativo y cualitativo, este último específicamente de categoría descriptiva. Ambos enfoques permiten tener una perspectiva más amplia con respecto al tema, ya que por medio de la revisión literaria de artículos de diversas bases de datos se pretende hacer énfasis en las generalidades del uso de técnicas moleculares para la detección de VPH, así como realizar un análisis estadístico con las diversas fuentes bibliográficas.

5.1.1 Universo

Referencias bibliográficas relacionadas con las técnicas moleculares para la detección de VPH

5.1.2 Población

Referencias bibliográficas relacionadas con las técnicas moleculares para la detección de VPH y sus aplicaciones.

5.1.3 Muestra

Diferentes fuentes bibliográficas relacionadas con las técnicas moleculares para la detección de VPH

5.2 Criterios de selección de la bibliografía revisada

5.2.1 Criterios de inclusión

La literatura revisada fue aceptada por que cumple con la información necesaria para ser clasificados bibliográficamente en una base de datos. Asimismo, deben tener información relacionada con las técnicas moleculares para la detección de VPH que haya sido publicada en revistas reconocidas.

5.2.2 Criterios de exclusión

No se incluyeron las fuentes bibliográficas que no trataran temas relacionados con las técnicas moleculares para la detección de VPH, así como aquella bibliografía publicada en fuentes no confiables o en idiomas diferentes al inglés y español.

5.3 Procedimientos

5.3.1 Búsqueda de la información

Para realizar la recolección de la información se consultaron documentos técnicos en las bases de datos Pubmed, Science Direct, Scielo, Springerlink, Redalyc.org y NCBI, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. La búsqueda se hizo por medio de los siguientes descriptores en las bases de datos que se mencionaron anteriormente: Detección de VPH, Identificación de VPH, técnicas moleculares para el diagnóstico de VPH, entre otros términos relacionados

5.3.2 Selección de documentos

Los documentos fueron descargados en formato pdf o consultados en línea, y se procedió a realizar la lectura de las diferentes fuentes bibliográficas que contenían las generalidades del VPH, su ciclo de vida, mecanismo de infección, técnicas moleculares, entre otros.

5.3.3 Revisión bibliográfica

Se registró una síntesis de las fuentes bibliográficas analizadas en el presente documento, y se clasificaron en una base de datos teniendo en cuenta las siguientes categorías: tipo de documento, base de datos, país, año de publicación, tema y autor, y se procedió a realizar un análisis estadístico.

5.3.4 Análisis de la información

Con la base de datos elaborada se realizó un análisis con estadística básica descriptiva por Excel.

6. RESULTADOS

Para realizar la presente revisión se tuvo en cuenta 219 documentos de las diferentes bases de datos, de los cuales se excluyeron el 56 (25.5%) debido a que no cumplían con los criterios establecidos.

6.1 Tipo de información

Se trabajó con un total de 163 documentos, de los cuales la mayoría correspondieron a artículos de investigación 106 (65%), la gran mayoría utilizados como fuente de información sobre las técnicas moleculares y el 33 (20%) correspondieron a artículos de revisión, usados como soporte del marco teórico y los antecedentes, como se observa en la Figura 7.

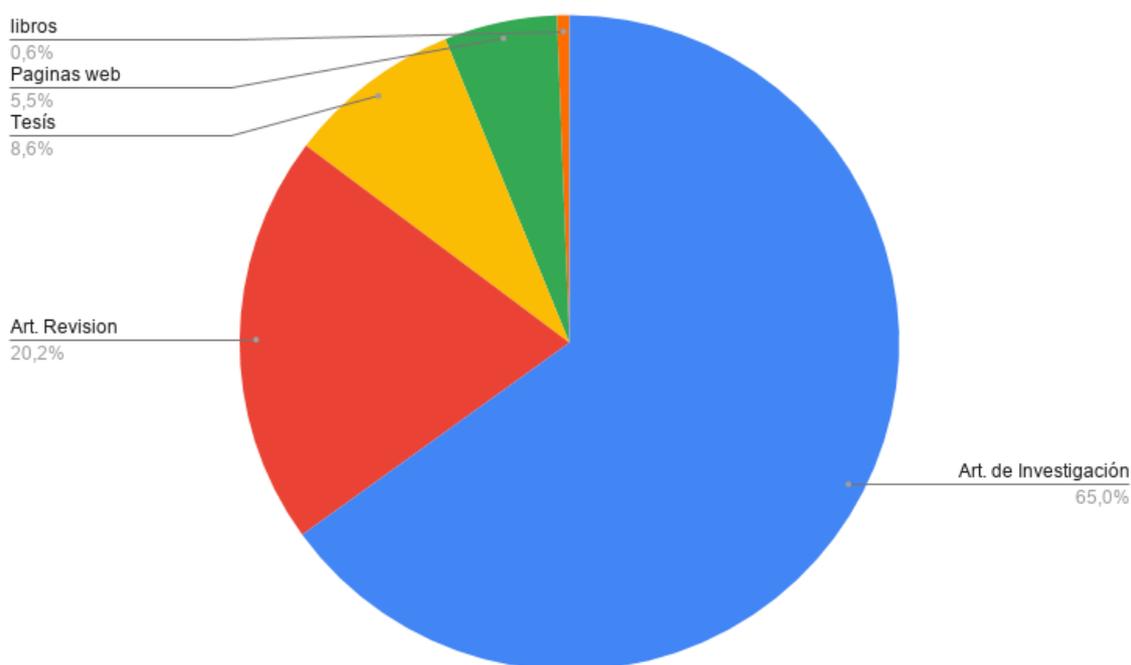


Figura 7. Tipo de información

6.2 Año de publicación

De los artículos seleccionados, los años de mayor publicación se encontraron en el 2018 y 2019 con 15 (9,2%) y 17 (10,4%) publicaciones respectivamente y los años de menor publicación fueron 1997, 1998 y 2000. Figura 8

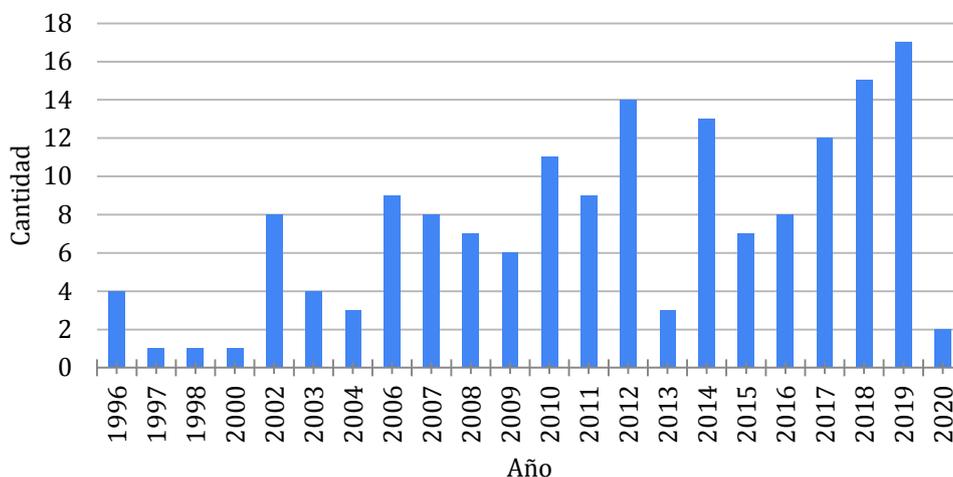


Figura 8. Año de publicación

6.3 Lugar de publicación

Los artículos fueron publicados en 31 países, los cuales se clasificaron por continente, la mayor parte se ubicó en América 75 (46,0%), seguido de Europa 56 (34,4%) y Asia 29 (17,8%), como se observa en la Figura 9.

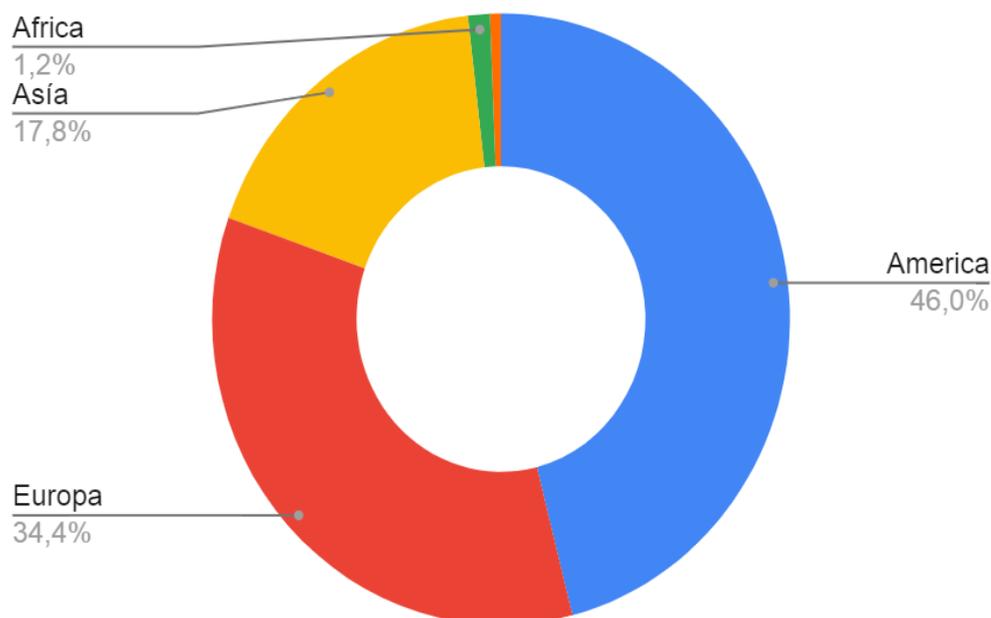


Figura 9. Lugar de publicación

Los países de mayor publicación, fueron Colombia (14,7%), España (12,9%) y China (8,6%), como se observa en la figura 10.

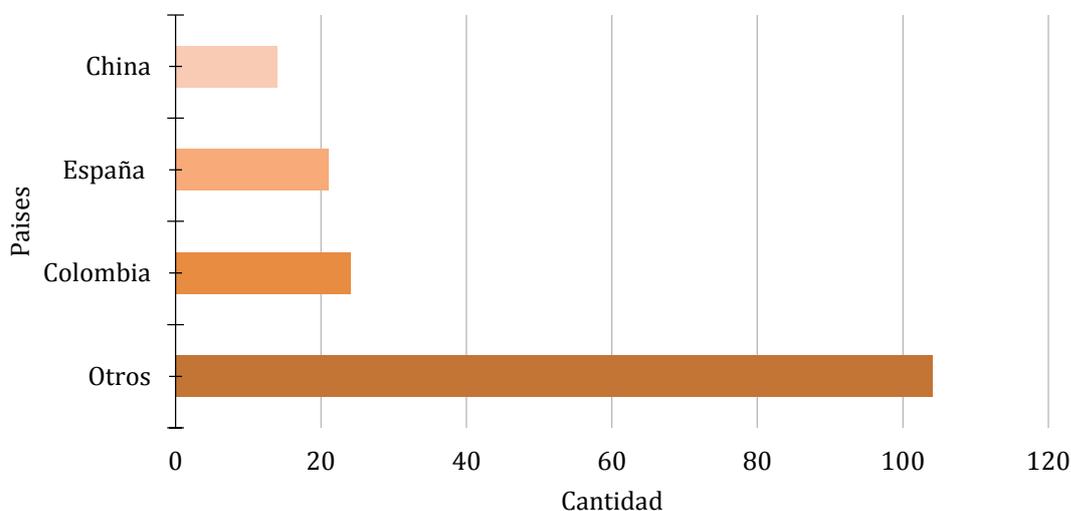


Figura 10. Países de mayor publicación

6.4 Técnicas moleculares para identificación de VPH

En la revisión de documentos se identificaron las técnicas moleculares empleadas para su desarrollo, entre los años 2006 y 2020, se tabularon 6 diferentes técnicas de las cuales la más utilizada fue la amplificación de ácido nucleico en un 58,7%, seguido de la tecnología de microarrays con un 13%. Figura 11

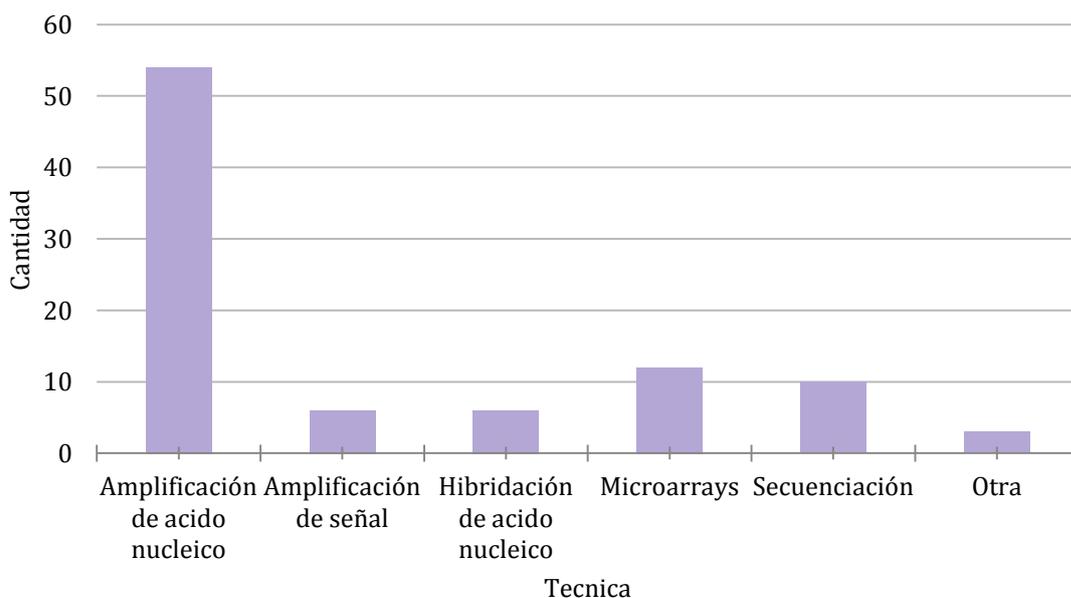


Figura 11. Técnicas moleculares (2006 - 2019)

La técnica molecular más utilizada, descrita anteriormente, cuenta con diferentes variantes y kits comerciales, se identificó que la más empleada fue la PCR y/o sus diferentes variantes en un 77.7% y los kits comerciales en un 22.2%, de estos Linear array fue el que se usó más frecuentemente, como se observa en la Figura 12.

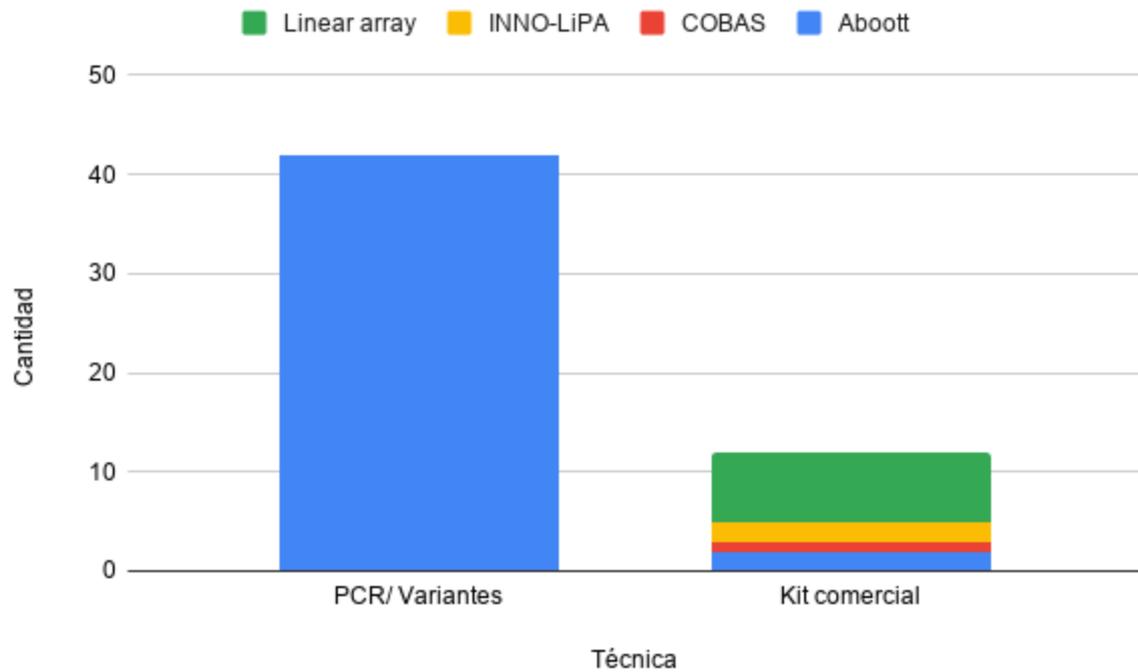


Figura 12. Técnicas de amplificación de ácido nucleico

6.5 Características de los ensayos comerciales para detección de VPH

Teniendo en cuenta la bibliografía estudiada sobre las técnicas moleculares para la detección de VPH, se encontraron diferencias y similitudes entre sí, en la tabla 7, se muestra un resumen claro sobre la información recopilada.

Nombre del ensayo	Método	Ácido nucleico	Diana	Tipos detectados	Avalados FDA
Captura de híbridos 2	Hibridación de sondas ARN y detección por quimioluminiscencia	ADN	Genoma completo	VPH-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	Si
COBAS 4800	PCR multiplex a tiempo real	ADN	L1	VPH-AR 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 Identifica 16 y 18	Si
Abbott RealTime	PCR en tiempo real	ADN	L1	VPH-AR 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 Identifica 16 y 18	No
Becton Dickinson	PCR multiplex a tiempo real	ADN	L1	VPH-AR, Identifica: 16, 18, 31, 45, 51, y 52. (14 serotipos de AR)	No
Linear arrays	PCR + hibridación inversa	ADN	L1	VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Probables 26, 53 66. VPH-BR 6, 11, 40, 42, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108. No determinado 55, 62, 64, 67, 69, 71, 83, 84 y IS39.	No
HPV Direct Flow chip kit	PCR + hibridación inversa	ADN	L1	HPV-AR 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. HPV-BR 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 84.	No
PapilloCheck	PCR Multiplex (cebadores fluorescentes) + hibridación inversa	ADN	E1	VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 053, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82.	No

Geno Flow	PCR en tiempo real	ADN	L1	VPH AR y BR 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 84	No
Aptima HPV	Detecta ARNm de E6/E7	ARN	E6/E7	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	No

Tabla 7. Principales características de los métodos para detección de VPH

6.6 Principales cebadores para la detección de VPH

De acuerdo a la literatura revisada y teniendo en cuenta que la técnica de amplificación de ácido nucleico fue la más utilizada, en la figura 8 se realizó una recopilación de los cebadores más comúnmente usados para la identificación de VPH.

Cebador	Secuencia	Ubicación	Gen Diana
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAAAYGG	6722 - 6741	L1
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	7151 - 7170	L1
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	6764 - 6786	L1
GP6	GAAAAATAAACTGTAAATCA	6975 - 6902	L1
GP5+	TTTGTTACTCTGGTAGATACTAC	6764 - 6786	L1
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	6975 - 6902	L1
E2	TTATTAGGCAGCACTTGGC	3383 - 3401	E2
E6	CACCAAAGAGAACTGC	86 - 102	E6

Tabla 8. Principales cebadores empleados para la identificación de VPH

6.7 Ventajas y desventajas de los métodos moleculares para la detección de VPH

Con los avances de la ciencia, se han venido desarrollados métodos que permiten el diagnóstico e identificación del VPH, sin embargo, se han hecho comparaciones, según metodologías empleadas para su desarrollo y se han determinados algunas ventajas y desventajas de cada uno, las cuales se muestran en la tabla 9

Técnica molecular	Ventajas	Desventajas
Hibridación de ácidos nucleicos	<p>Generan información de alta calidad</p> <p>La Hibridación in situ da una señal alta fácilmente detectable</p> <p>Semicuantificación de carga viral</p>	<p>Baja sensibilidad</p> <p>Necesidad de alto contenido de ADN purificado</p> <p>Requiere de mucho tiempo</p>
Captura de Híbridos 2	<p>Aprobado por la FDA</p> <p>Alta sensibilidad</p> <p>Alto valor predictivo negativo.</p> <p>Fácil de realizar, a partir de cepillados cervicales.</p>	<p>Especificidad limitada</p> <p>Puede presentar reacciones cruzadas con sondas de bajo riesgo.</p> <p>No distingue los tipos virales ni infecciones múltiples</p>
PCR	<p>Alta sensibilidad y especificidad</p> <p>Realizada en extendidos de células y en material parafinado.</p> <p>El producto de PCR es utilizado para realizar la detección específica de especie en otras pruebas.</p>	<p>Muy susceptible a la contaminación</p> <p>Elección de cebadores adecuados</p> <p>Estandarización de protocolos</p>
Cobas 4800	<p>Aprobado por la FDA</p> <p>Permite la detección de 14 tipos de VPH</p> <p>Identifica VPH 16 y 18</p> <p>Utiliza control interno b-globina</p> <p>Procesa más de 1.000 muestras en 24 horas.</p>	<p>Costo alto</p> <p>Requiere softwares específicos</p>
Linear array	<p>Permite la detección de 37 tipos de VPH</p> <p>Identifica el tipo específico</p> <p>Determina coinfecciones</p>	<p>Costo alto</p> <p>Requiere softwares específicos</p> <p>Requiere personal capacitado</p>
Microarrays	<p>Análisis paralelo de múltiples muestras de ADN</p> <p>resultados comparables con la secuenciación directa del ADN</p>	<p>Costo alto</p> <p>Requiere softwares específicos</p> <p>Requiere personal capacitado</p>
Secuenciación	<p>Método de referencia para la identificación de VPH</p> <p>Sensibilidad y especificidad que la electroforesis en gel</p>	<p>Costo muy alto</p> <p>Demanda mucho tiempo</p> <p>Requiere buena manipulación</p>
PapilloCheck	<p>Identificación HR / LR-HPV</p> <p>Detección de las infecciones múltiples</p> <p>Prueba de detección fiable</p>	<p>No amplifica el VPH -35 y -53</p> <p>Costo sigue siendo relativamente alto</p> <p>Requiere un aparato específico</p>
Detección de ARN E6/E7	<p>Alto valor predictivo positivo para detección de lesiones de alto grado</p> <p>Sensibilidad comparable con la de detección de ADN</p> <p>Detecta la presencia de 14 tipos de VPH</p>	<p>Difícil conservación de la muestra.</p> <p>Puede generar falsos negativos</p>

7. DISCUSIÓN

En la presente revisión se evaluaron artículos de 31 países, de los cuales el de mayor publicación fue Colombia, donde se revisó los serotipos genotipados con mayor frecuencia, en la mayoría de los artículos, se evaluó únicamente la presencia del virus y la identificación de los VPH 16 y 18, siendo estos los más frecuentes, sin embargo en los artículos donde se genotiparon más serotipos se evidencio que los serotipos de alto riesgo VPH 31 y 58 presentan una alta prevalencia y se correlacionan positivamente con el desarrollo del cáncer, lo que sugiere un papel importante en la caga infectiva, teniendo en cuenta que las vacunas preventivas contra el virus no generan protección contra estos.

La infección con el virus del papiloma humano es muy frecuente y se le atribuyen muchas muertes anuales alrededor del mundo, se ha identificado como agente causal del cáncer de cuello uterino y adicionalmente ha estado presente en tumores en otros órganos debido a su tropismo por el epitelio, lo que lo convierte en un blanco importante de investigación ya que es necesario encontrar mecanismos que faciliten una detección temprana, efectiva y que permita un tratamiento precoz para evitar el desarrollo de tumores, dentro de las primeras medidas de tamizaje encontramos la citología anual para mujeres, qué es el primer paso para una detección temprana, sin embargo esta técnica no es cuantitativa y presenta una alta tasa de falsos positivos, desde el año 2000 la técnica de captura de híbridos 2 (HC2) cuenta con la aprobación de la FDA para uso rutinario en las actividades de detección temprana en combinación con la citología, la cual presenta una sensibilidad muy alta y se desarrolla de forma sencilla, detecta la presencia del virus pero no permite identificar cuál de ellos es y tampoco si el paciente tiene uno o varios de estos tipos, lo que hace que su utilidad a nivel epidemiológico y de investigación sea muy limitado, en nuestra revisión el uso de esta técnica fue del (6,6%), quedando ubicada en el cuarto puesto; en una investigación realizada por Khunamornpong S y colaboradores⁷³ se puso a prueba el rendimiento de esta técnica en pacientes con anormalidades citológicas cervicales menores dentro de las que se incluyen células escamosas atípicas de importancia indeterminada (ASC-US) y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), se demostró que la tasa de positividad de HC2 fue significativamente mayor en el grupo LSIL que en el grupo ASC-US (74.8% versus 41.0%) mostrando una alta sensibilidad, otro ventaja presentada por esta prueba es que permite la detección de un gran número de tipos del virus, lo que concuerda con la investigación

realizada por Keegan y colaboradores⁷⁴ donde se compara las tecnologías de detección de VPH, captura híbrida 2 y PreTect™ HPV-Proofer, este último fundamentado en la detección de marcadores biológicos más específicos para la detección temprana del cáncer cervical como lo es el ARNm E6/E7, oncoproteínas de VPH de alto riesgo necesarias para la conversión y el mantenimiento de tumores malignos, en los resultados de este estudio la prevalencia general del ADN del VPH (68,6%) detectado por HC2 fue mayor que la del ARNm E6 / E7 (37,5%) detectado por PreTect™ HPV-Proofer, siendo un resultado predecible, ya que no todas las células infectadas con ADN del VPH tienen una expresión de alto nivel de ARNm E6 / E7. Además, se debe tener en cuenta que la prueba PreTect™ HPV-Proofer presenta limitaciones con respecto al menor número de genotipos de VPH detectados (5 tipos de alto riesgo) en comparación con HC2 que detecta 13 tipos de alto riesgo, pueden contribuir a la mayor tasa de detección observada para HC2.

La detección de ácido nucleico por medio de la reacción en cadena de polimerasa y sus diferentes variantes, se clasificó como la técnica más utilizada en la presente revisión (59,3%), ya que permite determinar diferentes tipos de VPH, a partir del uso de cebadores que se dirigen a regiones conservadas del genoma del virus, como el gen de la cápside L1, adicionalmente permite trabajar con muestras conservadas en parafina y es clasificada como una técnica altamente sensible y específica, que permite no solo identificar la presencia del virus, sino realizar su identificación, como lo realizaron Aedo y colaboradores⁷⁵ mediante la detección y tipificación de VPH en lesiones preneoplásicas del cuello uterino utilizando PCR-RFLP, partiendo de muestras con diagnóstico en su mayoría de lesión epitelial de alto grado y algunas de bajo grado, mostrando una detección en el 100% de las muestras y su posterior tipificación, mostrando una ventaja de esta técnica, ya que es posible diferenciar hasta entre 30 diferentes genotipos a partir de una sola reacción de amplificación, sin embargo cuando se trata de infecciones múltiples se presenta una desventaja, ya que los patrones de restricción pueden ser confusos, para lo cual se recomienda la tipificación por medio de una PCR multiplex como lo realizó Shim y colaboradores⁷⁶, quienes identificaron los serotipos de VPH presentes en personas diagnosticadas con algún tipo de ITS y con citologías negativas, para las cuales obtuvieron un 96.6% de positividad, similar a los resultados obtenidos mediante un ensayo de microarrays, comparados con HC2 en términos de sensibilidad analítica y valor de predicción de la infección por VPH; resultado similar al obtenido por Pannier y colaboradores⁷⁷, quienes determinaron la prevalencia de VPH mediante PCR y lo compararon con HC2, la tasa de similitud fue del 78.8%, siendo identificados mediante PCR el 100% de

las muestras, mostrando una alta sensibilidad tanto en muestras cervicales frescas y conservadas en parafina.

En cuanto a los kits comerciales utilizados para la detección de VPH, el resultado arrojó un mayor uso del ensayo de Linear Array de Roche, lo que se puede explicar por su capacidad de detección e identificación hasta de 37 serotipos diferentes, cualidad por la que Romero y colaboradores⁷⁸ lo emplearon para realizar la genotipificación del virus en mujeres atendidas en un hospital de alta complejidad de México, donde encontraron la presencia de 16 diferentes tipos de virus, dándolos a conocer, teniendo un impacto en la epidemiología y permitiendo conocer la pertinencia de la vacuna en esta población.

La tecnología de microarrays es una tecnología en desarrollo para estudiar la expresión de muchos genes a la vez, característica que la hace muy atractiva para la detección de VPH, debido a la variedad de serotipos circulantes. Esta técnica fue la segunda más utilizada en la presente revisión ya que permite un diagnóstico confiable y rápido, presentando muy pocas desventajas, su rendimiento se compara en una investigación realizada por Wong y colaboradores⁷⁹ en donde se hace una comparación entre las pruebas para detección de VPH Geno Flow y el ensayo Linear Array en una población asiática, el ensayo Geno Flow logró la mayor especificidad (23.08%) para indicar la identificación en comparación con los ensayos Linear Array (19.23%) e HC2 (8.97%), la prueba Geno Flow mostró una mayor sensibilidad que el ensayo Linear Array; sin embargo en otro estudio similar, realizado por Dalstein y colaboradores⁸⁰, se evaluó el ensayo PapilloCheck, basado en microarrays y Linear Array, donde se determinó que sus resultados son comparables, ya que no se encontraron diferencias significativas, aunque la mayor diferencia radicó en la sensibilidad para la detección de los serotipos 53 y 56, lo que demuestra que ambos tienen un buen rendimiento.

Entre las formas de diagnóstico del VPH también se encuentra detección de ARNm de las oncoproteínas E6/7, las cuales, de acuerdo a los resultados de esta revisión tiene un papel muy importante en cuanto al curso y pronóstico de la enfermedad, ya que sugieren si el virus está progresado al punto de llegar a la integración, lo que se correlaciona ampliamente con el desarrollo de cáncer, aunque no ocurre en todos los casos y es un excelente biomarcador de la actividad oncogénica del virus, el cual se puede evaluar mediante pruebas de PCR en tiempo real que se basan en el supuesto de que la forma episomal (no integrada) contiene el mismo número de copias de E2 y E6. Cuando ocurre la integración, la interrupción del gen E2 causa

una reducción en el número de copias E2; por lo tanto, la integración se puede detectar midiendo la proporción de ADN E2 / E6⁸¹, lo que se correlaciona con la investigación realizada por De Marco y colaboradores⁸², quienes realizaron la detección de la forma integrada del VPH 16, mediante esta técnica, partiendo de 170 muestras y obteniendo 3 integradas 13 mixtas y 36 episomales, confirmando la integración con el estándar de oro, es decir por secuenciación, lo que comprueba la especificidad de la prueba, esto para el caso de CCU; otra investigación publicada por Zhang y colaboradores⁸³, cuyo objetivo fue conocer la Infección e integración del virus del papiloma humano en el carcinoma esofágico, se evidencio que las tasas de detección del ADN del VPH en el carcinoma esofágico y el tejido adyacente al tumor fueron significativamente más altas que en los controles normales (77.4% y 80.2% vs. 33.0%) y la tasa de integración del VPH-16 en el tejido del carcinoma fue mayor que la de los tejidos adyacentes al tumor y de control (93,4% frente a 50,9% y 45,5%), lo que supone un papel relevante del VPH, como causal del cáncer esofágico y adicionalmente el papel de la integración viral como indicador oncogénico.

Teniendo en cuenta que la aplicación de PCR para la identificación de VPH fue la más empleada en esta revisión, se pudo establecer un patrón entre algunas publicaciones donde se evidencio el uso frecuente de cebadores con excelentes rendimiento, dentro de los que se encuentran GP5 + / 6 +, MY09 / 11, de acuerdo a la evaluación de rendimiento realizada por Muñoz y colaboradores⁸⁴ en donde se procesaron muestras cervicales para detectar la presencia del virus del papiloma humano (VPH) mediante el ensayo de HC2y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta última mediante el uso de tres diferentes pares de cebadores (GP5 + / 6 +, MY09 / 11 y pU1M / 2R), la prevalencia de ADN-VPH fue del 36,5% con HC2 y la mayor parte, el 55,2% con PCR, la mayor cantidad de ADN fue detectado mediante el empleo de MY09 / 11. Resultado similar al obtenido por Camargo y colaboradores⁸⁵ en donde se compararon los conjuntos de cebadores GP5 + / 6 + y MY09 / 11, donde el mayor rendimiento lo tubo MY09/11 con un OR de 18.2 cuando se usó el juego de cebadores MY09 / 11 y 6.52 con el juego de cebadores GP5 + / 6 +, sin embargo los resultados también mostraron una asociación entre la positividad GP5 + / 6 + y la gravedad de la enfermedad con respecto a los hallazgos citológicos, por lo cual es recomendable usar los dos en simultáneo. En cuanto a la identificación de integración viral, es necesario utilizar cebadores que amplifique las proteínas virales E2 y E6, para conocer el estado del virus, proceso realizado por Cañadas y colaboradores⁸¹, quienes utilizaron los cebadores para E2 “TTATTAGGCAGCACTTGGC” y E7 “CACCAAAGAGAACTGC”, para la identificación de

la integración de VPH 16, donde encontró un 36% de integración y los resultados fueron compatibles por el control positivo.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con la información recopilada en la presente revisión, se pudo concluir que;

- El diagnóstico temprano del virus, mediante técnicas moleculares, aun en ausencia de lesiones cervicales, disminuye la incidencia de cáncer a partir de infección.
- La PCR, fue la técnica más empleada en los artículos de investigación, permitiendo el diagnóstico, la identificación y seguimiento, tanto en muestras frescas como conservadas en parafina.
- La tecnología de microarrays fue la segunda técnica más utilizada, por lo que se convierte en una buena alternativa tanto para investigación como para diagnóstico.
- Como producto de la presente revisión se generó un cuadro resumen con la información más relevante sobre las principales técnicas para la detección del VPH.
- Se proporciono una tabla con los principales cebadores utilizados para la detección y seguimiento de la infección a partir PCR, a los cuales se les evaluó el rendimiento positivamente.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cáncer Res Clin Oncol* [Internet] (1996) [Citado 15 Agos 2018] (122): 3-13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8543590>
2. Bosch F, Castellsagué X, Muñoz N, De Sanjosé S, Ghaffari A, Gonzalez L, et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst*, [Internet] 1996 [Citado 15 Agos 2018] 88(15):1060-1067. Disponible: <https://academic.oup.com/jnci/article/88/15/1060/89272>
3. Zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. [Internet] 1996 [Citado 15 Agos 2018] 1288(2): F55-78. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876633#>
4. Alani R, Münger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol*. [Internet] 1998 [Citado 15 Agos 2018] 16(1): 330-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440761>
5. Zur Hausen H. Papilloma Viruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. [Internet] 2000 [Citado 15 Agos 2018] 92(9): 690-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/jnci/article/92/9/690/2906127>
6. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cáncer*. [Internet] 2002 [Citado 15 Agos 2018] 2(5): 342-50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010>

7. Münger k, Howley P. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*. [Internet] 2002 [Citado 15 Agos 2018] 89(2): 213-228 Disponible:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0168170202001909>
8. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer, *J. Clin. Pathol.* [Internet] 2002 [Citado 15 Agos 2018] (55): 244 Disponible en :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
9. Cho N , Kim Y, Kim J. Alteration of Cell Cycle in Cervical Tumor Associated with Human Papillomavirus: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *Yonsei Med J.* [Internet] 2002 [Citado 15 Agos 2018] 43(6): 722-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12497655>
10. Yorgo M, Benes T, Stephen H. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* [Internet] 2002 [Citado 15 Agos 2018] 21(18): 4754–4762. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126290/>
11. Fehrmann, F, DJ Klumpp, LA Laimins. La proteína E5 del virus del papiloma humano tipo 31 apoya la progresión del ciclo celular y activa las funciones virales tardías tras la diferenciación epitelial. *J. Virol.* [Internet] 2003 [Citado 15 Agos 2018] (77): 2819-2831. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12584305>
12. Bousarghin L, Touzé A, Sizaret P, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol.* [Internet] 2003 [Citado 15 Agos 2018] 77(6): 3846-50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610160/>
13. Muñoz N, Bosch F, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Snijders P, Meijer C. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* [Internet] 2003 [Citado 15 Agos 2018] 348(6): 518-27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259>
14. Binh Yang, Freddie I. Bray D. Maxwell P, John S,s Zuo - Feng Z. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: An evaluation using years of life lost. *IJC.* [Internet] 2004 [Citado 19 Agos 2018] 109(3): 418-424. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.11719>
15. Hudelist G, Manavi M, Pischinger K, Watkinsl T, Singer C, Kubista E, Czerwenka K. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.*

- [Internet] 2004 [Citado 19 Agos 2018] 92(3): 873-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984955/>
16. Longworth M, Laimins L. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* [Internet] 2004 [Citado 19 Agos 2018] 68(2):362-72. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187189/>
 17. Rivera R, Delgado J, Painel V., Barrero V., Larraín A. MECANISMO DE INFECCIÓN Y TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA PRODUCIDO POR VIRUS PAPILOMA HUMANO EN EL EPITELIO CERVICAL. *REV CHIL OBSTET GINECOL* [Internet] 2006 [Citado 19 Agos 2018] 71(2): 135-140. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262006000200011
 18. Hebner C, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* [Internet] 2006 [Citado 19 Agos 2018] 16(2): 83-97. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287204/>
 19. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* [Internet] 2006 [Citado 19 Agos 2018] 110(5): 525-41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597322/>
 20. Gregory J, Tsongalis, Lawrence M. Molecular diagnostics: A historical perspective. *Clinica Chimica Acta.* [Internet] 2006 [Citado 19 Agos 2018] 369(2): 188-192. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898106002026#!>
 21. Abreu A, Souza R, Gimenes F, Consolaro M. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J.* [Internet] 2012 [Citado 19 Agos 2018] (9): 262. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507852/>
 22. Farfán M. MOLECULAR BIOLOGY IN CLINICAL DIAGNOSIS. *Revista Médica Clínica Las Condes.* [Internet] 2015 [Citado 19 Agos 2018] 26(6): 788-793 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001546#!>
 23. Merchán M, Torres M, Díaz A. Molecular Biology Techniques for research development. A literature review. *Rev haban cienc méd.* [Internet] 2017 [Citado 19 Agos 2018] 16(5) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012
 24. Cañadas M, Darwich L, Sirera G, Cirigliano V, Bofill M, Clotet B, Videla S. New molecular method for the detection of human papillomavirus type 16 integration. *Clin Microbiol Infect.* [Internet] 2010 [Citado 19 Agos 2018] 16(7): 836-42. Disponible:

[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61737-7/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61737-7/fulltext)

25. Jeney C1, Takács T, Sebe A, Schaff Z. Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods*. [Internet] 2007 [Citado 19 Agos 2018] 140(1-2): 32-42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169438>
26. Aedo S, Melo A, García P, Guzmán P, Capurro I, Roa J. Detection and typification of human papilloma virus in pre-cancerous cervical lesions. *Rev Méd Chile*. [Internet] 2007 [Citado 19 Agos 2018] (135): 167-173. Disponible: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872007000200004
27. Concha M. Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Infectología práctica*. [Internet] 2006 [Citado 20 Feb 2019] Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v24n3/art06.pdf>
28. Ochoa F. Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III. *Gaceta Mexicana de Oncología*. [Internet] 2014 [Citado 20 Feb 2019] 13(5): 308-315. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-virus-del-papiloma-humano-desde-X1665920114805966>
29. Moreno A. Infección por el virus del papiloma humano en mujeres con lesión intraepitelial cervical, aspectos virológicos y clinicopatológicos. Departamento de genética y microbiología, Universidad de Murcia. [Internet] 2014 [Citado 20 Feb 2019] Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/131134/TAMD.pdf?sequence=1>
30. Arroyo J. Detección e identificación de los virus del papiloma humano, caracterización de dos nuevas variantes. Universidad autónoma de Barcelona, departamento de Bioquímica y Biología molecular. [Internet] 2015 [Citado 20 Feb 2019]. Disponible en: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_310595/jdaa1de1.pdf
31. Rojo S. Virus del papiloma humano y cancer de cervix. Factores virales de progresión. Universidad de Oviedo. [Internet] 2016 [Citado 20 Feb 2019] Disponible en: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/40620/1/TD_SusanaRojo.pdf
32. <https://www.who.com>. Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos VPH [Internet]. OMS: agosto de 2017. Disponible en: <https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/es/>

33. Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Virus del papiloma humano. Manual de vacunas en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; ene/2020. [consultado el dd/mmm/aaaa]. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-42>
34. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. LINEAMIENTOS TÉCNICOS Y OPERATIVOS PARA LA VACUNACIÓN CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) PRIMERA FASE. [Internet] 2012 [Citado 20 Feb 2019] Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Lineamientos%20VPH.pdf>
35. BES. Cáncer de mama y cuello uterino Vigilancia epidemiológica. INS [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%20C3%ADn%20epidemiol%20B3gico%20semana%2023.pdf>
36. BES. Semana epidemiológica 52. INS. [Internet]. 2019. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_52.pdf
37. Fehrmann, F, DJ Klumpp, LA Laimins. La proteína E5 del virus del papiloma humano tipo 31 apoya la progresión del ciclo celular y activa las funciones virales tardías tras la diferenciación epitelial. J. Virol [Internet] 2003 [Citado 20 Feb 2019] 77: 2819-2831. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12584305>
38. Álvarez A, Sepúlveda Arias J, Siller López F. Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. Investig andina. [Internet] 2012 [Citado 20 Feb 2019] 14(24): 438-456. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-81462012000100007
39. Erazo E, Velásquez M. Respuesta inmunológica al virus del papiloma humano. Dermatol Rev Mex [Internet] 2019 [Citado 20 Feb 2019] 63(1): 40-59. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2019/rmd191f.pdf>
40. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer, J. Clin. Pathol. [Internet] 2002 [Citado 20 Feb 2019] (55): 244 Disponible en :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
41. Sanjosé S, Broton M, Pavón M. The natural history of human papillomavirus infection. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. [Internet] 2018 [Citado 20 Feb 2019] (47): 2-13. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1521693417301335>
42. Identificación del virus del papiloma humano mediante PCR- RFLP y posterior genotipificación en muestras de tejido cervical parafinado con diagnostico

- histopatológico de displacia severa o cáncer in situ, procedentes del hospital de Solca Núcleo Quito. [Internet] 2012 [Citado 20 Feb 2019] Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec:8080/jspui/bitstream/21000/5181/1/T-ESPE-033164.pdf>
43. J, Ancízar Aristizábal F. Integración viral y cáncer de cuello uterino. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. [Internet] 2006 [Citado 20 Feb 2019] 35(1): 5-32. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v35n1/v35n1a01.pdf>
 44. Anil C. Beyond Cervical Cancer: Burden of Other HPV-Related Cancers Among Men and Women..Journal of Adolescent Health. [Internet] 2010 [Citado 20 Feb 2019] 46(4): 20-S26. Disponible: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1054139X10000765#bib2>
 45. Münger k, Howley P. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Research. [Internet] 2002 [Citado 18 Mayo 2019] 89(2): 213-228 Disponible: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0168170202001909>
 46. Maxwell P, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine. [Internet] 2006 [Citado 18 mayo 2019] 3(24): S11-S25. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0264410X06006840>
 47. Joel M, Palefsky M. Human Papillomavirus-Related Disease in Men: Not Just a Women's Issue. Journal of Adolescent Health. [Internet] 2010 [Citado 12 julio 2019] 46(4): S12-S19. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1054139X10000339>
 48. Bosch F, Castellsagué X, Muñoz N, De Sanjosé S, Ghaffari A, González L, et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain.J Natl Cancer Inst. [Internet] 1996 [Citado 18 Mayo 2019] 88(15):0-1067. Disponible: <https://academic.oup.com/jnci/article/88/15/1060/89272>
 49. Bosch F, Sanjosé S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Dis Markers. [Internet] 2007 [Citado 18 Mayo 2019] 23(4): 213-227. Disponible: <https://content.iospress.com/articles/disease-markers/dma00420>
 50. Chelimo C Wouldes T,Cameron L, Elwooda M. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. Journal of Infection. [Internet] 2013 [Citado 18 Mayo 2019] 66(3): 207-217. Disponible: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0163445312003106>
 51. Bell M, Schmidt-Grimminger D, Jacobsen C, Chauhan S, Mahera D, Buchwaldd D. Risk factors for HPV infection among American Indian and white women in the Northern

- Plains. *Gynecologic Oncology*. [Internet] 2011 [Citado 18 Mayo 2019] 121(3): 532-536. Disponible: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0090825811001521#bb0100>
52. Instituto nacional del cancer. Vacunas contra el virus del papiloma humano (VPH). [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/hoja-informativa-vacuna-vph>
 53. <https://www.minsalud.gov>. Cáncer de cuello uterino [Internet]. [Citado 3 de enero de 2020] Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/ssr/Paginas/Cancer-de-cuello-uterino.aspx>
 54. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al: Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. [Internet] 2008 [Citado 26 julio 2019] (26): 29-41.
 55. Pannier-Stockman C, Segard C, Bennamar S, Gondry J, Boulanger JC, Sevestre H, et al: Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. *J Clin Virol*. [Internet] 2008 [Citado 26 julio 2019], 42: 353-360. 10.1016/j.jcv.2008.03.022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485810>
 56. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S: Cervical human Papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. [Internet] 2010 [Citado 26 julio 2019] (202): 1789-1799.
 57. Corvalán A. Molecular biology in infectious diseases. part i. development and methodologies. *Rev Chil Infect* [Internet] 2002 [Citado 26 julio 2019]; 19(1): 14-24. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v19n1/art03.pdf>.
 58. Leonart M, Sánchez R, Martín-Duque P, Ramón y Cajal S. Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomopatológico. *REV ESP PAT*. [Internet] 1997 [Citado 26 julio 2019] 3(3): 249-257
 59. Incorporación de LA PRUEBA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO en PROGRAMAS DE PREVENCIÓN DE CÁNCER CERVICOUTERINO. [Internet] Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=incorporacion-de-la-prueba-del-vph-en-programas-de-prevencion-de-cancer-

cervicouterino&alias=36310-manual-vph-resumen-pruebas-disponibles-evidencia-cientifica-310&Itemid=270&lang=es

60. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA: Métodos de detección molecular del virus del papiloma humano (VPH). *Int J Marcadores Biol.* [Internet] 2009 [Citado 26 julio 2019] (24): 215-222.
61. Camargo M, Soto-De Leon S, Sánchez R, Muñoz M, Vega E, Beltran M, et al: Detección por VPH del virus del papiloma humano en Colombia: comparación de GP5 + / 6 + y MY09 / 11 conjuntos de cebadores. *J Virol Métodos.* [Internet] 2011 [Citado 26 julio 2019] (178): 68-74. 10.1016 / j.jviromet. 2011.08.014.
62. Leabaneng T, Surbhi G, Mohan N, Sikhulile M, Simani G, Kasvosve, Giacomo M. Molecular detection of human papillomavirus (HPV) in highly fragmented DNA from cervical cancer biopsies using double-nested PCR. *MethodsX.* [Internet] 2018 [Citado 26 julio 2019] (5): 569-578 Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S2215016118300852#bib0110>
63. Biesecker L. Tecnología de microarrays. National Human Genome. [Internet] 2019 [Citado 08 Nov 2019] Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Tecnologia-de-microarrays>
64. Vitro Master Diagnóstica. HPV Direct Flow Chip Kit. Inserto. [Internet] 2019 [Citado 08 Nov 2019] Disponible en: http://www.labtronics.net/dmolec_vhp.php
65. Greiner Bio-One GmbH. PapilloCheck® Manual de instrucciones. [Internet] 2011 [Citado 08 Nov 2019] Disponible en: https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/IFU_Instructions_for_Use/IFU_Diagnostics/PapilloCheck/IFU_PapilloCheck_Rev._BQ-013-07_ES.pdf
66. Wong F, Ching F, Chow J. Comparison of the DiagCor GenoFlow Human Papillomavirus Array Test and Roche Linear Array HPV Genotyping Test. *J Clin Microbiol.* [Internet] 2012 [Citado 08 Nov 2019] 50(5): 1691–1697. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026337/>
67. Wong O, Lo C, Chow J, Tsun O, Szeto E, Liu S, Ngan H, Cheung A. Comparison of the GenoFlow Human Papillomavirus (HPV) Test and the Linear Array Assay for HPV Screening in an Asian Population. *J Clin Microbiol.* [Internet] 2012 [Citado 08 Nov 2019] 50(5): 1691–1697. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347143/>

68. Szostek S, Zawilińska B, Klimek M, Wójcik K, Koprynia M, Kosz-Vnenchak M. [Differentiation of an integrated and episomal HPV-16 DNA using real-time PCR in cervical specimens of women diagnosed with intraepithelial lesions and invasive cervical cancer]. *Ginekol Pol.* [Internet] 2011 [Citado 08 Nov 2019] 82(6): 441-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21853934>
69. Rincón L, García D. Las pruebas de ADN para el Virus Papiloma Humano -VPH, Los nuevos retos en la tamización para cáncer de cuello uterino 2012 (Pagina web). Disponible en: https://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/354cd559443a595ea80d9dd1b968974e_Hechos%20y%20Acciones%20VIA%20VILI.pdf
70. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* [Internet] 2008 [Citado 08 Nov 2019] 18(1):121-7 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506843>
71. HOLOGIC. Aptima HPV Assay. Inserto (Pagina web). Disponible en: https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/AW-14517-301_003_01.pdf
72. PRETECT HPV-PROOFER HV. [Internet] 2020 [Citado 02 enero 2020]. Disponible en: <https://www.pretect.no/pretecthpvproofer>
73. Asian Pac J Cancer Prev. [Internet] 2014;15(24):10961-6. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605209>
74. Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect™ HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens.
75. Aedo A Susana, Melo A Angélica, García Patricia, Guzmán G Pablo, Capurro V Italo, Roa S Juan Carlos. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *Rev. méd. Chile* [Internet]. 2007 [citado 2020 febrero 19] 135(2): 167-173. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872007000200004&lng=es.
76. Shim H, Noh S, Park A, Lee Y, Kim J, Chung H, Kang K, Cho N. Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by multiplex-PCR. *BMC Infect Dis.* [Internet] 2010 [Citado 02 enero 2020] 28(10):284. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920170>

77. Pannier C , Segard C , Bennamar S , Gondry J , Boulanger JC , Sevestre H , Castelain S , Duverlie G. Prevalencia de genotipos de VPH determinados por PCR y secuenciación de ADN en muestras cervicales de mujeres francesas con o sin anomalías. *J Clin Virol*. [Internet] 2008 [Citado 02 enero 2020] 42(4): 353-60. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485810>
78. Romero P, Uribe A, Bandala C, Poot A, Ornelas N, Rodríguez M, Valdespino M, Taniguchi K, Marrero D, López R. Genotipado del virus del papiloma humano en un grupo de mujeres mexicanastratadas en un especialista altamente especializado el hospital: las infecciones múltiples y su potencial trascendencia en el programa de vacunación actual. [Internet] 2017 [Citado 02 enero 2020] 149(7):287-292. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0025775317301859>
79. Wong O, Lo C, Chow J, Tsun O, Szeto E, Liu S, Ngan H, Cheung A. Comparison of the GenoFlow Human Papillomavirus (HPV) Test and the Linear Array Assay for HPV Screening in an Asian Population. *J Clin Microbiol*. [Internet] 2012 [Citado 02 enero 2020] 50(5): 1691–1697. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347143/>
80. Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods*. [Internet] 2009 [Citado 02 enero 2020] 156(1-2):77-83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041893>
81. Cañadas M, Cirigliano V, Darwich L, Sirera G, Videla S, Bofill M, Clotet B. .Nuevo método molecular para la detección de la integración del virus del papiloma humano tipo 16. *CMI* [Internet] 2010 [Citado 02 enero 2020] 16(7): 836–842. Disponible en: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61737-7/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61737-7/fulltext)
82. De Marco L, Gillio A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *Journal of Clinical Virology*. [Internet] 2007 [Citado 02 enero 2020] 38(1): 7-13. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1386653206003441>
83. Zhang, Q. Y.; Zhang, D. H.; Shen, Z. Y.; Xu, L. Y.; Li, E. M. & Au, W. W. Infection and integration of human papillomavirus in esophageal carcinoma. *Int. J. Hyg. Environ.*

Health. [Internet] 2014 [Citado 02 enero 2020] (2): 156-61, 2011.Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130683>

84. Munoz M, Camargo M, Soto-De Leon SC, Sanchez R, Parra D, Pineda AC, Sussmann O, Perez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Human papillomavirus detection from human immunodeficiency virus-infected Colombian women's paired urine and cervical samples. PLoS One. 2013;8(2): 56509. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418581>